



HAL
open science

Caractérisation de la réponse immune dans la neuromyelite optique

Jean-Baptiste Chanson

► **To cite this version:**

Jean-Baptiste Chanson. Caractérisation de la réponse immune dans la neuromyelite optique. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ036 . tel-01037926

HAL Id: tel-01037926

<https://theses.hal.science/tel-01037926>

Submitted on 23 Jul 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ ED 414
Unité de recherche INSERM U1119

THÈSE présentée par :
Jean-Baptiste CHANSON

soutenue le : **19 septembre 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Spécialité : **Neurosciences**

**CARACTERISATION DE LA REPONSE
IMMUNE DANS LA NEUROMYELITE
OPTIQUE**

THÈSE dirigée par :

DE SEZE Jérôme

Professeur des Universités, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

DU PASQUIER Renaud

Professeur des Universités, Université de Lausanne

LAPLAUD David-Axel
Nantes

Docteur en médecine et en sciences, Université de

MARTIN Thierry

Professeur des Universités, Université de Strasbourg

Je voudrais remercier:

Les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail : **Jérôme de Seze, Renaud Du Pasquier, David-Axel Laplaud, Thierry Martin** ainsi que les membres invités du jury **Guy Mensah-Nyagan et Thierry Vincent**.

Les membres de notre laboratoire scientifique (Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives puis unité Biopathologie de la Myéline, Neuroprotection et Stratégies Thérapeutiques-INSERM 1119) qui ont accompagné ce travail avec leur aide précieuse : **Guy Mensah-Nyagan, Said Ghandour, Jérôme de Seze, Gabrielle Rudolf, Jérôme Steibel, Elisabeth Trifilieff, Nicolas Collongues et Dao Lam**.

Les membres des laboratoires ou des services hospitaliers qui ont accepté de mettre leur expertise au service de la recherche dans la neuromyéélite optique: **Thierry Vincent et Mélissa Alamé** (laboratoire d'immunologie du CHU de Montpellier); **Anna-Maria Papini, Paolo Rovero, Maria-Claudia Alcaro, Elisa Peroni, Chiara Palladino et Ilaria Paolini** (Université de Florence); **Jean-Paul Armspach, Frédéric Blanc, Stéphane Kremer et Julien Lamy** (Institut de Physique Biologique/ICube); **Izzie-Jacques Namer et François-Marie Moussallieh** (Département de Médecine Nucléaire du CHU de Strasbourg); **Patrick Vermersch et Hélène Zéphir** (CHU de Lille)

Les membres du service de neurologie du CHU de Strasbourg qui m'ont enseigné directement ou non mon métier à la frontière du soin et de la recherche dont cette thèse est un prolongement et qui m'ont aussi aidé à mener ces travaux de recherche.

Tous ceux qui ont contribué, souvent anonymement, à la diffusion de la connaissance, notamment sur Internet, et les patients qui ont participé aux études.

Sur le plan personnel, je remercie ma famille et mes proches pour leur soutien qui m'a été précieux. Je voudrais notamment marquer ma gratitude et mon affection à ma mère, ma sœur Blandine et son époux Julien, les petites Léonie et Camille, mon oncle et ma tante Guy et Hélène Delmas, mon oncle Jean et ma regrettée tante Michèle Debord. Je voudrais particulièrement dédier cette thèse à mon père.

Table des matières:

Remerciements.....	2
Table des matières.....	4
Liste des abréviations.....	7

I) INTRODUCTION.....8

A) La neuromyéélite optique : généralités.....	9
1) Histoire du concept.....	9
2) Epidémiologie.....	12
3) Signes cliniques.....	14
4) Examens d'imagerie.....	15
5) Examens biologiques.....	17
6) Autres examens.....	18
7) Critères diagnostiques.....	19
8) Evolution.....	22
9) Traitement.....	24
B) La réponse immune dans la NMO.....	25
1) Une réponse à prédominance humorale.....	25
a) Arguments histologiques.....	25
b) Arguments biologiques.....	26
2) Les anticorps anti-AQP4.....	28
a) Découverte des anticorps anti-AQP4.....	28
b) Caractéristiques de l'AQP4.....	30
c) Les anticorps anti-AQP4 sont pathogènes.....	33
d) Mécanismes d'action des anticorps anti-AQP4.....	35
e) Intérêts et limites des anticorps anti-AQP4.....	42
3) Le suivi longitudinal de la réaction immune.....	44
Article 1: Immunological follow-up of patients with neuromyelitis optica: is there a good biomarker?	
C) Objectifs.....	50

II) LA REPONSE IMMUNE DANS UN MODELE ANIMAL.....51

Article 2: *The Brown Norway opticospinal model of demyelination: does it mimic multiple sclerosis or neuromyelitis optica?*

Commentaires

1) Principaux résultats.....	64
2) Problématique des modèles animaux de NMO.....	65
3) Nouvelles données histologiques.....	67
4) Nouvelles données immunologiques.....	70
5) Données de l'IRM.....	72
6) Nouvelles expériences pratiquées dans le laboratoire.....	73

III) CARACTERISATION DE LA REPONSE IMMUNE DANS LA NEUROMYELITE OPTIQUE.....75

1) Suivi longitudinal des anticorps anti-AQP4 et activité de la maladie.....	76
--	----

Article 3: *Evaluation of clinical interest of anti-aquaporin 4 antibodies follow-up in neuromyelitis optica*

Commentaires	84
---------------------------	----

2) Recherche de nouvelles cibles antigéniques.....	85
--	----

Article 4: *Evaluation of new immunological targets in neuromyelitis optica*

Commentaires	94
---------------------------	----

3) Recherche de marqueurs métaboliques.....	98
---	----

Article 5 (en révision) : *Serum Analysis by 1H Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy: a new tool for distinguishing neuromyelitis optica from multiple sclerosis*

Commentaires	124
---------------------------	-----

<u>IV) REPERCUSSIONS DE LA NMO</u>	126
1) Répercussions sur le volume cérébral.....	127
Article 6 : <i>White matter volume is decreased in the brain of patients with neuromyelitis optica</i>	
Commentaires	135
2) Répercussions sur la qualité de vie, la fatigue et l’humeur.....	138
Article 7: <i>Evaluation of health-related quality of life, fatigue and depression in neuromyelitis optica</i>	
Commentaires	145
<u>V) DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u>	147
A) La dysfonction astrocytaire.....	148
B) Les NMO séronégatives pour les anticorps anti-AQP4.....	152
C) Topographie des lésions immunes.....	158
1) Localisations préférentielles des lésions.....	158
2) Mécanismes expliquant la répartition des lésions.....	162
D) Perspectives.....	164
1) Amélioration du diagnostic et du suivi de la NMO.....	164
2) Amélioration du traitement de la NMO.....	166
<u>VI) CONCLUSION</u>	169
REFERENCES	171

Liste des Abréviations

ADCC : Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity	OAP: Orthogonal Array of Particles
AQP4 : aquaporine 4	OCT: Optical Coherence Tomography
ARNm: Acide RiboNucléique messenger	PEV: Potentiels Evoqués Visuels
CAM (ou MAC) : Complexe d'attaque membranaire	PLP : ProteoLipid Protein
EDSS : Expanded Disease Status Scale	SEP : Sclérose en Plaques
EAAT : Excitatory Amino Acids Transporter	SNC: Système Nerveux Central
EAE: Experimental Auto-immune Encephalomyelitis	SNP: Système Nerveux Périphérique
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
FA: Fraction d'Anisotropie	
FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting	
FLAIR : FLuid Attenuated Inversion-Recovery	
Ig: Immunoglobuline	
IRM: Imagerie par Résonance Magnétique	
MBP: Myelin Basic Protein	
MOG: Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein	
NAA: N-acétyl-aspartate	
NMO : Neuromyéélite Optique	

I) INTRODUCTION

A) La neuromyélie optique: généralités

1) Histoire du concept

La notion d'une inflammation du système nerveux central impliquant principalement les nerfs optiques et la moelle épinière (optico-médullaire) est à la base du concept de neuromyélie optique (NMO).

Au cours du XIX^{ème} siècle, certaines publications avaient déjà rapporté quelques cas d'inflammation optico-médullaire (Allbutt, 1870; Dreschfeld, 1882). L'un de ces articles apportait même une confirmation histologique (Dreschfeld, 1882). Ce n'est cependant qu'en 1894 que le nom de « neuromyélie optique » fut proposé. Ce terme apparaît dans la thèse de Fernand Gault réalisée sous la direction d'Eugène Devic, neurologue à Lyon (Gault, 1894). Cette thèse s'intéressait au cas d'un patient atteint d'inflammation optico-médullaire et le comparait à plusieurs autres cas rapportés auparavant. Eugène Devic a fait connaître ce concept d'inflammation du SNC à prédominance optico-médullaire dans un article publié la même année (Devic, 1894). C'est pourquoi la NMO est aussi appelée syndrome ou maladie de Devic.

Cette affection n'a cependant pas été considérée tout de suite comme une maladie à part entière. En effet la sclérose en plaques avait aussi été décrite au XIX^{ème} siècle notamment par Jean-Martin Charcot. Il s'agit aussi d'une inflammation diffuse du système nerveux central concernant

l'encéphale, les nerfs optiques et la moelle épinière. La SEP est une maladie beaucoup plus fréquente que la NMO avec une prévalence en France estimée à 50-100/100 000 contre 0,3/100 000 pour la NMO (Collongues et al., 2010). Les cas d'inflammation optico-médullaire étaient donc parfois considérés comme des variants de SEP et donc la présence d'un syndrome de Devic était accepté mais pas celle d'une maladie (Brain, 1930). Au contraire, d'autres auteurs ont considéré cette entité comme une maladie différente de la SEP (Acchiote, 1907). Certains restreignaient cette maladie aux formes aiguës ou subaiguës où la névrite optique et la myélite survenaient en même temps ou à moins de 2 ans d'intervalle (Burke, 1968; Kira, 2003). De même la présence d'une autre maladie auto-immune (par exemple lupus érythémateux disséminé ou maladie de Gougerot-Sjögren) était au départ un critère d'exclusion (Jarius and Wildemann, 2013; Miller et al., 2008). En effet, le tableau d'une névrite optique bilatérale accompagnée d'une paraplégie ascendante était relativement caractéristique tandis que la survenue à répétition de névrites optiques et de myélites plutôt sévères mais espacées dans le temps pouvait plus facilement être confondue avec une SEP.

L'utilisation de deux examens complémentaires a permis de beaucoup mieux individualiser la NMO. Le premier est l'IRM qui a montré depuis les années 1980-1990 que la neuromyérite optique s'accompagnait d'anomalies IRM particulières. On retrouve en effet des myélites transverses (plus de la moitié de la surface axiale de la moelle) et étendues (au moins 3 niveaux vertébraux sur le plan sagittal) au contraire de la SEP où les zones d'inflammation de la moelle sont nettement plus petites (O'Riordan et al., 1996). Le deuxième examen est la recherche d'un anticorps spécifique de la NMO découvert en 2004 (Lennon et al., 2004b). Cet anticorps, dirigé contre l'aquaporine 4, appelé NMO-IgG ou anticorps anti-AQP4 a permis aussi d'étendre le spectre de la maladie. Certains patients avec des névrites optiques sans myélites ou au contraire avec des myélites sans névrite optique présentent en effet cet anticorps. Compte-tenu de la grande spécificité de cet anticorps, il a été proposé de parler de maladies du spectre NMO (NMO spectrum disorders).

Ainsi, il est actuellement admis que les cas d'inflammation du système nerveux central présentant des signes atypiques pour une SEP et évocateurs de NMO (notamment myélite extensive ou récidivante, névrite optique récidivante, bilatérale, sévère, associées avec une atteinte du tronc cérébral et/ou des anticorps anti-AQP4) mais qui ne remplissent pas tous les critères de NMO (Jarius and Wildemann, 2013) définissent le spectre NMO. Ce concept a une utilité médicale car il regroupe des pathologies avec des poussées sévères et invalidantes qui vont donc justifier une thérapeutique rapide, spécifique et plus agressive. Il est aussi intéressant sur le plan scientifique car ces entités ont probablement une physiopathologie commune, plus basée sur la réponse immune humorale et dirigée contre l'AQP4, ce qui constitue un nouvel axe d'investigation pour les neurosciences. Ce concept a cependant des limites car les maladies du spectre NMO ne sont pas toujours bien définies et les frontières avec la SEP ou d'autres entités sont parfois floues. Les anticorps anti-AQP4 ne peuvent être le seul critère pour inclure des maladies dans ce spectre car ils peuvent être absents dans d'authentiques cas de NMO.

2) Epidémiologie

Le champ de la NMO a été élargi avec la découverte des anticorps anti-AQP4. Cependant cette maladie reste rare. Un travail visant à colliger l'ensemble des cas français a estimé la prévalence de la NMO en France à 0,3 pour 100 000 (Collongues et al., 2010). A titre de comparaison la SEP a une prévalence estimée entre 50 et 100 pour 100 000 en France. Au contraire de la SEP, la NMO apparaît plus fréquente dans les pays du Sud et/ou en voie de développement. La prévalence de la NMO avait été évaluée à un taux voisin de la France à 0,45 pour 100 000 au Royaume-Uni (Jacob et al., 2013). Le taux de NMO était plus élevé au Mexique (environ 1 pour 100 000) (Rivera et al., 2008) et dans les Antilles Françaises (3 pour 100 000) (Cabre et al., 2001). La proportion SEP/NMO n'est que de 4 dans les Antilles Françaises (Cabre et al., 2001). En Afrique subsaharienne la prévalence exacte de SEP et de NMO n'est pas connue mais d'après certaines études les cas de NMO seraient même plus fréquents que ceux des SEP classiques (Osuntokun, 1971). Le cas de l'Asie est spécifique car il existe une forte proportion de SEP optico-spinale (16-37% des SEP). Il s'agit de SEP avec des lésions IRM de petite taille mais qui prédominent nettement dans les nerfs optiques et la moelle épinière. Ces cas pourraient être une forme de passage vers la NMO mais ne remplissent cependant pas les critères de NMO notamment du fait de l'absence de myélite transverse et pour certains d'anticorps anti-AQP4 (Kira, 2003).

La prédominance de la NMO dans les pays du Sud et/ou en voie de développement suggère la présence de facteurs défavorisant la SEP et favorisant la NMO dans ces pays. Il pourrait s'agir d'une prédisposition génétique : une corrélation entre la survenue des formes optico-médullaires asiatiques de SEP et l'allèle HLA DPB1*0501 a été retrouvée sans que le lien soit assez fort pour être utile au niveau individuel (Fukazawa et al., 2000). Une étude du système HLA chez des

patients NMO caucasiens n'a pas montré de lien avec HLA DPB1*0501 par rapport à des patients SEP ou sujets sains. Par contre les patients NMO séropositifs pour les anticorps anti-AQP4 avaient une distributions des allèles HLA-DRB1 particulière tandis que les patients NMO séronégatifs avaient une distribution plus proche de la SEP (Zephir et al., 2009). Quelques cas de NMO familiale ont été rapportés mais ils semblent très rares (Yamakawa et al., 2000). Certains facteurs environnementaux ont aussi été incriminés notamment le défaut d'hygiène et/ou l'exposition aux antigènes parasitaires qui orienteraient la réponse immune vers une réaction de type NMO. Il n'y a cependant pas eu de facteur environnemental clairement individualisé.

La NMO concerne plus les femmes : le rapport est estimé à au moins 3 ou 4 femmes pour 1 homme contre 2 pour 1 dans la SEP (Collongues et al., 2010). L'âge de début de la NMO est très variable et peut s'étaler de 4 à 85 ans. Le début est quand même plus fréquent entre 18 et 50 ans mais cette prédominance est moins marquée que dans la SEP. Ainsi, 74% des patients atteints de NMO ont débuté la maladie entre 18 et 50 ans contre 85% dans la SEP (Collongues et al., 2010).

L'association possible de la NMO avec d'autres maladies auto-immunes, notamment les connectivites, mais aussi une myasthénie, un diabète de type I, une maladie de Biermer, une dysthyroïdie, une cirrhose biliaire primitive ou un purpura thrombopénique idiopathique avait déjà été reconnue depuis longtemps. Il était parfois difficile de savoir s'il s'agissait de deux maladies associées en raison d'une susceptibilité envers les maladies auto-immunes ou si c'est l'atteinte du SNC par le lupus érythémateux disséminé ou la maladie de Gougerot-Sjögren qui prenait une forme particulière. Cependant, une étude récente (Pittock et al., 2008) a montré clairement qu'il s'agissait d'un chevauchement entre les deux types de pathologies et des anticorps anti-AQP4 n'ont jamais été retrouvés chez des patients ayant une connectivite sans signes optiques ou médullaires. Jusqu'à 30% des patients NMO manifesteraient des signes d'atteinte dysimmune d'autres organes (Wingerchuk et al., 1999).

3) Signes cliniques

Ils ont été définis par l'analyse de plusieurs cohortes (Cabre et al., 2001; Collongues et al., 2010; de Seze et al., 2002; O'Riordan et al., 1996; Wingerchuk et al., 1999)

Les signes cliniques évoluent de façon récurrente-rémittente c'est-à-dire que les nouveaux signes cliniques s'installent en quelques jours au cours d'évènements appelés poussées comme dans la SEP. Les signes durent quelques jours ou semaines puis peuvent récupérer de façon plus ou moins totale. Il n'y a plus de nouveaux signes cliniques pendant une période relativement longue, généralement quelques mois à quelques années. La fréquence médiane des poussées est en effet de une par an. Une minorité des patients (moins de 20%) a une forme monophasique avec une seule poussée sans récurrence. Une évolution chronique progressive avec apparition lente de nouveaux signes cliniques est exceptionnelle (2% des cas) (Collongues et al., 2010).

Les poussées vont donc prédominer au niveau des nerfs optiques où elles vont donner une baisse d'acuité visuelle d'un voire des deux yeux (névrite optique) et au niveau de la moelle épinière (myélite). Ce type de poussée peut se voir aussi dans la SEP mais celles associées à la NMO sont caractérisées par leur sévérité. Les névrites optiques sont souvent bilatérales avec peu de récupération de la vision. La cécité est fréquente après 2 à 3 poussées. De même la myélite donne une paraplégie voire tétraplégie de pronostic sévère associée à des déficits sensitifs sévères dans le même territoire et des troubles sphinctériens.

La présence de symptômes supplémentaires liés à une atteinte cérébrale (et notamment du tronc cérébral) évoquait auparavant la présence d'une SEP. La détection d'anticorps anti-AQP4 a montré que de tels signes pouvaient se rattacher à une authentique NMO. Il s'agissait notamment de

troubles endocriniens (hyperprolactinémie, hypothyroïdie centrale) (Viegas et al., 2009) ainsi que de hoquets et de vomissements sévères (Misu et al., 2005).

4) Examens d'imagerie

L'apport de l'IRM a été important pour séparer la NMO de la SEP.

En effet chez les patients atteints de SEP, l'IRM médullaire en séquence T2 ou dérivés (FLAIR, STIR) montre plusieurs foyers de démyélinisation de petite taille. Dans la NMO, l'IRM va au contraire retrouver une myélite de grande taille à la fois dans le plan horizontal et vertical. On parle de myélite transverse quand l'inflammation s'étend sur plus de la moitié d'une coupe horizontale de moelle et de myélite étendue si elle s'étend sur plus de 3 niveaux vertébraux en hauteur (de Seze et al., 2002; Wingerchuk et al., 1999). Ces lésions extensives sont présentes dans plus de 80% des NMO et constituent un des items majeurs des critères diagnostiques (cf le chapitre diagnostic) (Wingerchuk et al., 2006a). Elles s'accompagnent souvent d'un œdème important et d'une prise de contraste étendue. Les lésions médullaires évoluent fréquemment défavorablement vers une atrophie et/ou une cavitation ce qui suggère un mécanisme de nécrose. Il existe par contre une minorité de cas où les lésions en T2 régressent nettement en laissant seulement de minimes hyper signaux centromédullaires sur les IRM de contrôle alors que dans la SEP les hypersignaux T2 apparus restent généralement toujours visibles (Cabre, 2007)

L'IRM cérébrale a d'abord été décrite comme normale dans la NMO avant qu'une analyse plus fine retrouve la présence d'hypersignaux assez fréquents en séquence T2/FLAIR (dans environ

50% des cas) Cependant ces hypersignaux sont assez différents de ceux retrouvés dans la SEP. Dans la NMO Il s'agit plutôt de petits hypersignaux de la substance blanche profonde et d'hypersignaux du tronc cérébral et du diencephale notamment au contact du troisième et quatrième ventricules et de l'aqueduc de Sylvius. Dans la SEP ces hypersignaux sont situés au niveau périventriculaire et juxtacortical, sont de taille moyenne, ovalaires et avec un axe perpendiculaire aux ventricules. Moins de 10% des patients NMO ont des hypersignaux cérébraux qui remplissent les critères de Barkhof (Pittock et al., 2006). Des techniques plus avancées (diffusion, volumétrie, transfert de magnétisation, spectrométrie) ont été essayées ces dernières années pour déterminer les répercussions de l'atteinte du cerveau dans la NMO avec des résultats encore contradictoires (cf article 6 et discussion générale).

Du fait de leur taille très petite les nerfs optiques sont mal visualisés à l'IRM. On peut juste confirmer ou non la présence d'une inflammation dans le nerf optique mais pas vraiment dégager des caractéristiques IRM particulières.

5) Examens biologiques

Dans la NMO comme dans la SEP, les paramètres inflammatoires biologiques généraux (vitesse de sédimentation, C réactive protéine, numération-formule sanguine) sont le plus souvent normaux car la réaction auto-immune se cantonne au système nerveux central.

Il existe par contre assez souvent des stigmates biologiques de dysimmunité dans la NMO notamment des anticorps anti-nucléaires. Cela n'est pas surprenant du fait de l'association fréquente de la NMO avec d'autres maladies auto-immunes notamment les connectivites (Jarius and Wildemann, 2013; Pittock et al., 2008).

L'examen biologique le plus rentable pour le diagnostic est bien sûr la recherche de l'anticorps anti-AQP4 qui est très spécifique de la maladie (spécificité >90%) mais moins sensible (sensibilité entre 50 et 90%). Les caractéristiques de cet anticorps seront développées dans le chapitre sur la réaction immunitaire dans la NMO.

L'étude du liquide céphalo-rachidien va montrer souvent des anomalies de la protéinorachie et des cellules. La présence d'un taux de leucocytes supérieur à 50/ mm³ (dans un tiers des cas de NMO) est évocatrice car de tels résultats sont rarement rencontrés dans la SEP (de Seze et al., 2002). Ces leucocytes sont le plus souvent composés de lymphocytes mais la présence de polynucléaires peut se voir et évoque aussi la NMO plutôt que la SEP (Wingerchuk et al., 1999). Un des paramètres les plus importants à rechercher est la présence d'une distribution oligoclonale des immunoglobulines qui reflète une synthèse intrathécale d'immunoglobulines. En effet cette distribution oligoclonale est présente dans 90% des cas de SEP mais seulement 20 à 30% de NMO. De plus une étude longitudinale a montré que, lorsqu'elle était présente, elle avait tendance à disparaître sur les analyses suivantes des patients NMO (Bergamaschi et al., 2004).

6) Autres examens

La présence d'une névrite optique peut être confirmée par les anomalies des potentiels évoqués visuels (augmentation de la latence de l'onde P100). Cela n'a cependant pas beaucoup d'intérêt en cas de névrite optique cliniquement évidente. Les potentiels évoqués visuels sont plus intéressants pour dépister une névrite asymptomatique dans un contexte de myélite isolée et ainsi compléter les critères diagnostiques de NMO.

L'OCT explore aussi le nerf optique mais en mesurant l'épaisseur de la couche des fibres nerveuses rétiniennes et donc en estimant le degré de perte axonale du nerf optique plutôt que de démyélinisation. Il existe une plus grande perte axonale dans la NMO que dans la SEP (Ratchford et al., 2009). On retrouve aussi une perte axonale progressive séquellaire d'épisodes visuels dans la NMO qui peut être quantifiée par l'OCT (Bouyon et al., 2013).

7) Critères diagnostiques

La définition de la NMO a longtemps été peu précise. Auparavant, l'atteinte de la moelle épinière et celle des nerfs optiques devaient être simultanées puis les formes rémittentes ont été acceptées. Pour différencier la NMO de la SEP, les études de séries de patients ont insisté sur la gravité clinique des poussées et l'étendue des myélites à l'IRM. La première version des critères de Wingerchuk requérait la présence d'une névrite optique, d'une myélite et l'absence d'atteinte clinique évidente de l'encéphale ainsi qu'un ou plusieurs critères secondaires (myélite extensive à l'IRM médullaire, IRM cérébrale ne remplissant pas les critères de SEP., pléiocytose du LCR cellules/mm³, névrite optique bilatérale ou sévère ou diminution sévère de la force musculaire d'un ou plusieurs membres) (Wingerchuk et al., 1999).

La découverte des anticorps anti-AQP4 a permis de donner une version révisée plus précise et simple de ces critères (Wingerchuk et al., 2006a) (figure 1). L'intérêt des anticorps anti-AQP4 est notamment de permettre un diagnostic plus précoce de NMO ou de maladie du spectre NMO. En effet si l'on considère la cohorte des patients français, les critères de NMO seraient remplis dans 90% des cas sans avoir besoin de rechercher les anticorps anti-AQP4. Cependant ces 90% regroupent des patients évolués qui ont eu le temps de faire plusieurs poussées dont des myélites extensives et des névrites optiques et donc de remplir les critères de Wingerchuk révisés. Au début de la maladie, après la première poussée, il n'y a souvent qu'une myélite sans névrite optique ou l'inverse et les critères de Wingerchuk révisés ne sont souvent pas remplis. On hésite donc à introduire un traitement immunosuppresseur adéquat et on peut être amené à commencer un traitement immunomodulateur contre la SEP qui peut aggraver la NMO (Sato et al., 2012). La découverte des anticorps anti-AQP4 prédit une évolution vers des poussées graves à type de myélite

extensive et de névrite optique sévères, ne répondant pas bien au traitement de fond de la SEP. Ils sont donc important pour le pronostic de ces formes limites et choisir un traitement (Matiello et al., 2008).

Le spectre NMO inclut selon Wingerchuk (Wingerchuk et al., 2007a):

- Les NMO séropositifs pour les anticorps anti-AQP4
- Les NMO séronégatifs pour les anticorps anti-AQP4 (mais remplissant quand même les critères révisés de Wingerchuk)
- Les névrites optiques sévères ou bilatérales, sans autre atteinte du système nerveux central, séropositives pour les anticorps anti-AQP4
- Les myélites transverses ou extensives, sans autre atteinte du système nerveux central, séropositives pour les anticorps anti-AQP4

Il existe aussi des formes qui se rapprochent de la NMO au niveau de la sévérité des poussées, de leur prédominance dans les nerfs optiques ou la moelle épinière et de l'aspect IRM des lésions mais qui sont négatives pour les anticorps anti-AQP4. Leur inclusion dans le spectre NMO reste à discuter. Ces formes sont :

- Les névrites optiques récurrentes, sévères ou bilatérales, sans autre atteinte du système nerveux central, séronégatives pour les anticorps anti-AQP4
- Les myélites transverses ou extensives récurrentes, sévères, sans autre atteinte du système nerveux central, séronégatives pour les anticorps anti-AQP4

Il s'agit donc d'une notion intéressante pour orienter la thérapeutique mais aux contours encore mal définis.

Figure 1 : Critères diagnostiques révisés de NMO selon Wingerchuk

Table 3 *Proposed diagnostic criteria for neuromyelitis optica (NMO)*

Definite NMO

Optic neuritis

Acute myelitis

At least two of three supportive criteria

1. Contiguous spinal cord MRI lesion extending over ≥ 3 vertebral segments
 2. Brain MRI not meeting diagnostic criteria for multiple sclerosis
 3. NMO-IgG seropositive status
-

Le diagnostic nécessite la présence de tous les critères majeurs et au moins 2 des 3 critères secondaires (Wingerchuk et al., 2006a)

8) Evolution

La NMO se traduit par des poussées de myélite et de névrites optiques sévères qui évoluent fréquemment vers la nécrose. Il est donc logique que de lourdes séquelles soient constatées.

C'est encore plus vrai dans les formes rémittentes où les poussées vont se succéder. Les formes monophasiques ont souvent des poussées plus sévères mais évitent l'accumulation du handicap due

à des poussées répétées. Ainsi la survie des patients monophasiques à 5 ans a été estimée à 90% contre 68% seulement pour les patients à rechutes (Ghezzi et al., 2004; Wingerchuk et al., 1999). Devant une première poussée, le sexe féminin, l'âge élevé et un événement médullaire de moindre sévérité sont en faveur d'une évolution plutôt rémittente que monophasique (Wingerchuk and Weinshenker, 2003). Dans le cas des formes rémittentes les poussées se répètent à une fréquence de 0,65 à 1,3 par an (Cabre, 2007; Collongues et al., 2010) mais cette fréquence pourrait diminuer une fois le cap des deux premières années passé (Collongues et al., 2010).

L'évaluation sur l'échelle EDSS de 0 à 10 permet de suivre l'incapacité fonctionnelle des patients NMO. Dans la cohorte française, 56% des patients NMO avaient atteint un EDSS 6, correspondant à la nécessité de s'aider d'une canne pour marcher environ 100 mètres. Le temps médian pour atteindre ce stade était de 10 ans dans cette cohorte (Collongues et al., 2010) et de 7 ans dans une cohorte italienne (Ghezzi et al., 2004). Le temps médian pour atteindre une baisse sévère de l'acuité visuelle ($\leq 1/10$) était de 11,3 ans (Collongues et al., 2010). Dans une série brésilienne, 41% des patients souffraient d'une cécité bilatérale après 7 ans d'évolution (Papais-Alvarenga et al., 2008). Le taux de décès était très variable de 3 % en France (Collongues et al., 2010) à 41% au Brésil (Papais-Alvarenga et al., 2008) avec des valeurs intermédiaires de mais

aussi 22% aux Etats-Unis (Wingerchuk and Weinshenker, 2003) et 13% en Italie (Ghezzi et al., 2004).

Les facteurs de mauvais pronostic sont tout d'abord la présence d'une forme rémittente par rapport à une forme monophasique. Ils comportent ensuite la fréquence des poussées (Cabre, 2007; Wingerchuk et al., 1999) et le début tardif de la maladie (Collongues et al., 2010). La présence de nombreuses lésions à l'IRM cérébrale était associée à un moins bon pronostic visuel. Les formes de début pédiatriques auraient par contre un meilleur pronostic avec un délai médian de 24 ans pour atteindre l'EDSS 6 (Collongues et al., 2011b).

Ce tableau assez sombre doit être nuancé par la possibilité de formes bénignes (score EDSS ≤ 3 après au moins 10 ans d'évolution de la maladie) mais qui seraient moins fréquentes que dans la SEP (12% dans la NMO versus 22% dans la SEP) (Collongues et al., 2011a).

10) Traitement

Le traitement de la poussée de NMO fait appel à des injections IV de corticoïdes à fortes doses par analogie avec la SEP bien que les preuves de l'efficacité ne soient pas très fortes (Cabre, 2007). En cas d'inefficacité, il est conseillé comme dans la SEP d'essayer des échanges plasmatiques qui semblaient avoir un effet bénéfique chez au moins 50% des patients dans une étude portant sur 15 patients (Kim et al., 2013a). Cet effet est logique vu le mécanisme probablement humoral de la réponse immune.

Il n'y a pas eu non plus d'études contrôlées de grande taille sur le traitement de fond et il faut souvent réduit extrapoler les résultats d'études de taille limitée. Plusieurs immunosuppresseurs semblent cependant montrer un intérêt notamment les corticoïdes per os au long cours (Watanabe et al., 2007), l'azathioprine (Costanzi et al., 2011), le mycophénolate mofétil (Jacob et al., 2009), le méthotrexate (Kitley et al., 2013) et la ciclosporine (Kageyama et al., 2013). Le rituximab apparaît de plus en plus comme une alternative intéressante. L'effet de la mitoxantrone et du cyclophosphamide apparaît plus controversé (Bichuetti et al., 2009; Sato et al., 2012; Yaguchi et al., 2013). Les immunomodulateurs ne semblent avoir aucune efficacité et l'interféron bêta pourrait même aggraver la maladie (Sato et al., 2012).

En l'absence d'étude vraiment comparative entre les médicaments, le traitement doit s'appuyer sur l'expérience du neurologue et sur l'extrapolation des données issues d'autres maladies. Il ne faut pas oublier le traitement symptomatique notamment des déficits moteurs et sphinctériens voire respiratoires qui peuvent apparaître dans les myélites.

B) La réponse immune dans la NMO

1) Une réponse à prédominance humorale

a) Arguments histologiques

L'analyse anatomopathologique du SNC des patients NMO a montré la présence de myélites étendues avec œdème important et évolution fréquente vers le ramollissement, la nécrose et la cavitation ce qui était en accord avec les données IRM. Les substances grise et blanche de la moelle étaient toutes les deux touchées (Mandler et al., 1993).

Un travail histologique important pour caractériser la réponse immune spécifique de la NMO a été réalisé à partir de 82 lésions provenant de 9 patients (Lucchinetti et al., 2002). Les résultats ont confirmé la présence d'une nécrose importante notamment du centre de la moelle épinière avec une perte importante, par un mécanisme non apoptotique, des oligodendrocytes et peu de signes de remyélinisation. Les neurones présentaient des signes de souffrance axonale importante. Les astrocytes n'avaient par contre pas été étudiés de façon approfondie. L'étude de l'infiltrat inflammatoire orientait les auteurs vers une réponse immunitaire à composante principalement humorale. En effet il y avait peu de cellules lymphocytaires CD4+ et CD8+ et au contraire de larges dépôts de compléments C9neo (composé produit à la dernière étape de l'activation du complément) et d'immunoglobulines alors qu'on observe l'inverse dans la SEP. Les dépôts d'Ig (notamment d'IgM) et de complément étaient diffus mais prédominaient dans les zones

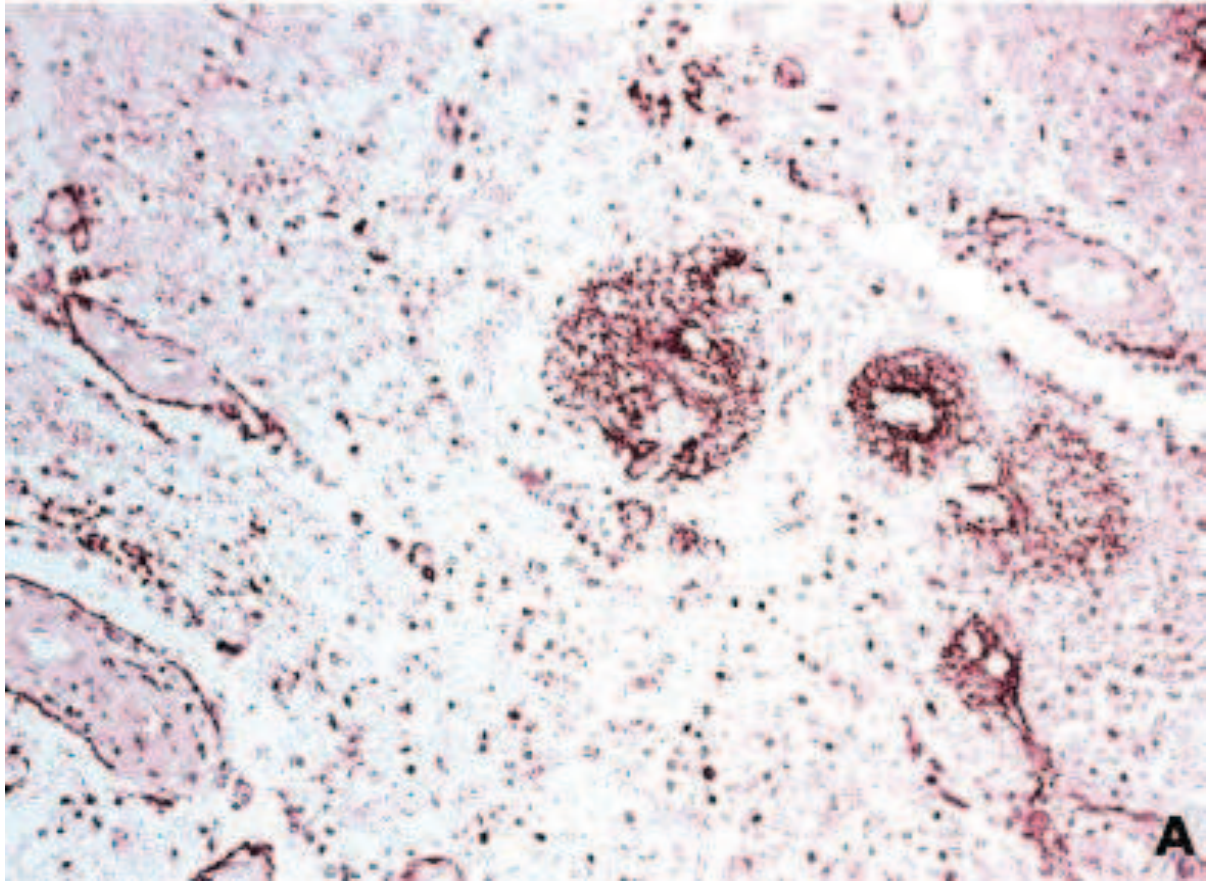
périvasculaires (en anneau et en rosette) (figure 2). On notait des infiltrats de polynucléaires neutrophiles et éosinophiles ce qui est très rare dans la SEP. On retrouvait aussi des dépôts périvasculaires de protéines non spécifiques suggérant une dysfonction marquée de la barrière entre le sang et le SNC. Les vaisseaux apparaissaient épaissis et hyalinisés, ce qui n'est jamais le cas dans la SEP, mais il n'y avait pas d'infiltration des parois vasculaires par des cellules inflammatoires ce qui orienterait vers une vascularite. Les auteurs ont déduit de ces résultats la présence d'une forte réaction impliquant l'immunité humorale au niveau périvasculaire. L'activation du complément et de la toxicité cellulaire médiée par les anticorps (présence de macrophages, de polynucléaires neutrophiles et d'éosinophiles) semblait probable (Lucchinetti et al., 2002).

b) Arguments biologiques

Les arguments biologiques pour une prédominance de l'immunité humorale pourraient être la présence d'anticorps dirigés notamment contre la MOG et la MBP qui avaient été relevés chez certains patients NMO mais cela était aussi le cas de certains patients SEP (Haase and Schmidt, 2001). L'analyse du LCR retrouvait moins d'IgG1 dans la NMO que la SEP ce qui serait associé à une réponse plus humorale (Nakashima et al., 2004).

Le principal argument est en fait la découverte des anticorps anti-AQP4 qui jouent un rôle pathogénique dans la maladie.

Figure 2 : Lésions périvasculaires dans la NMO



*Légende : Dépôts de compléments C9neo en rosette et anneaux autour de vaisseaux épais
(immunohistochimie pour C9neo, x200) (Lucchinetti et al., 2002)*

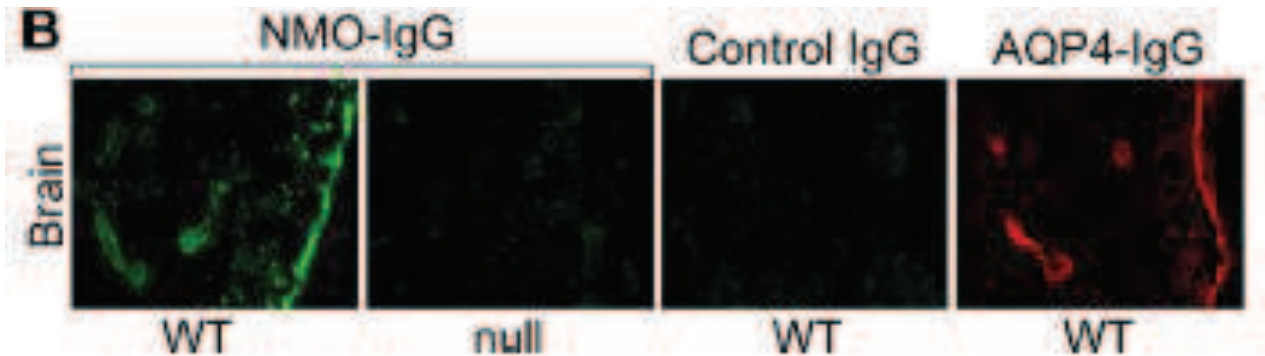
2) Les anticorps anti-AQP4

a) Découverte des anticorps anti-AQP4

Les travaux de Lucchinetti et al. en 2002 suggéraient déjà la présence d'une réaction immunitaire spécifique au niveau de la barrière hémato-encéphalique. La recherche d'anticorps dirigés contre le SNC permit d'individualiser en 2004 une réactivité particulière chez les patients NMO (Lennon et al., 2004b). Des sérums de patients NMO et SEP avaient été mis en contact avec des coupes de SNC et des dépôts d'IgG avaient été observés selon un pattern caractéristique si les sérums étaient issus de patients NMO. Il s'agissait de dépôts le long de la pie-mère et de la substance blanche sous-épendymaire et surtout des vaisseaux de la moelle épinière, du cervelet et du mésencéphale. Ces dépôts se colocalisaient avec les pieds astrocytaires ainsi que la laminine de la matrice extracellulaire au contact de ces astrocytes. La sensibilité de cette réactivité pour le diagnostic de NMO était de 73% et sa spécificité de 91%. Cette réactivité a été notée aussi chez 45% des syndromes à haut risque (myélites extensives ou névrites optiques bilatérales). L'anticorps responsable de ce pattern de réactivité a été baptisé NMO-IgG (Lennon et al., 2004b).

Des travaux ont rapidement été menés pour détecter l'antigène visé par le NMO-IgG et il a été identifié en 2005 comme l'aquaporine 4 (Lennon et al., 2005b). En effet le NMO-IgG se fixait aussi in vitro sur des échantillons de la partie médullaire du rein et des membranes basolatérale des cellules pariétales de l'estomac ce qui suggérait une réactivité contre l'AQP4 présente à la fois dans ces deux structures et les pieds astrocytaires. De plus, les sérums de patients NMO se fixaient autour des vaisseaux d'une coupe de cerveau de souris wild type mais pas d'une souris dont le gène de l'AQP4 avait été supprimé (figure 3). De même ces sérums se fixaient spécifiquement sur des cellules HEK-293 transfectées pour l'AQP4.

Figure 3: La cible du NMO-IgG est l'AQP4



Légende : Il existe une réactivité périvasculaire du sérum de patients NMO envers le cervelet de souris wild type (image de gauche). Cette réactivité disparaît contre une souris KO pour le gène AQP4 (2^{ème} image en partant de la gauche). Elle est aussi absente si le sérum ne vient pas d'un patient atteint de NMO (3^{ème} image). Cette réactivité est identique à celle produite par l'application d'un anticorps artificiel contre l'AQP4 (4^{ème} image) (Lennon et al., 2005b)

b) Caractéristiques de l'AQP4

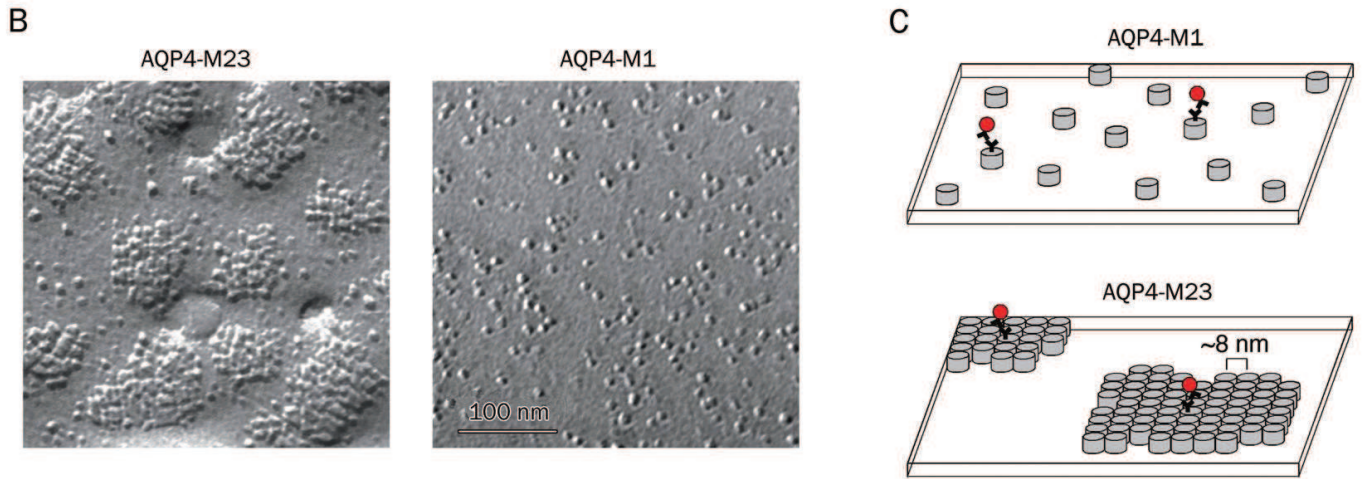
L'aquaporine 4 est le principal canal hydrique du système nerveux central bien que l'aquaporine 1 soit aussi présente. L'entrée de l'eau dans le SNC (environ 0,5 à 1 litre/jour) se ferait principalement par le biais de l'aquaporine 1 en provenance des ventricules cérébraux (ou du canal de l'épendyme pour la moelle épinière). La sortie d'eau se ferait par l'intermédiaire de l'AQP4 surtout vers les capillaires et les espaces sous-arachnoïdiens (Rash et al., 2004).

L'AQP4 est une protéine transmembranaire existant sous deux isoformes différentes issues de l'épissage alternatif du même ARNm. L'isoforme la plus longue (M1) comprend 323 acides aminés et la plus courte (M23) 301 acides aminés car cette dernière est amputée de la partie N-terminale de la protéine et sa séquence commence au 23^{ème} acide aminé de M1. Les deux isoformes s'insèrent dans la membrane plasmique au niveau des pieds astrocytaires périvasculaires ainsi que dans les cellules sous-arachnoïdiennes et sous épendymaires (où les épendymocytes les expriment aussi). Chaque protéine comporte six domaines transmembranaires et forme en son milieu un canal hydrique. Les 2 isoformes M1 et M23 s'associent par des liaisons non covalentes et forment des hétérotétramères. Si les isoformes M23 prédominent à la surface de la cellule des ensembles de plusieurs dizaines voire centaines de tétramères accolés se forment : ce sont les square arrays ou orthogonal arrays of particles (OAP). La présence de l'isoforme M1 tend à inhiber la formation des OAP par l'intervention de la partie N-terminale intracellulaire qui gêne l'assemblage (Rash et al., 2004) (figure 4).

Le rôle principal de l'AQP4 est d'assurer le transport bidirectionnel de l'eau de façon sélective (seul la molécule H₂O peut franchir le canal) mais passive en suivant les gradients osmotiques. Les souris KO pour l'AQP4 développent ainsi un oedème vasogénique plus important lors des situations d'inflammation, ce qui pourrait être lié à une altération de l'évacuation de l'eau vers les vaisseaux. Par contre ces souris développent moins d'œdème cytotoxique dans les

situations d'ischémie ce qui suggère que la diminution du transfert d'eau entre les vaisseaux et les ventricules pourrait être bénéfique dans cette situation. L'AQP4 pourrait jouer aussi un rôle dans la migration cellulaire et l'accolement des cellules entre elles notamment pendant l'embryogénèse et la cicatrisation ainsi que dans la transduction du signal neural (Verkman et al., 2011). Les canaux AQP4 sont aussi fonctionnellement associés aux transporteurs de glutamate EAAT et pourraient donc jouer un rôle dans la recapture du glutamate libéré par les neurones. Cependant les souris KO pour l'AQP4 ne manifestent pas d'anomalie clinique ou histologique évidente si elles ne sont soumises à aucune situation pathologique (Saadoun et al., 2009; Zhou et al., 2008).. L'AQP4 ne joue donc probablement pas un rôle indispensable.

Figure 4 : Organisation de l'AQP4 à la surface des astrocytes



Légende : Les deux images B proviennent d'une microscopie électronique de la surface astrocytaire après fracture par le froid tandis que les deux images C constituent des schémas explicatifs de l'organisation de l'AQP4. Les tétramères d'AQP4 constitués de l'isoforme M1 restent isolés (B à droite et C en haut) tandis que ceux formés d'isoformes M23 s'organisent en structures supramoléculaires étendues et ordonnées les orthogonal arrays of particles (B à gauche et C en bas) (tiré de Verkman et al., 2011)

c) Les anticorps anti-AQP4 sont pathogènes

Le terme d'anticorps anti-AQP4 renvoie à la présence d'une réactivité contre l'AQP4 quelle que soit la méthode employée pour la mettre en évidence alors que le terme NMO-IgG renvoie plutôt à la présence d'une réactivité périvasculaire contre le cerveau en immunofluorescence indirecte. Les tests les plus récents testent la réactivité contre des cellules transfectées pour l'AQP4 et semblent plus sensibles. Nous emploierons donc le terme d'anticorps anti-AQP4 à la place de NMO-IgG (ou anticorps anti-NMO) sauf si nous faisons référence à une publication se basant exclusivement sur l'exploitation des données de l'immunofluorescence indirecte.

Le rôle pathogène des anticorps anti-AQP4 a d'abord été suggéré par la baisse du marquage AQP4 ainsi que GFAP (marqueur des astrocytes) dans les lésions de NMO. Ceci était d'autant plus frappant que ces marquages sont plutôt augmentés dans la plupart des inflammations du SNC notamment la SEP à cause d'une astrogliose réactionnelle (Misu et al., 2007; Roemer et al., 2007). Certaines études retrouvaient aussi un lien statistique entre la concentration d'anticorps anti-AQP4 et la survenue et/ou la gravité des poussées (Hinson et al., 2009; Jarius et al., 2008; Takahashi et al., 2007).

Par la suite, il a été montré que les anticorps anti-AQP4 altéraient *in vitro* l'expression d'AQP4 ainsi que la fonction des astrocytes et de la barrière entre le sang et le SNC sur un modèle de cette barrière en culture. L'introduction d'anticorps anti-AQP4 dans ces cultures conduisait à la mort des astrocytes (Sabater et al., 2009; Vincent et al., 2008). La pathogénicité *in vivo* a été prouvée par l'injection d'anticorps à des animaux (Bradl et al., 2009; Kinoshita et al., 2009; Saadoun et al., 2010). Les animaux injectés avec des anticorps anti-AQP4 développaient plus de lésions que les contrôles. Ces mêmes études ont cependant mis en lumière que les anticorps anti-AQP4 n'expliquaient pas à eux seuls la survenue des lésions car ils ne peuvent développer leur pathogénicité si l'animal est totalement sain. Deux conditions sont requises : il faut que la barrière

hémato-encéphalique soit rendue perméable aux anticorps et qu'il existe déjà une inflammation dans le SNC. En effet l'injection intraveineuse d'anticorps anti-AQP4 aux souris jeunes avec une barrière déficiente ne produit aucune lésion (Bradl et al., 2009). C'est seulement chez les animaux souffrant d'encéphalomyélite aigüe expérimentale (EAE) déclenchée par l'immunisation contre une protéine de la myéline que les anticorps anti-AQP4 pouvaient avoir une action. Chez ces animaux non seulement la barrière hémato-encéphalique est fragilisée mais il existe une inflammation à l'intérieur du SNC qui doit jouer un rôle dans la pathogénicité des anticorps anti-AQP4 par exemple en fournissant des médiateurs inflammatoires ou des auxiliaires.

On peut donc supposer par analogie que chez l'humain la genèse de lésions du SNC nécessite d'autres facteurs que les anticorps anti-AQP4 concourant à l'ouverture de la barrière et à l'activation des anticorps. Le sujet atteint de NMO a en effet en continu des anticorps anti-AQP4 dans son sang même en dehors des poussées. Le cas d'un patient qui avait dans son sang des anticorps anti-AQP4 dix ans avant de débiter sa maladie a même été rapporté (Nishiyama et al., 2009). Les anticorps anti-AQP4 présents à ces moments-là ne produisaient pas de lésions même aux endroits où la barrière hémato-encéphalique est naturellement perméable comme à l'area postrema (Ratelade and Verkman, 2012). Il a été montré aussi que les anticorps anti-AQP4 injectés à la souris pouvaient aller se fixer sur l'AQP4 présent dans l'estomac et le rein mais ne provoquaient pas de lésion (Ratelade and Verkman, 2012).

De façon intéressante Saadoun et al. ont montré que l'injection intrathécale d'anticorps anti-AQP4 (en passant donc au travers de la barrière hémato-encéphalique) chez un rongeur sain pouvait provoquer des lésions seulement en cas de co-injection de complément humain (Saadoun et al., 2010). Le complément pourrait donc être un des facteurs clés de la survenue des lésions de NMO. Cela a été confirmé par l'analyse de cultures cellulaires de moelle épinière et de nerf optique : l'addition d'anticorps anti-AQP4 seuls ne produisait pas de lésion même si l'anticorps se liait à

l'astrocyte mais son association avec du complément ou des cellules cytotoxiques effectrices type macrophage ou polynucléaires donnait des lésions proches de celles de la NMO avec atteinte prédominante des astrocytes (Zhang et al., 2011).

Aucun modèle animal d'EAE n'a pu être obtenu après essai d'immunisation envers l'AQP4. Une équipe a récemment retrouvé une réactivité modérée contre l'AQP4 dans un modèle animal d'EAE provoqué par l'injection de MOG. Cependant il s'agissait d'une réactivité mal définie en ELISA contre de la MOG totale et l'analyse histologique n'a pas été faite : on ne sait donc pas si il y avait des lésions spécifiques de NMO et si cette réactivité jouait un rôle significatif (Wu et al., 2013).

d) Mécanismes d'action des anticorps anti-AQP4

L'épitope précis visé par les anticorps anti-AQP4 fait encore l'objet de débats. On a constaté que les anticorps se fixaient mieux sur les OAP que sur un tétramère isolé et il a été suggéré qu'il s'agissait d'un épitope particulier conformationnel formé par la juxtaposition des tétramères dans les OAP (Nicchia et al., 2009). Cependant, les OAP ne sont pas indispensables à la fixation des anticorps anti-AQP4. La preuve en est que les tests de recherche d'anticorps anti-AQP4 se font souvent sur des cellules transfectées pour l'AQP4 n'exprimant que M1 et ne formant donc pas d'OAP. De même la fixation des anticorps est meilleure sur la protéine native mais possible dans un certain nombre de cas sur la protéine dénaturée, ce qui suggère que l'épitope est en partie conformationnel mais pas totalement (Iorio et al., 2013). En fait d'après une autre étude qui a cloné les lymphocytes B issus d'un patient NMO il existerait chez le même patients différents anticorps reconnaissant chacun un épitope différent de l'AQP4. Certains seraient conformationnels et d'autres

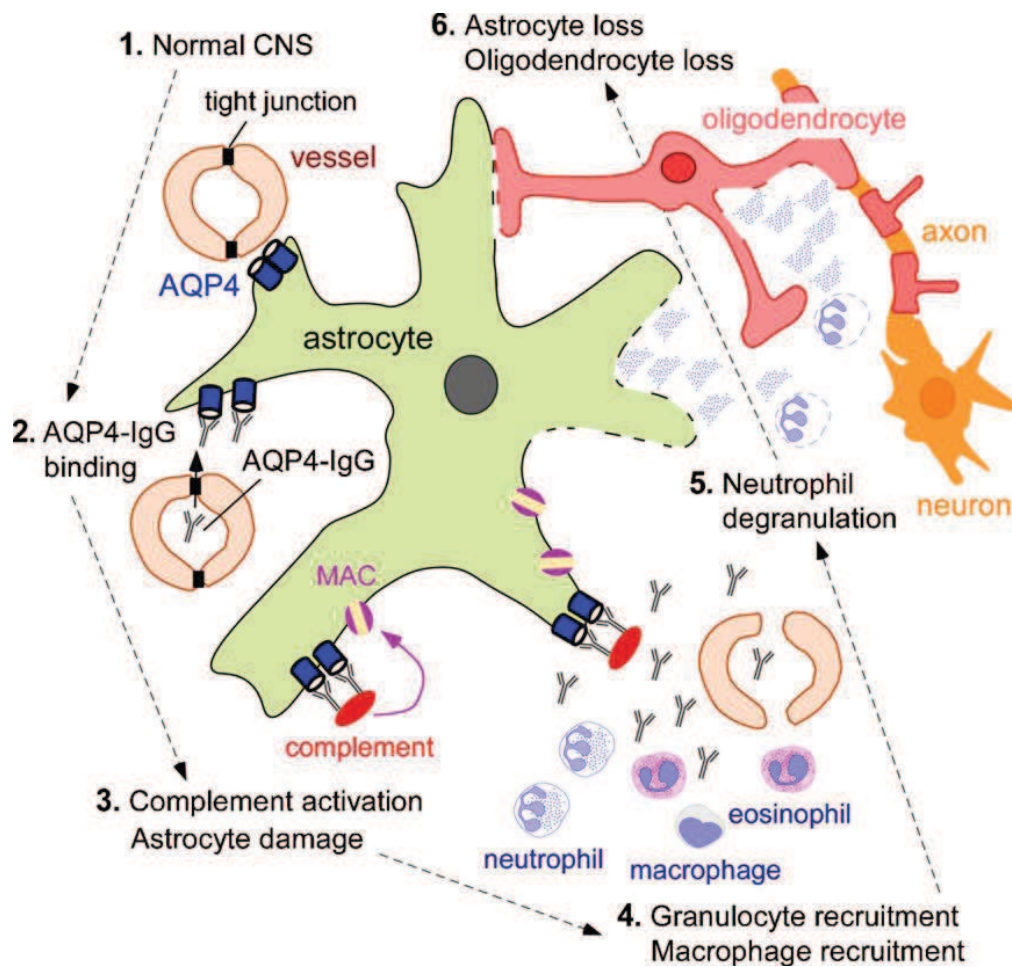
non (Yu et al., 2011). Ces résultats sont à confirmer mais pourraient améliorer la compréhension et le diagnostic de l'interaction des anticorps anti-AQP4 avec leur cible.

Plusieurs hypothèses ont été formulées sur le mécanisme d'action des anticorps:

- Attaque immunitaire et destruction des astrocyte (figure 5)

Les analyses histologiques ont montré des lésions inflammatoires importantes au contact des pieds astrocytaires ce qui suggère qu'une réaction immune sévère a lieu à ce niveau. Il semble donc logique que les cellules portant l'AQP4 soient la cible de cette réaction. Les anticorps anti-AQP4 peuvent provoquer une lyse cellulaire en activant la voie classique du complément qui va produire des complexes d'attaques membranaires (CAM) à l'origine de trous dans la membrane cellulaire et de la nécrose rapide de celle-ci. Les anticorps peuvent aussi guider l'action de cellules cytotoxiques (cellules natural killer, macrophages, polynucléaires neutrophiles et éosinophiles) et être à l'origine d'une toxicité cellulaire médiée par les anticorps (ADCC). On retrouve justement en grande quantité des produits de la voie classique du complément (C9neo) et des cellules pouvant servir d'effectrices aux anticorps (macrophages notamment) (Lucchinetti et al., 2002). Un autre argument est que les lésions histologiques dues aux anticorps anti-AQP4 surviennent chez l'animal uniquement lorsque on ajoute du complément (Saadoun et al., 2010). De même les lésions des anticorps anti-AQP4 et du complément envers une culture de moelle épinière ex vivo sont augmentées par l'introduction de cellules effectrices cytotoxiques (Zhang et al., 2011). L'application des anticorps anti-AQP4 seuls en intrathécal dans le premier cas et sur une culture dans le second cas ne crée pas de lésion.

Figure 5 : Cascade pathologique conduisant à la nécrose astrocytaire dans la NMO



Légende : Dans la NMO, les anticorps anti-AQP4 (produits du fait d'évènements encore inconnus) circulant franchissent par un mécanisme à éclaircir la barrière hémato-encéphalique (2). Cela conduit au recrutement du complément et à la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) produisant des dommages astrocytaires (3). L'activation du complément et les cytokines sécrétées par les astrocytes agressés recrutent des cellules inflammatoires (polynucléaires éosinophiles et neutrophiles et macrophages) qui aggravent l'atteinte de la barrière hémato-encéphalique et augmentent donc l'entrée des anticorps anti-AQP4 et les dégâts astrocytaires(4). La dégranulation des cellules inflammatoires (5) et la dysfonction astrocytaire engendre ensuite des lésions oligodendrocytaires et neuronales(6).

Ces lésions aboutiraient d'abord à une mort par nécrose des astrocytes et seulement secondairement à des lésions oligodendrocytaires et une démyélinisation, voire à des lésions neuronales. Celles-ci seraient dûes soit à l'interruption des fonctions astrocytaires (transfert de l'eau et des nutriments ainsi que des métabolites énergétiques des vaisseaux vers les neurones et les oligodendrocytes et recapture des déchets et des neurotransmetteurs), soit à l'atmosphère dysimmune produite par l'activation des cellules immunitaires et du complément à côté. Ce mécanisme est explicité dans la figure 5 (Ratelade and Verkman, 2012)

D'autres mécanismes ont aussi été proposés (figure 6)

- Altération de la fonction de transfert de l'eau par l'AQP4

La fixation de l'anticorps sur l'AQP4 pourrait éventuellement bloquer le passage de l'eau à travers le canal hydrique ou provoquer une internalisation massive des protéines d'AQP4 qui n'assureraient plus leur fonction comme c'est le cas pour les récepteurs à l'acétylcholine dans la myasthénie. La présence d'un œdème important dans les lésions de NMO est en faveur de cette hypothèse. Cette altération du transfert de l'eau a été montrée sur des modèles de culture cellulaire in vitro mais est difficile à mesurer in vivo (Hinson et al., 2012). Les anticorps sont cependant assez volumineux par rapport à l'AQP4 et certains auteurs ont argué que, pour des raisons d'encombrement allostérique, les anticorps anti-AQP4 ne pourraient former une barrière suffisamment serrée pour obturer les canaux hydriques (Ratelade and Verkman, 2012). Une internalisation de l'AQP4 est bien retrouvée dans les cellules en culture transfectées pour l'isoforme M1 mais est largement incomplète in vivo. En effet la présence d'anticorps anti-AQP4 semble forcer les molécules d'AQP4 sous l'isoforme M23 à se rassembler en OAP de plus en plus grands qui ne sont pas internalisés et restent sur la membrane (Hinson et al., 2012; Ratelade and Verkman, 2012).

Les souris KO pour le gène AQP4 ont de discrètes anomalies qui se manifestent surtout en cas d'infection ou d'autres causes d'œdème vasogénique car cet œdème sera alors plus grave chez ces souris. En dehors de ces situations il n'y a pas de modifications histologiques évidentes du cerveau des souris KO ni de signes cliniques anormaux (Saadoun et al., 2009; Zhou et al., 2008).

L'atteinte des mouvements de l'eau n'est donc pas établie comme un mécanisme majeur dans la NMO.

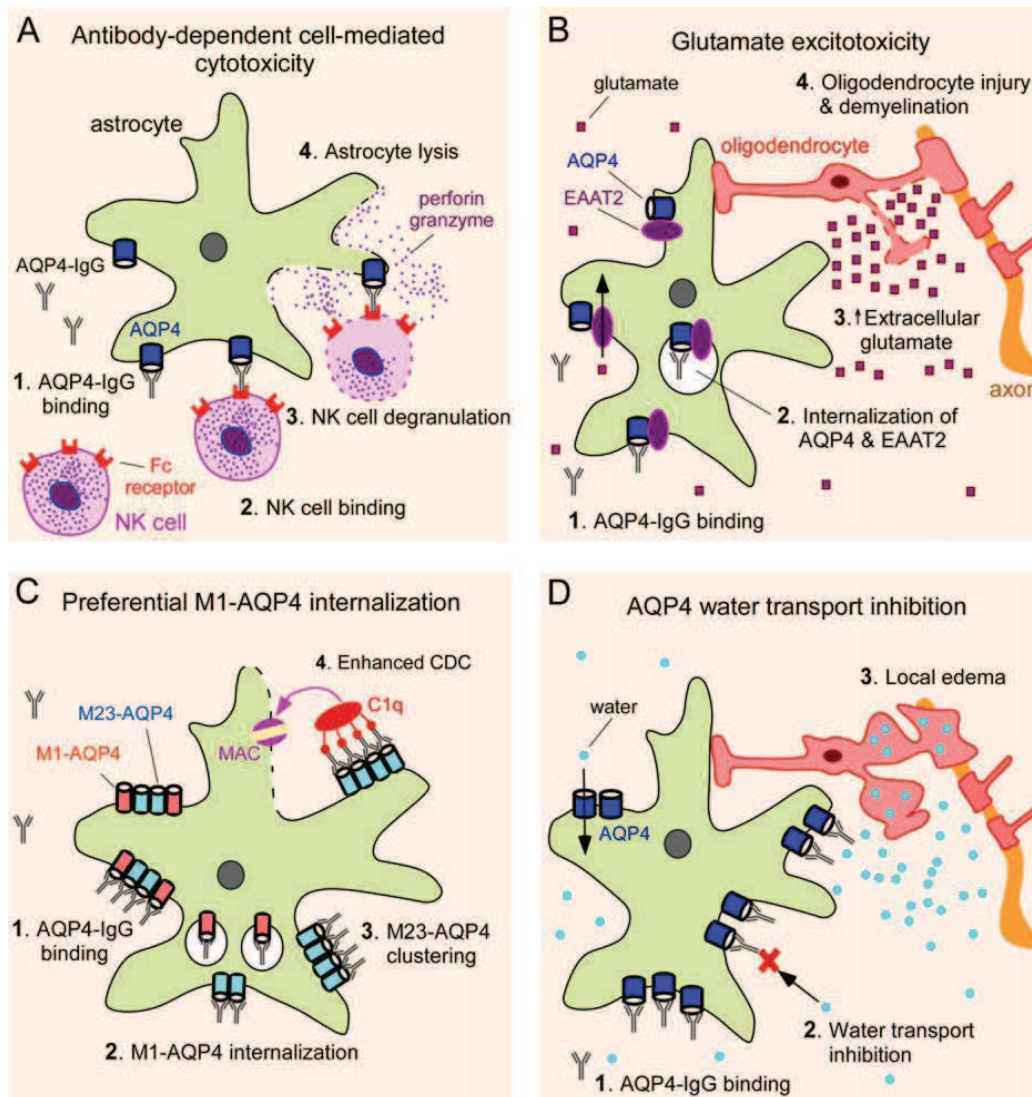
- L'altération de la recapture du glutamate

Le transporteur du glutamate EAAT qui sert à la recapture de ce neurotransmetteur exciteur libéré par les neurones est associé à l'AQP4 dans un complexe macromoléculaire. Une étude a suggéré que l'internalisation de l'AQP4 suite à l'action des anticorps anti-AQP4 pourrait entraîner celle de l'EAAT. Une accumulation du glutamate extracellulaire surviendrait et pourrait entraîner une excitotoxicité (Hinson et al., 2008). Cependant comme on l'a vu, l'internalisation de l'AQP4 est loin d'être systématique et ce mécanisme est controversé (Ratelade and Verkman, 2012).

Le premier mécanisme (destruction immune des astrocytes par nécrose) serait le mécanisme majeur selon Ratelade et Verkman qui contestent ou minimisent l'importance de l'altération du transfert de l'eau, l'internalisation de l'AQP4 et la dysfonction de la recapture du glutamate (Ratelade and Verkman, 2012). Une analyse récente d'échantillons anatomopathologiques confirme l'importance de l'inflammation avec dépôts de complément et dégranulation des cellules inflammatoires. Elle retrouve cependant aussi des lésions où les astrocytes dysfonctionnent ou entrent en apoptose en l'absence de dépôts de complément ou d'invasion majeure par des cellules

inflammatoires ce qui suggère que les mécanismes à l'œuvre varient selon les lésions. Un effet direct des anticorps anti-AQP4 ou d'autres mécanismes encore à découvrir seraient prédominant dans certaines lésions (Misu et al., 2012).

Figure 6 : Différents mécanismes possibles d'atteinte du SNC dans la NMO



Légende :

A : Nécrose des astrocytes par la cytotoxicité cellulaire déclenchée par les anticorps (cellules natural killer (NK)) ou par la cytotoxicité médiée par le complément.

B : L'internalisation de l'EAAT associée à celle de l'AQP4 provoque une accumulation de glutamate et une excito-toxicité

C : Les anticorps anti-AQP4 provoquent une internalisation de l'AQP4 M1 (qui va altérer le transfert de l'eau) et un clustering de M23 qui favorisent l'activation de la cytotoxicité liée au complément

D : Les anticorps se fixent sur l'AQP4 et empêchent le transfert de l'eau notamment sa sortie du SNC et donc favorisent un œdème

e) Intérêt et limites des anticorps anti-AQP4

L'ensemble des publications s'accorde sur la bonne spécificité des anticorps anti-AQP4 (>90%) (Lennon et al., 2004b; Waters et al., 2012). La positivité des anticorps anti-NMO est donc un argument fort pour le diagnostic de NMO ou du moins une maladie du spectre NMO. Comme cela a été mentionné dans le chapitre A, la découverte des anticorps est particulièrement utile lors de la première poussée ou dans les formes frontières de la NMO. Il existe alors de fortes chances que le patient évolue vers une NMO définie ou au moins ait de nouveau des poussées sévères ce qui justifie un traitement immunosuppresseur agressif et contre-indique les immunomodulateurs type interféron bêta. Les patients séronégatifs auraient plus de chance de ne jamais avoir d'autre poussée ou de s'engager dans une maladie de type SEP (Kim et al., 2013b; Matiello et al., 2008; Sato et al., 2012).

La découverte de la positivité des anticorps anti-AQP4 a moins d'intérêt pour le diagnostic positif si la maladie est déjà évoluée car les critères de NMO sont souvent déjà remplis (Collongues et al., 2010). Elle permet quand même d'avoir un critère supplémentaire objectif pour asseoir définitivement le diagnostic. En ce qui concerne le pronostic des formes déjà chroniques, celui des formes séropositives serait un peu plus défavorable. C'est cependant moins clair que après une première poussée (Cabrera-Gomez et al., 2009; Jarius et al., 2012). Certaines études suggèrent que les patients avec des anticorps anti-AQP4 positifs auraient un pronostic plus péjoratif que ceux sans anticorps anti-AQP4 (Jarius et al., 2012; Lai et al., 2011) mais d'autres études ne retrouvaient pas de différence (Alvarenga et al., 2012).

La négativité des anticorps anti-AQP4 apporte moins de renseignements valables que la positivité. En effet la sensibilité de la recherche d'anticorps anti-AQP4 est médiocre et très variable entre les études de 33% à 95% (Cabre et al., 2009; Cabrera-Gomez et al., 2009; Lennon et al., 2004b; Waters and Vincent, 2008; Waters et al., 2012). Cette variabilité pourrait être due à

l'existence de nombreux tests avec des sensibilités variables. Le test originel utilisant l'immunofluorescence indirecte pour détecter le NMO-IgG a été remplacé progressivement par d'autres tests recherchant des anticorps dirigé contre l'AQP4 en ELISA, par immunoprécipitation ou par la mesure de la réaction contre des cellules transfectées pour AQP4. Ce dernier test semble le plus performant avec une sensibilité de 77% d'après l'étude comparative la plus récente (Waters et al., 2012). Il existe cependant même avec ce test une proportion significative de patients NMO sans anticorps anti-AQP4 détectables. La négativité de la recherche des anticorps anti-AQP4 n'élimine donc pas la possibilité d'une NMO authentique.

Il n'est toujours pas clair si la physiopathologie des cas séronégatifs pour les anticorps anti-AQP4 implique au même degré l'AQP4 et les astrocytes ce qui justifiera de plus amples recherches. Récemment, la présence d'anticorps sériques dirigés contre la MOG a été signalée dans les formes séronégatives (Kitley et al., 2012). Ce travail retrouvait ces anticorps chez 4 patients parmi 27 sujets NMO négatifs pour les anticorps anti-AQP4 alors qu'aucun des 44 patients NMO séropositifs pour les anticorps anti-AQP4 ne présentaient d'anticorps anti-MOG. De même Mader et al. ont retrouvé la présence d'anticorps anti-MOG dans le LCR chez 2 patients parmi 2 sujets NMO séronégatifs étudiés tandis que ils étaient présents seulement chez 1 patients NMO séropositif parmi 43 étudiés.

3) Le suivi longitudinal de la réaction immune

Les données disponibles sur l'évolution dans le temps des marqueurs immunitaires, leur relation à l'activité de la maladie et leur utilité médicale ont été passées en revue dans l'article suivant

Article 1 : Chanson JB, de Seze J, Eliaou JF, Vincent T. Immunological follow-up of patients with neuromyelitis optica: Is there a good biomarker? *Lupus*.

2013;22(3):229-32. (droits réservés pour la 3^{ème} partie)

Lupus

<http://jup.sagepub.com>

Immunological follow-up of patients with neuropsychiatric lupus: is there a good alternative?

J. B. Chiriac, J. de Maess, J. P. Hainaut and T. Koenig

Lupus 2012 21: 428 originally published online 21 November 2012
DOI: 10.1177/0961203912461766

The online version of this article can be found at
<http://jup.sagepub.com/nid/428461766>

Powered by



<http://jup.sagepub.com/home>

Additional services and information for *Lupus* can be found at:

Email Alerts: <http://jup.sagepub.com/alerts>

Subscriptions: <http://jup.sagepub.com/subscriptions>

Reprints: <http://sagepub.com/journalsReprints.nav>

Permissions: <http://sagepub.com/journalsPermissions.nav>

Re Version of Record - Feb 08, 2013

Original Version of Record - Nov 21, 2012

What is This?

REVIEW

Immunological follow-up of patients with neuromyelitis optica: Is there a good biomarker?

J-B Chanson^{1,2}, J de Seze^{1,2}, J-F Elieou³ and T Vincent²

¹Département de Neurologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France; ²Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives (LINC), Université de Strasbourg-CNRS, France; and ³Département d'Immunologie, Hôpital Saint-Bas, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, France

A serial assessment of biomarkers related to disease activity could be clinically useful in some autoimmune diseases. Neuromyelitis optica (NMO) is a severe inflammatory disease of the optic nerves and spinal cord that can be associated with lupus erythematosus, Sjögren syndrome or myasthenia gravis. In this review, we discuss the existing data on the use of biomarkers of disease activity in NMO. A specific and pathogenic antibody (Ab) directed against aquaporin 4 (AQP4) was recently discovered in this disease. The relapses were frequently accompanied by a rise and immunosuppressive therapy by a decrease in serum anti-AQP4 Ab concentrations. However, this association is not strong enough to justify treatment changes based only on anti-AQP4 Ab level variations. This parameter might be helpful as a longitudinal biomarker but only if a threshold indicating a relapse and justifying a switch in therapy can be established. A link between disease severity and serum cytotoxicity against AQP4-expressing cells was proposed but has not yet been confirmed. Finally, the assessment of T cell immunity against AQP4 and specific cytokines could be future directions for research. *Epilepsia* (2012) 53, 229–232.

Key words: Neuroimmunity; neuromyelitis optica; anti-aquaporin 4 antibody; biomarker; follow-up

Introduction

The assessment of immunological biomarkers plays an important role in the diagnosis of many inflammatory autoimmune diseases. A link between these biomarkers and disease activity was found in some diseases, such as systemic lupus erythematosus and granulomatosis with polyangiitis.¹ However, it is still debated whether the follow-up of these biomarkers could reliably predict the disease course and be helpful for adapting therapy.

Devic's neuromyelitis optica (NMO) is an inflammatory disease of the central nervous system (CNS) that is characterized by the severity of relapses and their predominance in spinal cord and optic nerves.² The association of NMO with systemic lupus erythematosus, Sjögren syndrome

or myasthenia gravis is not rare.³ An immunosuppressive therapy must be administered as soon as possible and adapted according to the patient's response.⁴ In view of the severity of the prognosis and the aggressiveness of the treatments, a reliable biomarker is crucial for diagnosing the disease and adapting therapy. Recently, a specific marker named NMO-IgG was discovered in NMO, directed against aquaporin 4 (AQP4), an astrocytic water channel.^{5,6} The pathogenic role of anti-AQP4 antibody (Ab) was demonstrated *in vivo* by passive transfer experiments in animal models.^{7–9} This Ab demonstrated an excellent specificity (>95%) and a sensitivity of between 30% and 90% and was recently included in the revised diagnostic criteria for NMO.^{10,11} After a first clinical event not yet fulfilling the NMO diagnosis criteria, the presence of anti-AQP4 Abs is indicative of a high risk of conversion to NMO and justifies an immunosuppressive therapy.^{4,10,12}

These results raised the hope that a follow-up of the anti-AQP4 Ab concentration could allow relapses to be predicted and treatment to be

Correspondence to: Thierry Vincent, Département d'Immunologie, Hôpital Saint-Bas, CHU de Montpellier, 80 Avenue Augustin Fliche, 34293 Montpellier, Cedex 3, France.

Email: t-vincent@chu-montpellier.fr

Received 18 October 2012; accepted 18 October 2012

adapted in NMO. In this review, we will discuss existing data about the usefulness of anti-AQP4 Ab and other immunological parameters as potential biomarkers of disease activity for the follow-up of NMO patients.

Anti-AQP4 Ab serum concentration

A first study used the indirect immunofluorescence technique to assess and monitor the presence of NMO-IgG in serial serum samples of four NMO patients. Abs were found more frequently during periods of active disease and became undetectable during the stable disease phase following treatment, suggesting a correlation with disease activity, but no statistical test was performed.¹³ Quantitative assays were later developed allowing a more accurate measurement of Ab concentrations. Specific reactivity against AQP4 was measured in two studies, with six¹² and eight¹⁴ patients, respectively. A quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test was also used on serial samples from 38 patients.¹⁵ These three articles reported that anti-AQP4 Ab concentration decreased in the serum after administration of an immunosuppressive therapy (azathioprine, cyclophosphamide or rituximab) and this decrease was associated with less frequent relapses. The decrease of anti-AQP4 Ab concentration under rituximab therapy was confirmed by other studies that also reported a mild increase just after the first administration, likely caused by B-cell activating factor (BAFF) induction following B-cell depletion.^{16,17} A rapid decrease after high-dose intravenous methylprednisolone was also reported.¹² The two studies with the largest number of patients found that anti-AQP4 Ab serum concentration correlated with clinical disease activity and that the onset of relapses was paralleled by a rise in serum Ab concentration.^{14,15} Furthermore, high anti-AQP4 Ab titers were associated with large cerebral lesions, extensive myelitis and complete blindness in at least one eye.¹² However, some important limitations should be pointed out. Many studies found no statistically significant correlation between Ab serum levels and disease activity.^{12,15} No clear threshold value suggesting the onset of relapses could be determined because of the high inter- and intra-individual variability.^{12,14,15} An increase in Ab concentration did not always lead to a clinical relapse, and some relapses occurred while the anti-AQP4 Ab level remained relatively low. Moreover, anti-AQP4 Ab concentrations were not correlated with the

residual functional impairment or the frequency of relapses.^{14,15} We measured the anti-AQP4 Ab serum concentration in serial samples from 10 NMO patients followed at our neurology department and found no statistical correlation with the presence of relapses or the level of clinical impairment (poster P561 of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) Congress in 2011). As previously described, an increase in anti-AQP4 Ab concentration sometimes occurred without clinical changes and, conversely, disease worsening was often not accompanied by an increase in anti-AQP4 Ab levels. Hence, we concluded that at the individual level, changes in anti-AQP4 Ab serum concentration are not suitable as a means of predicting the onset of a relapse and adapting the treatment accordingly.

Complement-mediated cytotoxicity

It has been demonstrated that anti-AQP4 Abs are predominantly IgG1 and can induce complement-mediated cytotoxicity to AQP4-expressing cells.¹⁸ A study including 12 NMO patients showed higher levels of cytotoxicity in the serum of patients with severe relapses compared to those with mild relapses.¹⁹ Interestingly, the study found no significant difference between NMO-IgG titers in patients with mild versus severe attacks, which suggests that Ab concentration and complement-mediated cytotoxicity might evolve independently during disease evolution. However, another study including 14 patients and using a quantitative cell-based technique found a marked correlation between anti-AQP4 Ab serum concentration and serum cytotoxicity. The latter parameter was not better correlated with relapses.²⁰ Accordingly, in the 10 patients included in our study, we found no particular correlation between the level of serum cytotoxicity and the presence of relapse or clinical impairment. The level of serum cytotoxicity was highly correlated with the anti-AQP4 Ab serum concentration but neither of these parameters reliably predicted the relapses (poster P561 of the 2011 ECTRIMS Congress).

Other avenues of research

The presence of anti-AQP4 Ab in cerebrospinal fluid (CSF) was demonstrated in some studies.^{1,2,21} However, tolerance breakdown against AQP4 is thought to occur in the periphery, and anti-AQP4 Ab concentrations are usually much higher in the serum than in the CSF.¹⁷ Rarely, anti-AQP4 Abs have been described in the CSF of seronegative

patients,²² but this seems to have been an exceptional finding.²³ Nevertheless, pathogenic processes occur in the CNS, and animal models have clearly demonstrated that peripheral Abs have to cross the blood-brain barrier to be pathogenic.⁹ Accordingly, high anti-AQP4 Ab concentrations in the CSF seem to be associated with relapses, high serum anti-AQP4 Ab concentrations and blood-CSF barrier dysfunction.^{21,23} Interestingly, Dujmovic et al. showed that CSF might be more relevant than serum for the follow-up of anti-AQP4 Ab in NMO patients.²³ In this study, the association between anti-AQP4 Ab level changes and the onset of a relapse appeared stronger in CSF than in serum, according to the results of paired CSF-serum samples from 12 patients.²³ However, the usefulness of CSF studies in NMO follow-up will likely be limited by the low feasibility of repeated lumbar punctures.

Factors other than anti-AQP4 Ab, such as auto-reactive T cells, are likely to play a role in NMO pathophysiology, especially — though not exclusively — in seronegative patients.^{24,25} The presence of a T-cell reactivity against AQP4 has been demonstrated in NMO, and its assessment might be interesting but difficult to manage routinely as a biomarker.²⁶ Interleukin (IL)-17 secreting T cells (Th17 and IL-17-secreting CD8+) T cells appear to be especially involved in NMO. The assessment of the serum levels of IL-17 and T-cell-polarizing cytokines (IL-6, IL-21 and IL-23) could be helpful for the diagnosis of NMO,²⁷ but the relationship with disease activity and their ability to predict the disease course remain to be evaluated.

Finally, glial fibrillar acidic protein (GFAP) and S100 β are released into the CSF during NMO relapses, and their CSF concentrations are correlated with relapse severity.²⁸ A rise in serum GFAP concentration was also reported in NMO versus multiple sclerosis, especially during relapses,²⁹ but a larger study found these changes were not statistically significant.³⁰ Whether the increase of GFAP or S100 β levels in CSF or serum could precede the clinical onset of relapses and be used as a predictive tool has not yet been evaluated.

Conclusion

Anti-AQP4 Ab is now well recognized as an important element in diagnosing the disease and establishing a prognosis after a first clinical event.^{6,10} Some studies have suggested a link

between the concentration of this Ab in the serum and disease activity, especially a decrease during an immunosuppressive treatment and an increase during a relapse. However, this correlation was not strong enough to predict unequivocally the future course of the disease. Thus, according to the existing data, a switch in therapy based only on anti-AQP4 Ab level changes does not seem justified. Further clinical studies with a larger number of patients are needed to determine whether a reliable threshold predicting the onset of a relapse or a poor response to therapy can be established. Other avenues of research, such as T-cell immunity, cytokines and markers of astrocytic damage, also require further investigation to demonstrate their clinical relevance.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- 1 Kallenberg CG, Sagdman CA, Rosztka H, Björk M, Limburg PC. Quantitation of autoantibodies in systemic autoimmune disease: Clinically useful? *Lupus* 2006; 15: 397-402.
- 2 de Souza J, Lebrun C, Storchova T, Favey D, Chatai M, Vennart P. Is Devic's neuromyelitis optica a separate disease? A comparative study with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2001; 9: 521-523.
- 3 Pittock SJ, Lennon VA, de Souza J, et al. Neuromyelitis optica and non-organ-specific autoimmunity. *Arch Neurol* 2008; 65: 78-81.
- 4 Colosonov N, de Souza J. Current and future treatment approaches for neuromyelitis optica. *Ther Adv Neurol Disord* 2011; 4: 110-121.
- 5 Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, et al. IgG marker of optic spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med* 2003; 192: 473-477.
- 6 Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: Distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 2004; 364: 2106-2112.
- 7 Real M, Min T, Takahashi T, et al. Neuromyelitis optica: Pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. *Ann Neurol* 2009; 66: 636-641.
- 8 Kinoshita M, Nakatani Y, Kuroda T, et al. Neuromyelitis optica: Passive transfer to rats by human immunoglobulin. *Stroke* 2009; 40: 623-627.
- 9 Storchova T, Waters P, Ball BA, Vincent A, Vitman AS, Papadopoulos MC. Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice. *Brain* 2008; 131: 348-361.
- 10 Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 2008; 66: 1485-1490.

- 11 Waters PL, McKean A, Lette MJ, et al. Serologic diagnosis of NMOSD: A multicenter comparison of aquaporin-4-IgG assays. *Neurology* 2012; 78: 665-671. discussion 669.
- 12 Takahashi T, Fujihara K, Nakashima I, et al. Anti-aquaporin-4 antibody is involved in the pathogenesis of NMOSD: A study on antibody titer. *Brain* 2007; 130: 1235-1241.
- 13 Watsonstock-Clairman B, Miller C, Yeh E, et al. Neuromyelitis optica immunoglobulins as a marker of disease activity and response to therapy in patients with neuromyelitis optica. *Mult Scler* 2008; 14: 1061-1067.
- 14 Jarius S, Albrecht-Rohr F, Waters P, et al. Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica. *Brain* 2008; 131: 3070-3080.
- 15 Kim W, Liu JE, Li XF, et al. Quantitative measurement of anti-aquaporin-4 antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay using purified recombinant human aquaporin-4. *Mult Scler* 2012; 18: 574-586.
- 16 Polkoby HL, Krumbholz M, Berthels A, et al. Long-term follow-up of patients with neuromyelitis optica after repeated therapy with rituximab. *Neurology* 2011; 76: 1308-1315.
- 17 Nakashima I, Takahashi T, Cao BA, et al. Transient increase in anti-aquaporin-4 antibody titer following rituximab treatment in neuromyelitis optica, in association with elevated serum BAFF levels. *J Clin Neurosci* 2011; 18: 997-998.
- 18 Hinson SR, Pittock SJ, Lucchinetti CF, et al. Pathogenic potential of IgG binding to water channel/extracellular domain in neuromyelitis optica. *Neurology* 2007; 68: 2221-2231.
- 19 Hinson SR, McKean A, Fryer JP, Aphivathanakul M, Lachy VA, Pittock SJ. Prediction of neuromyelitis optica attack severity by quantitation of complement-mediated injury to aquaporin-4-expressing cells. *Arch Neurol* 2009; 66: 1164-1167.
- 20 Kalkner SR, Hsu Z, Srivastava R, et al. Quantification and functional characterization of antibodies to water aquaporin 4 in neuromyelitis optica. *Arch Neurol* 2010; 67: 1200-1208.
- 21 Jarius S, Franciosa D, Paul F, et al. Cerebrospinal fluid antibodies to aquaporin-4 in neuromyelitis optica and related disorders: Frequency, origin, and diagnostic relevance. *J Neuroinflammation* 2010; 9: 52.
- 22 Klawnsky EC, Alvarez E 3rd, Xu J, et al. NMOSD-IgG detected in CSF in seronegative neuromyelitis optica. *Neurology* 2009; 72: 1100-1101.
- 23 Dajmovic J, Masler S, Schanda K, et al. Temporal dynamics of cerebrospinal fluid anti-aquaporin-4 antibodies in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders. *J Neuroimmunol* 2011; 234: 124-130.
- 24 Muehl E, Garbschtan I, Karaszi D, Brand D, Hiller N, Muehl Z. Seronegative neuromyelitis optica: Improvement following lymphocytapheresis treatment. *Mult Scler* 2008; 14: 865-867.
- 25 Jarius S, Raymachi K, Wildemann B, et al. Contracting disease pattern in seropositive and seronegative neuromyelitis optica: A multicenter study of 175 patients. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 14.
- 26 Varrin-Deguer M, Spreux CM, Schulte-Topphoff U, et al. Aquaporin-4-specific T cells in neuromyelitis optica exhibit a Th17 bias and recognize Glutathione ABC transporter. *Ann Neurol* 2012; 72: 53-64.
- 27 Wang HH, Dai YQ, Qiu W, et al. Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. *J Clin Neurosci* 2011; 18: 1113-1117.
- 28 Mito T, Takano R, Fujihara K, Takahashi T, Sato S, Hiyama Y. Marked increase in cerebrospinal fluid glial fibrillary acidic protein in neuromyelitis optica: An astrocytic damage marker. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009; 80: 575-577.
- 29 Suzuki M, Petzold A, Phan GT. The use of serum glial fibrillary acidic protein measurements in the diagnosis of neuromyelitis optica spectrum optic neuritis. *PLoS One* 2011; 6: e23469.
- 30 Suzuki M, Varrin MM, Hsu Z, et al. Serum GFAP levels in optic neuropathy. *J Neurol Sci* 2012; 317: 117-122.

C) Objectifs

La compréhension de la NMO a fait de grand progrès dans les dernières années notamment par la découverte d'un anticorps spécifique qui améliore les possibilités diagnostiques et donne de nouvelles pistes physiopathologiques. Cependant certaines caractéristiques de la réponse immune et de son interaction avec le système nerveux central sont encore inconnues.

L'objectif de cette thèse a été de développer une recherche translationnelle et appuyée sur des collaborations avec des équipes expertes dans des domaines précis pour améliorer la connaissance de la réponse immunitaire dans la NMO. Ses conséquences sur le système nerveux central devaient aussi être mieux définies.

Nous avons d'abord développé et étudié un modèle animal de NMO en laboratoire afin de mieux comprendre la physiopathologie d'une inflammation optico-médullaire. Cette étude avait pour but de dégager des enseignements transposables à la NMO humaine et de servir à tester des hypothèses venues des études humaines.

Nous avons aussi exploité la cohorte importante de patients NMO suivis à Strasbourg pour améliorer la connaissance de la réaction immune dans la NMO elle-même mais aussi de ses répercussions sur le SNC en suivant plusieurs axes : les anomalies métaboliques sériques, la mesure des changements dans le volume cérébral et les symptômes fonctionnels et le handicap.

II) LA REPONSE IMMUNE DANS UN MODELE ANIMAL

Article 2: Collongues N, **Chanson JB**, Blanc F, Steibel J, Lam CD, Shabbir A, Trifilieff E, Honnorat J, Pham-Dinh D, Ghandour MS, de Seze J. The Brown Norway opticospinal model of demyelination: does it mimic multiple sclerosis or neuromyelitis optica? Int J Dev Neurosci. 2012;30(6):487-97.

(l'article a été supprimé de la version de diffusion pour cause de droits d'auteurs)

COMMENTAIRES

1) Résultats principaux

L'immunisation des rats Brown Norway par la MOG induit de façon reproductible une inflammation du SNC prédominant sur les nerfs optiques et la moelle épinière. J'ai étudié dans les années 2008-2010, en collaboration avec Nicolas Collongues, ce modèle pour dépister les similitudes et les différences avec la NMO humaine. L'étude de l'expression de l'AQP4 et de la GFAP a permis de montrer une évolution similaire à celle de la NMO au moins dans les nerfs optiques. L'utilisation de l'IRM a donné de nouvelles pistes notamment l'apparition au début de la maladie clinique d'hypersignaux transitoires au niveau cérébral périventriculaire. L'analyse de la réponse immunologique a confirmé la présence d'une réponse immune humorale mais sans anticorps anti-AQP4.

2) Problématique des modèles animaux de NMO

Un modèle animal est « un modèle permettant l'étude de données de référence sur la biologie ou le comportement, ou chez lequel on peut étudier un processus pathologique spontané ou induit, celui-ci ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain ou d'autres espèces animales » (American National Research Council Committee on Animal Models for Research and Aging).

Dans le cadre de la NMO, on ne dispose pas de modèle animal spontané. On va donc chercher à induire chez l'animal une maladie ayant le maximum des caractéristiques connues de la NMO c'est-à-dire :

- Une attaque auto-immune sévère du SNC
- Une prédominance optico-médullaire des lésions
- Une réponse immune à prédominance humorale
- La présence d'anticorps anti-AQP4
- Des anomalies histologiques similaires à celles de la NMO avec notamment une inflammation périvasculaire et sous piaie, une diminution des concentrations de l'AQP4 et de la GFAP (Misu et al., 2007; Roemer et al., 2007), des dépôts d'Ig et de complément périvasculaires et/ou la présence de macrophages ou de polynucléaires périvasculaires (Lucchinetti et al., 2002)

- Des anomalies IRM similaires à celles de la NMO avec myélite transverse et extensive, névrite optique bilatérale et anomalies cérébrales périventriculaires

Les modèles animaux utilisés dans le domaine des maladies auto-immunes du SNC sont principalement les EAE. Il s'agit d'une inflammation du SNC induite chez un animal (le plus souvent un rongeur) par l'injection d'un composé de la myéline (MOG, MBP, PLP) ou d'un broyat de cerveau non spécifique accompagné le plus souvent d'un stimulant immunitaire (adjuvant de Freund). Le type et la localisation de l'inflammation varie selon l'espèce et la souche d'animal employées et le composé immunogène injecté. De façon intéressante, Storch et al. (1998) avaient comparé plusieurs types d'EAE et montré que l'EAE provoquée par l'injection de MOG chez le rat Brown Norway femelle est celle qui a le profil le plus similaire à la NMO. En effet il existait une atteinte sévère du SNC à prédominance optico-médullaire. De plus l'analyse histologique montrait des stigmates d'immunité humorale avec des dépôts d'immunoglobulines et des éosinophiles périvasculaires comme ce qui a été mis en évidence dans la NMO (Storch et al., 1998). Des études récentes ont confirmé que les EAE produites par l'injection de MOG sont celles qui mobilisent le plus le système immunitaire humoral (Bettelli, 2007). De même parmi les différentes souches de rat, les rats Brown Norway sont ceux chez lesquels les réactions humorales sont les plus marquées (Fournie et al., 2002).

Nous nous sommes donc attachés à compléter l'analyse de ce modèle animal. Il semble en effet être le modèle le plus proche de la NMO et donc le plus approprié pour comprendre les mécanismes de l'inflammation optico-médullaire.

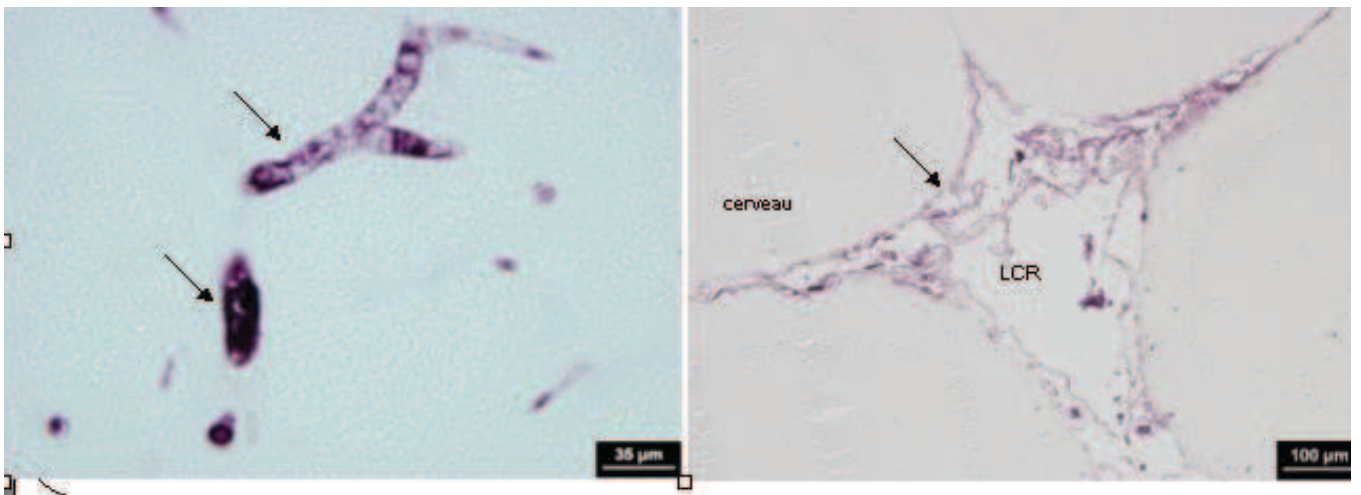
3) Nouvelles données histologiques

L'analyse de l'évolution de l'inflammation dans le temps nous a permis de montrer qu'elle commençait au niveau périvasculaire et sous-pial comme dans la NMO avec un marquage ED1 apparaissant environ à J25 après l'injection de MOG (figure 7). Il se produisait ensuite, comme dans la NMO, des dépôts d'immunoglobulines et de complément suggérant une implication de l'immunité humorale. Cependant, contrairement à la NMO, ce dépôt se faisait le long des plaques de démyélinisation plutôt que près des pieds astrocytaires périvasculaires (Storch et al., 1998). Ce pattern évoque donc une réaction envers un antigène myélinique (MOG) plutôt qu'astrocytaire.

L'analyse du marquage AQP4 et GFAP (marqueur des astrocytes) suggère une physiopathologie variable selon les zones. Il existait une atteinte astrocytaire nette dans les nerfs optiques au début de l'attaque immune avec diminution des marqueurs AQP4 et GFAP mais sans passer par une apoptose des astrocytes. On notait que le marquage AQP4 réaugmentait moins vite que le marquage GFAP après le début de l'attaque immune. La moelle épinière ne souffrait pas de perte majeure des astrocytes (pas de baisse du marquage global AQP4 ou GFAP) mais on observait tout de même une apoptose de nombreux astrocytes. Ils étaient donc aussi touchés mais de manière différente que dans les nerfs optiques. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec les travaux anatomopathologiques récents chez l'humain qui suggèrent que plusieurs mécanismes de lésion astrocytaires sont à l'œuvre dans la NMO (Misu et al., 2012). Certaines lésions seraient composées d'une nécrose cellulaire astrocytaire liée à l'attaque par le complément et/ou les

polynucléaires/macrophages tandis que dans d'autres lésions une apoptose des astrocytes sans dépôts de complément ni invasion par des cellules inflammatoires serait constatée.

Figure 7 : Marquage périvasculaire et épendymaire précoce de l'ED1 chez l'animal



Légende : Coupe de moelle épinière analysée à J25 avant l'apparition des signes cliniques par immunohistochimie avec le marqueur ED1 (marquant les macrophages et les lysosomes de la microglie activée). Marquage périvasculaire (flèches) sur l'image de gauche et des cellules épendymaires à la limite entre LCR et cerveau dans l'image de droite (flèche)

Ces dernières lésions pourraient être liées à l'action directe des anticorps anti-AQP4 altérant le fonctionnement de l'astrocyte et conduisent à l'apoptose. Nos résultats orientent donc vers l'existence de plusieurs mécanismes d'atteinte astrocytaire dans le modèle animal. L'atteinte des zones périventriculaires semble suivre les mêmes mécanismes que celle de la moelle épinière.

Nous avons analysé la quantité de protéines AQP4 présente chez les rats mais pas celle d'ARNm d'AQP4 exprimé ce qui pourrait être une perspective intéressante. Miyamoto et al. ont montré en effet une augmentation de l'expression d'ARNm d'AQP4 dans la moelle épinière et l'encéphale (pas d'étude des nerfs optiques) de l'EAE (souris C57BL/6 injectées avec de la MOG) (Miyamoto et al., 2009). La comparaison avec les données du marquage histologique aurait pu renseigner sur les événements régulant la traduction, l'adressage et les modifications post-traductionnelles de l'AQP4, potentiellement perturbés aussi par l'anticorps anti-AQP4. Il serait notamment intéressant de confirmer et d'expliquer les causes du décalage entre l'expression de la GFAP et de l'AQP4 dans la phase d'état de l'inflammation des nerfs optiques.

4) Nouvelles données immunologiques

Nous avons confirmé la présence dans ce modèle d'une réaction immune humorale forte qui se traduit par une production importante d'anticorps anti-MOG. Nous avons étudié l'évolution de la concentration d'anticorps dans le sang et confirmé la nette augmentation des anticorps au moment de l'installation des signes cliniques. Cependant, il n'y avait pas de relation directe entre la concentration d'anticorps anti-MOG et l'intensité de handicap. De même nos travaux postérieurs chez l'humain n'ont pas retrouvé de relation entre la concentration d'anticorps anti-AQP4 et l'activité de la maladie (article 3). Néanmoins, l'effectif des rats était relativement petit et il était difficile de montrer une corrélation significative. La présence de dépôts d'immunoglobulines et de complément avait déjà été signalée dans le modèle du rat Brown Norway par Storch et al. (Storch et al., 1998) et confirme l'implication du système immunitaire humoral.

Nous avons complété les travaux précédents en recherchant la présence d'anticorps anti-AQP4. Ceux-ci étaient négatifs selon la technique d'immunofluorescence classique chez l'humain, nous avons aussi essayé de rechercher une réactivité contre pratiquement chacun des composants extra-membranaires de l'AQP4 en ELISA. Nous n'avons pas retrouvé d'anticorps. Une réactivité contre un antigène uniquement conformationnel ne peut être complètement exclue (Nicchia et al., 2009). Il semble cependant exister chez l'homme plusieurs spécificités d'anticorps anti-AQP4 dont au moins certaines reconnaissent des antigènes linéaires (Yu et al., 2011). La présence d'anticorps anti-AQP4 dans notre modèle semble donc peu probable. Il existe quand même des éléments histologiques suggérant une atteinte des astrocytes et de l'AQP4 dans le modèle animal et la

découverte des mécanismes impliqués dans ces lésions astrocytaires pourrait nous donner des pistes pour expliquer les formes de NMO séronégatives pour les anticorps anti-AQP4.

Il existe un débat sur les voies inflammatoires préférentielles dans la SEP ou la NMO (Th1, Th2, Th17) (Kalluri et al., 2011; Matsushita et al., 2013; Shimizu et al., 2011). L'analyse des cytokines et/ou des clusters de différenciation des leucocytes exprimées dans différents endroits du SNC dans ces modèles animaux d'inflammation optico-médullaire pourrait être intéressante. La physiologie du système immunitaire n'est cependant pas forcément la même chez les rongeurs et les humains et les résultats obtenus dans le modèle animal devront être transposés avec précaution.

5) Données de l'IRM

L'IRM est un outil intéressant car il permet de dépister l'apparition de lésions de façon plus objective et peut-être plus précoce que l'examen clinique qui est de plus un peu aléatoire chez le rat. L'IRM est aussi reproductible contrairement à l'analyse histologique qui nécessite le sacrifice de l'animal. Cet outil a cependant été peu utilisé du fait du coût et de la difficulté technique d'anesthésier l'animal et d'acquérir les images.

Nos résultats permettent d'étendre le phénotype du modèle animal de démyélinisation optico-médullaire: il existe en effet de nets hypersignaux IRM périventriculaires au début de la maladie. Ces données ont permis de guider l'analyse histologique et de détecter une atteinte inflammatoire à ce niveau. Il semble donc que l'inflammation optico-médullaire ait tendance à concerner aussi les zones péri-ventriculaires ce qui est cohérent avec les données IRM de la NMO humaine où on constate des hypersignaux péri-ventriculaires (Kim et al., 2012). Il serait intéressant de pratiquer des sacrifices ciblés dans cette fenêtre temporelle pour savoir pourquoi une inflammation débute à ce niveau-là mais ne se développe pas vers des lésions aussi sévères qu'au niveau optico-médullaire. L'utilisation de techniques IRM avancées comme la diffusion pourrait aussi renseigner sur les mouvements d'eau.

6) Nouvelles expériences pratiquées dans le laboratoire

Dans le cadre d'une démarche translationnelle, le modèle animal a servi pour des analyses complémentaires à celles publiées dans l'article 2. Ces expériences complémentaires ont notamment été l'occasion de tester l'immunisation passive des animaux par des sérums issus de patients NMO, dont les résultats avaient été publiés en 2009-2010 (Kinoshita et al., 2009). Elles ont été l'occasion de tester des hypothèses physiopathologiques issues des résultats obtenus chez l'humain.

Ces expériences exploratoires ont été réalisées par Chiara Palladino une étudiante en master 2. La première visait à explorer les conséquences du transfert d'IgG de patients NMO séropositifs et séronégatifs pour les anticorps anti-AQP4 à notre modèle animal. Un total de 15 rats Brown Norway ont suivi un protocole d'immunisation par la MOG similaire à celui décrit dans l'article 2 avec en plus un rappel d'adjuvant complet de Freund 26 jours après l'immunisation par la MOG. Cinq rats ont ensuite eu une injection d'IgG purifiés issus d'un même sérum de patient NMO séropositif pour les anticorps anti-AQP4, cinq rats d'un même patient NMO séronégatif et cinq autres d'un sujet contrôle sain. Les trois groupes de rat ont développé une maladie avec des signes cliniques globalement équivalents. L'analyse histologique a montré une perte en AQP4 et GFAP nettement plus importante au niveau des nerfs optiques chez les rats injectés avec le sérum des deux patients NMO que ceux avec le sérum du sujet sain. Ceux ayant eu le sérum avec des anticorps anti-AQP4 avaient une perte de ces marqueurs encore plus importante que ceux avec le sérum séronégatif.

Ces résultats confirment l'action pathogène du sérum des patients NMO chez l'animal avec une inflammation du SNC déjà présente. La modification des marquages AQP4 et GFAP constatée dans les nerfs optiques pourrait donc bien être liée à un mécanisme similaire à celui de la NMO car il est majoré par l'injection des sérums NMO. Il est très intéressant de constater que l'injection d'IgG de patients NMO séronégatifs provoque aussi une majoration des lésions histologiques. Cela suggère qu'un facteur (anticorps contre une autre cible ? anti-AQP4 non détecté par les techniques standard ?) est présent dans ces IgG. Cependant des expériences portant sur plus de patients seraient nécessaires. La disponibilité des IgG (issus d'un échange plasmatique) et le temps nécessaire pour les purifier et élever les animaux sont des facteurs limitants qui n'ont pas encore permis d'élargir cette expérience exploratoire.

Une autre partie de l'expérience a recherché la présence de réactivité contre CSF114 et CSF114 glucosylé . En effet notre travail de l'article 4 avait suggéré entre-temps la présence d'IgG anti-CSF114(Glc) chez les patients NMO. La concentration de ces anticorps pourrait même être corrélée à l'activité de la maladie. Cet antigène aurait des liens avec un des épitopes immunodominants de la MOG et la réaction immune serait influencée par la présence ou non de modifications post-traductionnelles (cf article 4 et ses commentaires). Chiara Palladino, a mesuré par ELISA la présence d'IgG dirigés contre CSF 114 et CSF114(Glc) dans les rats de notre modèle selon la même méthode ELISA décrite dans l'article 2. Cependant ces tests ont été négatifs : les rats immunisés n'avaient pas développé plus de réactivité que les rats témoins et cette caractéristique potentielle de la NMO ne se retrouve donc pas chez l'animal.

III) CARACTERISATION DE
LA REPONSE IMMUNE
DANS LA NEUROMYELITE
OPTIQUE

1) Suivi longitudinal des anticorps anti-AQP4 et activité de la
maladie

Article 3: Chanson JB, Alame M, Collongues N, Blanc F, Fleury M, Rudolf G, de Seze J, Vincent T. Evaluation of Clinical Interest of Anti-Aquaporin-4 Autoantibody Followup in Neuromyelitis Optica. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:146219. doi: 10.1155/2013/146219. Epub 2013 Apr 28

Research Article

Evaluation of Clinical Interest of Anti-Aquaporin-4 Autoantibody Followup in Neuromyelitis Optica

Jean-Baptiste Chanson,^{1,2} Melissa Adams,³ Nicolas Collongues,^{1,2} Frédéric Blanc,^{1,2} Marc Henry,¹ Gabrielle Rudolf,^{1,3} Jérôme de Souza,^{1,2} and Thierry Vincent^{1,4}

¹ Department of Neurology, Médecine Universitaire de Strasbourg, 7 Avenue Mallock, 67083 Strasbourg, France

² Laboratoire d'Immunologie et Médecine des Maladies Autoimmunes, UMR1121, Université de Strasbourg, 67083, rue Dardigny, 67083 Strasbourg, France

³ Department of Neurology, Hôpital de la Croix-Rouge, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, 81 Avenue Augustin Hache, 34295 Montpellier, France

⁴ Institut de Cardiologie Humaine, CNRS UMR1042-ICM, Faculté de Cardiologie, 34295 Montpellier, France

Correspondence should be addressed to Thierry Vincent; vincent@chu-montpellier.fr

Received 24 December 2023; Accepted 1 April 2024

Academic Editor: T. Tashiro

Copyright © 2024 Jean-Baptiste Chanson et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Neuromyelitis optica (NMO) is an autoimmune disease in which a specific immunoglobulin (IgG) and identified against aquaporin-4 (AQP4) has been found. A correlation between disease activity and anti-AQP4 antibody (Ab) serum concentration or complement-mediated cytotoxicity has been reported, but the usefulness of longitudinal evaluation of these parameters remains to be evaluated in actual clinical practice. This is seven samples from 18 NMO patients positive for NMO-IgG were followed from 2004 to 2011. Anti-AQP4 Ab serum concentration and complement-mediated cytotoxicity were measured by flow cytometry using two quantitative cell-based assays (CBA) and compared with clinical parameters. We found a strong correlation between serum anti-AQP4 Ab concentration and complement-mediated cytotoxicity ($P < 0.0001$). Nevertheless, neither Ab serum concentration or complement level was closely associated with a significant increase in serum Ab concentration or cytotoxicity. These results suggest that complement-mediated serum cytotoxicity assessment does not provide extra insight compared to anti-AQP4 Ab serum concentration. Furthermore, none of these parameters appears closely related to disease activity and/or severity. Therefore, in clinical practice, serum anti-AQP4 reactivity seems not helpful as a predictive biomarker in the follow-up of NMO patients as a means of predicting the onset of a relapse and adapting the treatment accordingly.

1. Introduction

Neuromyelitis optica (NMO) is a severe inflammatory demyelinating disease of the central nervous system in which inflammatory lesions are usually restricted to the spinal cord and optic nerves [1, 2]. NMO is distinguished from multiple sclerosis (MS) by a more severe evolution and a predominant humoral response [3]. A highly disease-specific serum antibody (Ab), NMO immunoglobulin G (NMO-IgG), has been recently discovered [4]. The target antigen of NMO-IgG was identified as aquaporin-4 (AQP4), the main water channel protein in the CNS [5]. Owing to its very high specificity to NMO, anti-AQP4 Ab was included in the revised diagnostic

criteria for NMO [6]. Anti-AQP4 Ab also proved to be helpful in predicting a more severe course and a probable conversion to MS after a first episode of isolated optic neuritis or longitudinally extensive transverse myelitis [7–11]. Several experiments in animal models demonstrated a pathogenic role of this antibody in the disease [12, 14]. Therefore, it was questioned whether anti-AQP4 Ab serum concentration is related to disease activity or burden and, first, whether its assessment could be helpful in predicting disease evolution and adapting the treatment.

A link between anti-AQP4 serum reactivity and various clinical parameters in NMO patients was suggested by numerous studies. Takahashi et al. found an association

1

between high anti-AQP4 Ab serum concentration and both trigemine myelitis lesion length and disease activity [6]. Accordingly, Jarius et al. [16] and Waters et al. [17] described increased anti-AQP4 serum concentration during clinical relapses and a decrease following immunosuppressive therapy. Kim et al. suggested that anti-AQP4 Ab levels correlate with disease activity but noted that rising of anti-AQP4 Ab levels did not always indicate disease exacerbation [18]. However, when testing complement-dependent cytotoxicity, presence of NMO-patients' serum on AQP4-transfected cells. Kim et al. observed that serum relapses were associated with higher cytotoxicity but not higher anti-AQP4 serum concentration [18]. Recently, Ojsovska et al. found that cerebrospinal fluid (CSF) but not serum anti-AQP4 Ab titer are associated with disease activity and neurodegeneration [20], whereas Jarius et al. suggested that both parameters are correlated with relapses [21].

Here, we aimed to evaluate the interest of a longitudinal assessment of anti-AQP4 Ab in clinical practice. We therefore compared the evolution of both anti-AQP4 Ab serum concentration and complement-mediated cytotoxicity with key clinical parameters such as relapse onset and disease severity.

2. Patients and Methods

2.1. Patients. Among the NMO patients followed up in the Neurology Department of the University Hospital of Montpellier, we selected those who were positive for NMO-IgG. The disease was diagnosed according to the revised criteria of Wingerchuk et al. [4]. NMO-IgG was detected by indirect immunofluorescence (IF) on primary cerebellum slices with diluted sera (1:50) following the manufacturer's instructions (Immunomediate Laboratory, Lexington, MA, USA). Patients must have presented at least one relapse in the 1 last years. The NMO patients were included. We collected both retrospectively and prospectively serum samples taken during a relapse or a control visit. Presence of a relapse and disease severity (evaluated by the Expanded Disability Status Scale, EDSS) at the time of the blood draw were registered. Relapses were treated at least with intravenous high-dose methylprednisolone (500 mg/day over 3–5 days) and for the most severe relapses with plasma exchange (PE, 4–6 PE cycles). The samples were taken before corticosteroid treatment or PE. The interval between the onset of the relapse and the blood draw was from three to seven days. Presence of an immunosuppressive therapy (cyclophosphamide, cyclosporine, mycophenolate mofetil, azathioprine, rituximab, or plasmidex) was also registered. Written informed consent was obtained from all patients. Study protocol was declared to the CNIL (Commission Nationale Informatique et Liberté), and the study was performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki.

2.2. Measurement of Anti-AQP4 Ab Serum Concentration. Sera were collected between 2004 and 2011 and stored at -80°C . They were sent to the Department of Immunology of the University Hospital of Montpellier (France). Anti-AQP4 Ab serum concentration was measured without knowledge of clinical information using a new quantitative cell-based

Clinical and Developmental Immunology

assay (CBA) recently validated [22]. Briefly, HEK-293-T human cell line was transfected using HIV-based vectors expressing either the human AQP4 and enhanced green fluorescent protein (EGFP) genes (293-AQP4/EGFP-cells) or the EGFP gene alone (293-EGFP-cells). Cells were incubated with diluted human sera (1:200) in DMEM buffer (FBS-containing DMEM, 10% serum and 10% medium change), washed, and incubated with allophycocyanin-1 (APC)-labeled goat anti-human IgG Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA). After washing, cells were analyzed on a FACSCalibur (BD Biosciences) and APC mean fluorescence intensity (MFI) was measured on EGFP-positive cells. A serum was considered anti-AQP4 positive if it bound 293-AQP4/EGFP but not 293-EGFP cells. To determine the anti-AQP4 concentration (arbitrary units, AU/ml), the APC-MFI of 293-AQP4/EGFP cells incubated with 1:200 of test patient sera and corrected for the background binding to the 293-EGFP control cells was plotted in a calibration curve obtained with a pool of NMO-IgG positive sera diluted from 1:200 (1000 AU/ml) to 1:10240 (0.1 AU/ml). All sera from the same patient were analyzed simultaneously.

2.3. Measurement of Complement-Mediated Serum Cytotoxicity. The protocol was adapted from Jarius et al. [18]. 293-AQP4/EGFP and 293-EGFP cells were incubated with patients' sera (20% serum) in DMEM buffer for 30 minutes at $+4^{\circ}\text{C}$. After washing, cells were incubated with active complement (40% complement) for 45 minutes at 37°C . Low-Titer-II rabbit complement (Cedarlane Laboratories Ltd, Burlington, NC, USA) and complement-dependent cytotoxicity (CDC) was measured by flow cytometry. Analysis of the percentage of EGFP-positive cells permeable to the viability dye propidium iodide (PI). A pool of normal sera from healthy subjects was included in each assessment as a negative control. Serum cytotoxicity was defined (AU/ml) by the difference between the percentage of PI-positive cells induced in 293-AQP4/EGFP cells versus 293-EGFP cells corrected by the background of mortality observed with the pool of normal sera. All sera from the same patient were analyzed simultaneously.

2.4. Statistical Analysis. The Pearson correlation coefficient was used to search for a correlation between anti-AQP4 Ab serum concentration and cytotoxicity. The nonparametric Mann-Whitney U test was used to determine whether anti-AQP4 serum concentration or cytotoxicity was related to the presence of a relapse or disease severity. We compared both biological parameters in serum taken in relapsing phase (<10 minutes after a relapse) versus remitting phase and in the 1 more disabled patients (i.e., with the highest mean EDSS scores) versus the other ones. A Bonferroni correction for multiple comparisons was applied and the statistical significance was defined as P value of $P < 0.01$.

3. Results

3.1. Patients. Thirty sera were collected from 15 NMO-IgG positive patients (mean: 2 per patient, range 1–5) between 2004 and 2011. Patients characteristics are summarized in

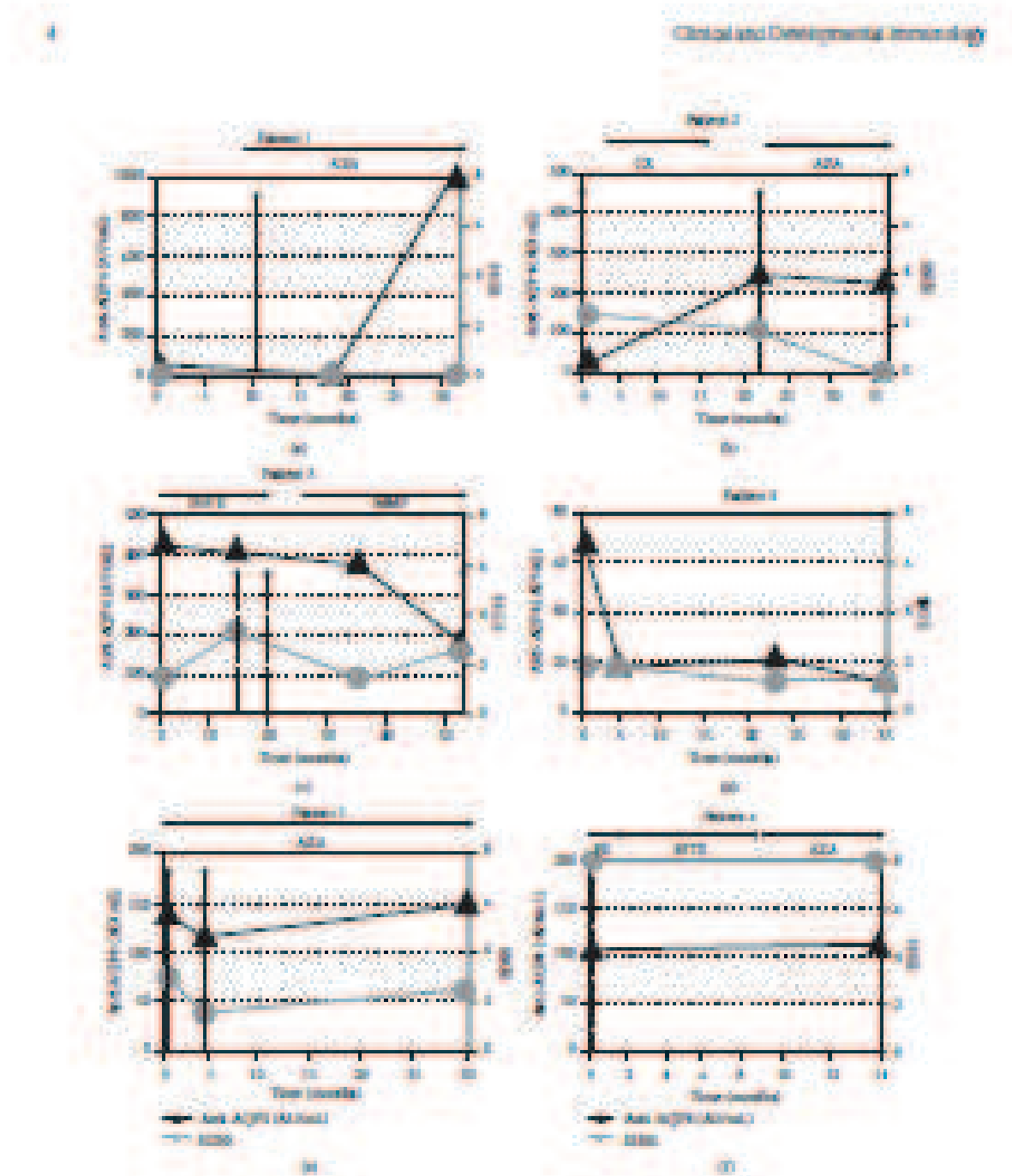


FIGURE 1 | Total and residual of anti-Acetylcholinesterase antibody and concentration with disease course in patients. In 6, 20-month-old patient with ASD, all concentrations of total antibody were measured with a cell-based assay using a GFP-expressing neuron (GFP⁺ cell) and flow cytometry as described in the text. IgG and IgM were indicated for level of total antibody (grey circles). Vertical dashed lines represent diagnosis. All patients were treated with corticosteroids, hormonal therapy, and/or a treatment (ASDA) and/or with (2) monthly administration of B7-1 extracellular (B7-1) interferon beta (B7-1) conjugate (white circles). The plasma exchange (B7-1) concentration.

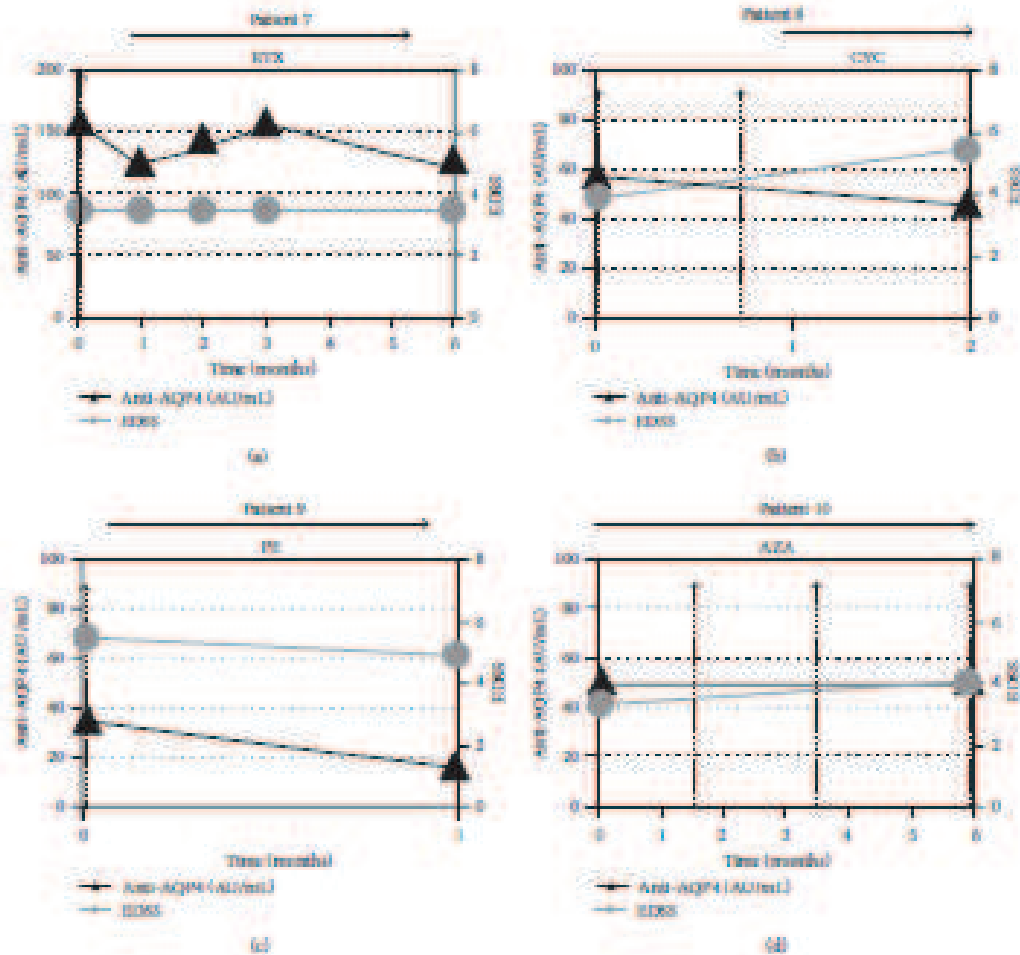


Figure 3: Detailed evolution of anti-AQP4 serum reactivity and comparison with disease course in patients 7 to 10. Serum anti-AQP4 Ab concentration (black triangle) was measured with a cell-based assay using AQP4 expressing human 293 T cells and flow cytometry as described in Section 2. EDSS score indicates the level of impairment (grey circle); vertical dashed arrows represent relapses (all relapses were treated with corticosteroids); horizontal arrows indicate a treatment (RTX: rituximab (1 perfusion weekly of 375 mg/m² during 4 weeks); CYC: cyclophosphamide; PE: plasma exchange; AZA: azathioprine).

patient 7 resulted in an early increase (with no clinical event) followed by a delayed decrease (at 6 months) in anti-AQP4 reactivity.

As shown in Table 2, statistical analysis found no relationship between anti-AQP4 serum concentration or complement-mediated cytotoxicity and the presence of a relapse or disease severity (EDSS score).

4. Discussion

The followup of our patients suggests that anti-AQP4 Ab serum concentration and complement-mediated cytotoxicity

are strongly correlated, but that their monitoring does not allow an accurate and reliable prediction of disease evolution.

The only study that longitudinally assessed serum complement-mediated cytotoxicity in NMO patients reported that this parameter was better correlated with disease activity than anti-AQP4 Ab serum concentration [8]. These findings were not in accordance with the marked link previously demonstrated *in vitro* between anti-AQP4 Ab concentration and complement-dependent cytotoxicity [23, 24]. In our patients, despite high inter- and intraindividual variability, we found a marked correlation between anti-AQP4 Ab serum concentration and complement-mediated serum cytotoxicity

($P < 0.000$). This result suggests that measurement of serum cyclophosphamide does not give an extra insight compared to anti-AQP4 Ab concentration assessment. Accordingly, when compared with disease course in severity, anti-AQP4 Ab serum concentration and complement-mediated cytotoxicity gave very similar and divergent results.

NMO is characterized by severe relapses often resulting in sustained functional impairment and it would be of particular interest to predict a relapse strain for an earlier adaptation of the treatment [25]. Unfortunately, in the follow-up of our patients, relapses were rarely associated with relevant changes in anti-AQP4 reactivity. This is well illustrated by patients 1 and 3 in which anti-AQP4 reactivity was lower during a relapse than a remission phase. Conversely, we observed in other cases that marked changes in anti-AQP4 reactivity were not accompanied by any clinical event (e.g., patient 5). A potential confounding factor was the presence of immunosuppressive therapies which are often prescribed in NMO [15, 16]. We frequently observed a decrease in anti-AQP4 Ab concentration after the beginning of an immunosuppressive treatment. However, this effect was not systematic, as was shown in patients 1 and 6. Transient increases in anti-AQP4 reactivity observed after rituximab initiation in patient 7 is consistent with those reported in two recent papers [26, 27]. Interestingly, these studies did not observe any correlation between the increase in anti-AQP4 Ab serum concentration and the worsening of the disease.

Our results do not preclude a pathogenic role of serum anti-AQP4 Ab in NMO but underline the requirement of additional factors to allow peripheral Ab to cross the blood-brain barrier (BBB) and gain their targets in the CNS. Indeed, the worsening of an established autoimmune neuropathological intraperitoneal model of anti-AQP4 Ab in animal was dependent on a previous BBB breakdown and the presence of inflammatory cytokines [12]. Likewise, intrathecal or trans-retinal sequestration of NMO-IgG in the CNS induce NMO-like lesions, whereas intrathecal injection does not cause CNS damage [28]. Indeed, microglial inflammatory breakdown is thought to occur in the periphery, pathological processes occur in the CNS. Hence, as suggested by recent studies, it might be more relevant to use CSF rather than serum anti-AQP4 Ab as a biomarker for the follow-up of NMO patients [26, 29].

Our study presented some limitations that should be pointed out. The relative small number of patients tested may have limited the detection of significant correlations between immunological and clinical parameters. This study cannot address in detail the question whether relapses are preceded by an increase in AQP4 serum levels, since focused samples taken shortly before and during relapses could were available for comparison from most patients. Due to the retrospective design, time intervals between the samplings and treatments of patients were variable. The statistical results must be therefore interpreted with caution. However, this heterogeneity reflects the clinical practice in which patients are not monitored with short and regular intervals and receive various drugs. At an individual level, we noted that anti-AQP4 Ab concentration is highly variable and is related to many factors including the administration of immunosuppressants. However, it did not appear closely correlated with disease activity

5. Conclusions

Altogether, our results showed that anti-AQP4 serum concentration in NMO patients is representative of serum complement-mediated cytotoxicity. The lack of strong correlation between the anti-AQP4 serum reactivity and disease course in our study suggests that anti-AQP4 Ab monitoring could not be used to reliably predict relapses and adapt treatment. Therefore, the longitudinal evaluation of serum anti-AQP4 reactivity does not appear helpful for an accurate follow-up of NMO patients in clinical practice.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflict of interest to declare.

Acknowledgment

This study was supported by a grant from the CNR (de Meopoline to T. Viviani).

References

- [1] Lechner C, Luben J, Hoffmann H, Herzig M, Christl and B. Weierbach. "In vivo immunopathology opens a separate channel: A comparative study with multiple sclerosis." *Multiple Sclerosis*, vol. 16, no. 2, pp. 157–170, 2010.
- [2] D. M. Weierbach, H. J. Gensler, C. H. Lechner, S. J. Herzig, and H. C. Weierbach. "Characterization of immunopathological." *Leber Neurology*, vol. 16, no. 2, pp. 157–170, 2010.
- [3] C. H. Lechner, H. J. Gensler, H. Weierbach, and B. Weierbach. "A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of optic nerve demyelination." *Optic*, vol. 12, no. 2, pp. 157–170, 2010.
- [4] V. A. Lennon, D. M. Weierbach, T. J. Kryzer, et al. "A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica distinct from multiple sclerosis." *Lancet*, vol. 366, no. 9503, pp. 1210–1212, 2005.
- [5] V. A. Lennon, T. J. Kryzer, S. J. Herzig, C. S. Weierbach, and H. C. Weierbach. "IgG marker of optic neuritis/multiple sclerosis binds to desmyelinized optic nerve sheath." *Journal of Experimental Medicine*, vol. 192, no. 4, pp. 475–477, 2000.
- [6] D. M. Weierbach, H. J. Gensler, H. Herzig, C. H. Lechner, and H. C. Weierbach. "Serum diagnostic criteria for neuromyelitis optica." *Neurology*, vol. 65, no. 12, pp. 1687–1690, 2005.
- [7] G. Alarcon-Gomez, E. Tassin, F. Waters, et al. "Prognostic implications of aquaporin-4 antibody status in neuromyelitis optica patients." *Journal of Neurology*, vol. 255, no. 3, pp. 494–497, 2008.
- [8] A. Jarius, J. Weierbach, S. Waters, et al. "Frequency and prognostic impact of antibodies to aquaporin-4 in patients with optic neuritis." *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 298, no. 1–2, pp. 109–114, 2010.
- [9] M. Mandel, V. A. Lennon, S. Jarius, et al. "NMO-IgG predicts the outcome of recurrent optic neuritis." *Neurology*, vol. 74, no. 20, pp. 2007–2010, 2010.
- [10] E. C. Weierbach, D. M. Weierbach, S. Weierbach, et al. "Neuromyelitis optica (NMO) predicts relapsing long-standing recurrent neuromyelitis optica." *Annals of Neurology*, vol. 58, no. 3, pp. 530–534, 2005.
- [11] J. Jarius, K. Fujimori, S. Weierbach, et al. "Comparing disease patterns in aquaporin-4 and oligodendrocyte glycoprotein optica

Clinical and Developmental Immunology

7

- a multicentre study of 175 patients." *Journal of Neuroinflammation*, vol. 10, no. 1, article 14, 2012.
- [24] M. Small, T. Alvar, T. Takahashi et al., "Transcriptomic spectra pathogenesis of primary immunoglobulin a-osis." *Annals of Neurology*, vol. 68, no. 3, pp. 488–497, 2010.
- [25] M. Shiroishi, T. Takahashi, T. Kuroda et al., "Transcriptomic spectra pattern correlate to site by human immunoglobulin. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, vol. 10, no. 2, pp. 122–127, 2019.
- [26] S. Nishikawa, F. Watanabe, H. A. Hill, G. Verciani, J. L. Velasco, and M. C. Papadopoulos, "Gene network signature of immunoglobulin a-osis immunoglobulin G and human complement proteins immunoglobulin a-osis lesions in mice." *Brain*, vol. 133, no. 3, pp. 849–861, 2010.
- [27] T. Takahashi, N. Yoshida, J. Takahashi et al., "Anti-apoptotic function is involved in the pathogenesis of MSMG: a study on antibody mice." *Brain*, vol. 133, no. 3, pp. 1217–1228, 2010.
- [28] S. Iwata, K. Iwata, T. Watanabe et al., "A network signature in a model for amyloid precursor protein of immunoglobulin a-osis." *Brain*, vol. 133, no. 11, pp. 3077–3086, 2010.
- [29] F. Watanabe, S. Iwata, H. Yoshida et al., "A signature of antibodies in immunoglobulin a-osis and longitudinally extensive transverse myelitis." *Archives of Neurology*, vol. 67, no. 3, pp. 313–320, 2010.
- [30] S. H. Han, J. M. Kim, J. Yoon et al., "Clinical characteristics, prognosis, and seropositivity to the anti-apoptotic function in Korean patients with longitudinally extensive transverse myelitis." *Journal of Neurology*, vol. 257, no. 11, pp. 2027–2034, 2010.
- [31] S. H. Han, S. H. Han, S. H. Han, J. T. Park, M. Yoon, S. H. Han, J. A. Kim, and S. J. Park, "Prediction of immunoglobulin a-osis attack onset by quantitation of complement-mediated injury to oligodendrocyte 1-expressing cells." *Archives of Neurology*, vol. 68, no. 3, pp. 324–327, 2011.
- [32] J. Takahashi, S. Watanabe, T. Takahashi et al., "Immunopathogenesis of longitudinal brain and optic neuritis in patients with immunoglobulin a-osis optic neuritis." *Journal of Neuroimmunology*, vol. 232, no. 1–2, pp. 128–135, 2012.
- [33] S. Iwata, T. Watanabe, T. Hill et al., "Cerebrospinal fluid antibodies to oligodendrocyte 1 in immunoglobulin a-osis and related diseases: frequency, origin, and diagnostic relevance." *Journal of Neuroinflammation*, vol. 7, article 16, 2012.
- [34] J. De Vries, G. Boven, H. Takahashi et al., "Strategy for anti-apoptotic 1 gene antibody identification and quantification using a novel cell-based assay." *Clinical Immunology*, vol. 125, no. 3, pp. 239–246, 2012.
- [35] S. H. Han, T. Hill, G. Boven et al., "Quantitative and functional characterization of antibodies to oligodendrocyte 1 in immunoglobulin a-osis." *Archives of Neurology*, vol. 69, no. 10, pp. 1218–1226, 2012.
- [36] J. Takahashi, A. Chiba, A. Horiuchi et al., "Epidemiological effect of new immunoglobulin a-osis antibody (MSMG-1g) immunization in a pilot study." *Journal of Neuroimmunology*, vol. 243, no. 1–2, pp. 13–18, 2013.
- [37] N. Collingwood, A. Marignier, G. Taylor et al., "Immunoglobulin a-osis in France: a multicenter study of 120 patients." *Neurology*, vol. 75, no. 9, pp. 793–797, 2010.
- [38] J. Takahashi, T. Takahashi, H. A. Hill, G. Verciani, and M. C. Papadopoulos, "Transcriptomic spectra pathogenesis of primary immunoglobulin a-osis." *Annals of Neurology*, vol. 68, no. 3, pp. 488–497, 2010.
- [39] J. L. Velasco, M. C. Papadopoulos, J. Velasco et al., "Long-term follow-up of patients with immunoglobulin a-osis after repeated therapy with rituximab." *Neurology*, vol. 81, no. 10, pp. 1217–1224, 2014.
- [40] J. L. Velasco, J. Velasco, J. Velasco et al., "Anti-oligodendrocyte 1 IgG in immunoglobulin a-osis." *Neurology*, vol. 82, no. 22, pp. 1227–1231, 2014.

Commentaires :

Dans ce travail nous avons voulu étudier l'utilité clinique du suivi de la concentration des anticorps anti-AQP4 pour prédire la survenue des poussées. Le nombre de patients inclus est limité et les intervalles de suivi variés mais nos données suggèrent que la concentration des anticorps anti-AQP4 est hautement variable à la fois chez un même patient et entre les patients. On constate des augmentations de cette concentration qui ne sont pas accompagnées de poussées et des poussées qui surviennent alors que la concentration des anticorps anti-AQP4 avait plutôt eu tendance à baisser.. Le suivi de ce paramètre ne semble donc pas utilisable en pratique clinique.

Certains travaux récents ont trouvé plusieurs types d'anticorps anti-AQP4 différents chez les patients NMO dirigés contre différents épitopes de l'AQP4 (Yu et al., 2011). Ces données posent donc la question d'une même quantité d'anticorps déclenchant une cytotoxicité différente (Hinson et al., 2009). Nos travaux et ceux de Kalluri (Kalluri et al., 2010) sont en faveur d'une bonne corrélation entre la concentration d'anticorps et la cytotoxicité médiée par le complément. Les anticorps dirigés contre différents types d'épitopes de l'AQP4 auraient une partie constante semblable avec une capacité équivalente à activer la voie du complément. La corrélation entre la concentration des anticorps anti-AQP4 et la cytotoxicité médiée par les cellules effectrices reste à étudier.

Depuis la publication de cet article un travail similaire a conclu aussi à un faible intérêt clinique du suivi de la concentration des anticorps anti-AQP4 (Isobe et al., 2013)

D'autres éléments sur les recherches en cours pour le suivi de l'activité de la NMO sont exposés dans l'article 1 de la thèse.

2) Recherche de nouvelles cibles antigéniques

Article 4 : Chanson JB, Paolini I, Collongues N, Alcaro MC, Blanc F, Barbetti F, Fleury M, Peroni E, Rovero P, Rudolf G, Lolli F, Trifilieff E, Papini AM, de Seze J. Evaluation of new immunological targets in neuromyelitis optica. *J Pept Sci.* 2013 Jan;19(1):25-32.

minimal epitope of [Asn¹⁴(Glc)]hMOG(30–55) was identified as the N-glycosylated amino acid Asn(Glc) [9,10]. Thus, an antigenic probe, called CSF114(Glc), was designed and synthesized to optimally expose this N-glycosylated amino acid on a type I β -turn. It was proven that CSF114(Glc) is able to differentiate a significant proportion of MS sera from NBD sera [10], recognizing IgMs in about 30% of MS patients [11]. CSF114(Glc) was selected by a chemical reverse approach based on the screening of MS patients sera using a series of differently modified peptides [6]. The autoantibody recognition guided the selection of the best synthetic antigenic probe leading to the identification of the N-glycosylated asparagine exposed on the β -turn [12].

Similar studies have not been conducted yet in other neurological autoimmune diseases, which share many characteristics with MS. NMD is also an autoimmune disease of the central nervous system in which seven inflammatory relapses predominantly affect spinal cord and optic nerves [15]. The diagnosis can be supported by detection of antibodies directed against a water channel, AQP4, but they are absent in 10–50% of patients [14–17]. Less common reactivities against MOG or MBP proteins have been described in sera or cerebrospinal fluid of NMD patients [18–20]. However, these results were obtained on small cohorts of NMD patients, the link with clinical relapse was unclear and the peptide nature and PTMs of the target antigens were not determined.

To provide more insight into the immune response occurring in NMD and to eventually find new immunological targets, we therefore applied the chemical reverse approach to the study of the reactivity of patient sera against some structurally defined peptides derived from MBP, MOG and PDH proteins or CSF114 sequence. These peptides 1–19 (Table 1) were chosen to investigate the role of amino acid sequence, conformation and PTMs.

The selection of peptides 1–17 was driven by our previous studies performed for more than 10 years with the aim of identifying the putative autoantigen involved in MS [9–11]. Before NMD was recognized as a completely different disease from MS [14], we had synthesized and tested all these sequences in immunoenzymatic assays to evaluate their reactivity against MS and

NBD sera. Some of them displayed an autoantibody recognition in a significant percentage of patient sera [10,11]. In 2004, Lennon et al. [14] revolutionized the studies of pathogenic mechanism involved in NMD disease by identifying the putative marker for NMD (AQP4). As a consequence, NMD and related disorders were distinguished from MS, thus leading to the re-classification of some MS patients as NMD patients. In our scenario, this purified the re-evaluation of the ability of peptide sequences 1–17 to identify classes of antibodies in NMD different from AQP4.

Starting from unmodified peptides 1, 3, 5, 7 and 10, different PTMs were introduced in peptide sequences 1–17 according to the ones described for the corresponding native proteins. Indeed, as citrullination of MBP arginines is a common phenomenon in MS [21], we evaluated the level of antibodies against MBP (156–175) (peptide 3) and its analogue modified with delimited Arg-159 and Arg-165 (peptide 4). Moreover, we investigated the effect of different types of glycosylation in terms of linkage of the sugar to the amino acid (O-glycosylation and N-glycosylation) and sugar moieties (N-acetyl glucosamine, glucose, galactose and mannose). For MOG, the glycosylation was introduced at position 31, which is the native site of N-glycosylation, whereas for MBP (49–68), the modification was introduced at Asn-55 even if it is not natively glycosylated. Different glycosylated amino acids were introduced in CSF114 sequence at position 7 or 8 (peptides 12–17).

The sequences 10–17 (CSF114 analogues) were chemically designed and selected because of their precise β -turn structure. In fact, to investigate the role of conformation in CSF114 sequence, we modified the structure of the probe by changes in the amino acids adjacent to Asn(Glc) (peptides 14 and 15). In fact, the type I β -turn formed by peptide 11 can be changed into a type II β -turn in peptide 14 or a type I β -turn in peptide 15 [9]. The unglycosylated analogues of peptides 14 and 15 (peptides 16 and 17, respectively) were also selected as controls.

PDH peptides were also selected because immunity against this protein has been found in PBC [22] but also in EAE, an animal model of MS [23]. For the insertion of lipoylation, we selected one of the two lipoyl domains of the E2 subunit of PDH complex

Table 1. Sequences of peptides 1–19

Peptide no.	Peptide name	Peptide sequence
1	MBP(49–68)	ADANKNNGTSSQDAVYDQK
2	[Asn ⁵⁵ (Glc)]MBP(49–68)	ADANKNAsn(Glc)GTSSQDAVYDQK
3	MBP(156–175)	DHAKRGLPFRHEDGLDLD
4	[Glu ¹⁵⁹ ,Glu ¹⁶⁵]MBP(156–175)	DHAKRGLPFRHEDGLDLD
5	hMOG(28–48)	EEPKNAIQLMVDWVYRFSL
6	[Asn ³¹ (Glc)]hMOG(28–48)	EEPKNAAsn(Glc)ATQMLVDWVYRFSL
7	hMOG(35–55)	QATGMDGWRSPSRNH
8	[Asn ³¹ (GlcNHAc)]hMOG(30–55)	QATGMDGAsn(GlcNHAc)ATQMLVDWVYRFSL
9	[Asn ³¹ (Glc)]hMOG(30–55)	QATGMDGAsn(Glc)ATQMLVDWVYRFSL
10	CSF114	TRVRSNGHVFPLAPQWMAK
11	CSF114(Glc)	TRVRSNGHAsn(Glc)VFPLAPQWMAK
12	[Ser ⁷ (Glc)]CSF114	TRVRSNGSGLGSHVFPLAPQWMAK
13	[Ser ⁸ (Man)]CSF114	TRVRSNGSGLGSHVFPLAPQWMAK
14	[Gly ¹⁴ ,Asn ¹⁵ (Glc)]hCSF114	TRVRSNGAsn(Glc)HVFPLAPQWMAK
15	[Pro ¹⁴ ,Asn ¹⁵ (Glc)]hCSF114	TRVRSNGAsn(Glc)HVFPLAPQWMAK
16	[Gly ¹⁴ ,Asn ¹⁵]hCSF114	TRVRSNGHVFPLAPQWMAK
17	[Pro ¹⁴ ,Asn ¹⁵]hCSF114	TRVRSNGHVFPLAPQWMAK
18	PDH(167–186)	AEETDRAKAGPEVQDQNL
19	[Lys ¹⁷¹ (lipic acid)]PDH(167–186)	AEETDRAKAGPEVQDQNL

constituted by the amino acids 167–186 surrounding the glycosylated site Lys-173 [24], which is naturally modified.

We compared the ability of these peptides, depending on the presence of some PTMs (glycosylation, lipoylation and nitrosylation), to be detected by NMO seq compared with NBD sera. We also studied the correlation between changes in reactivities and the onset of relapses.

Materials and Methods

Chemicals

Protected L-amino acids, Fmoc-L-Asn(GlcNAc₄)OH and Wang resin preloaded with the first Fmoc-amino acid were purchased from Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Germany). Peptide synthesis grade DMF was purchased from Schötenau (Barcelona, Spain). HOBt and TBTU were purchased from Iris Biotech and TFA, DCM, piperidine, NMM and DPEA were purchased from Sigma Aldrich (Milan, Italy).

Peptides Synthesis and Purification

Peptide 7 was provided by ESPKEM (Italy), and peptides 10, 11 and 12 [13] and glycopeptides 14 and 15 [9] were synthesized and purified as previously described.

SPPS was performed on the Apex 396 automatic peptide synthesizer (Applied Biosystems, Matthews, NC) following the Fmoc/Bu strategy. All the reactions were performed in a sealed reaction block under N₂, where mixing is provided by a vortex and filtration is performed by a N₂ flow. Fmoc deprotection was performed with a 20% piperidine solution in DMF. Each coupling cycle included the following four steps: Fmoc deprotection (25 min), washings with DMF (5 × 2 min), acyl coupling (45 min) and washings with DMF (3 × 2 min). For the deprotection of the second residue, a fast protocol is used to avoid OMP formation (5 × 5 min). For the coupling reaction, the following were used: a 0.5 M solution of the Fmoc-protected amino acid and HOBt in DMF (4 equiv), a 0.5 M solution of TBTU in DMF (4 equiv) and a 4 M solution of NMM in DMF (8 equiv). Fmoc-L-Asn(GlcNAc₄)OH, Fmoc-L-Asn(GlcNAc₂)OH, Fmoc-L-Ser(ManAc₄)OH, (2.5 equiv), synthesized at

previously reported [25], and Fmoc-L-Asn(GlcNAc₄)OH (2.5 equiv) were coupled using HOBt (1.5 equiv), TBTU (1.5 equiv) and NMM (8 equiv) in DMF for 1.5 h. After the removal of the last Fmoc residue, the resin was washed with DCM and dried under a N₂ flow for 30 min. The cleavage from the resin and side-chain deprotection was performed by the use of a TFA/triisobutylamine/H₂O mixture (94/2/2/2 v/v/v/v) (reagent K). The resin was treated for 2.5 h with reagent K (1 ml/100 mg of resin) at room temperature. The resin was filtered off, and the solution was concentrated by flushing with N₂. The peptides were precipitated from cold Et₂O and then lyophilized. The deprotection of the hydroxyl functions of sugar moieties was performed by the addition of 0.1 M methanolic NaOMe solution to a solution of the lyophilized peptides in dry MeOH (1 ml/100 mg of resin) until pH 12 was reached. After 3 h, the reaction was quenched by the addition of concentrated HCl until pH 7 was reached; the solvent was evaporated under vacuum, and the residue was lyophilized. The characterization of products 1–19 was performed by UPLC on an ACQUITY system (Waters Corporation, Milford, MA) coupled to a single-quadrupole ESI-MS (Micromass ZQ) using an ACQUITY BEH C18 column (2.1 × 50 mm; 50°C; flow rate, 0.45 ml/min) or by analytical HPLC (Alliance, model 2695 equipped with a diode array detector, Waters) using a Jupiter C18 (5 µm, 250 × 4.6 mm) column (Phenomenex) at 1 ml/min, according to the methods described in Tables 1 and 2. The solvent system was an acetonitrile–water/mobile phase-containing TFA (0.1% v/v).

All peptides 1–19 were purified by preparative HPLC on a Waters model 2545 equipped with a single-quadrupole ESI-MS (model 3100 Waters) and a UV/MS detector (model 2487, Waters) using a XBridge C18 column (19 × 50 mm) at 20 ml/min or on a Waters model 600 on a Jupiter C18 column (10 µm, 25 cm × 10 mm) at 4 ml/min using the same solvent system reported earlier. Peptides 1–19 were purified at a purity level of >95%.

Patients and Control Subjects

We collected sera from all NMO patients (*n* = 26) followed up in the Neurology Department of the University Hospital of Strasbourg between 2006 and 2009. The disease was diagnosed according to the revised criteria of Wingerchuk et al. [26]. The presence of

Table 2. Characterization data of peptides 1–9, 13 and 16–19

Peptide no.	HPLC (R _f (min))	HPLC (purity) ^a	ESI-MS (m/z) found (calcd.) ^b
1	22.7	23–28% 8 min 5 min	101.285 ^c (102.40)
2	22.0	24–31% 8 min 5 min	100.196 ^c (101.40)
3	32.7	29–34% 8 min 5 min	115.763 ^c (121.23)
4	42.7	28–33% 8 min 5 min	115.869 ^c (121.43)
5	33.5	32–37% 8 min 5 min	117.639 ^c (123.07)
6	32.7	32–37% 8 min 5 min	125.737 ^c (125.13)
8	72.6	30–40% 8 min 30 min	162.63 ^c (165.8)
9	82.4	30–40% 8 min 30 min	160.63 ^c (164.6)
13	13.1	20–40% 8 min 20 min	129.108 ^c (127.63)
16	22.2	10–40% 8 min 20 min	100.63 ^c (101.09)
17	22.0	10–40% 8 min 20 min	104.30 ^c (104.09)
18	22.5	10–40% 8 min 5 min	146.30 ^c (144.24)
19	22.0	10–40% 8 min 5 min	111.00 ^c (109.07)

^aHPLC solvents: A: 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in H₂O; B: 0.1% TFA in CH₃CN.

^bCalculated as M.

^cDetected as [M + 2H]²⁺.

^dDetected as [M + 3H]³⁺.

NMD-IgG had been previously assessed using a cell-based assay. We also examined sera taken from the same patients at different time points to follow up the evolution of relevant reactivities. For control purposes, sera were taken from 21 NBD recruited from the Department of Neurological Sciences of the University of Florence. Written informed consent was obtained from all patients and control subjects. All sera were stored at -20°C until use.

Determination of Serum Antibodies by ELISA

The level of IgG against peptides 1–19 was first assessed in 26 sera (the most recent serum in each patient) using ELISA tests. The test was performed using 96-well polystyrene EUSA plates (Maxisorp, Nunc) coated with 0.5–1 $\mu\text{g}/\text{well}$ of peptide solution in pure carbonate buffer 0.05 M (pH 9.6) and incubated at room temperature for 3 h. After washing with saline containing 0.05% Tween 20, we used a solution of 5% BSA in phosphate-buffered saline (PBS, 100 $\mu\text{l}/\text{well}$) at room temperature for 1 h to block non-specific binding sites. After washing, we applied 100 μl of sera diluted 1:100 in 1% BSA in PBS containing 0.05% Tween 20 and incubated it at 4°C overnight. Plates were then washed four times, and 100 μl of alkaline-phosphatase-conjugated antihuman IgG (1:3000) was added and incubated for 3 h at room temperature. After the plates had been washed five times, 100 μl of a substrate solution consisting of 1 mg/ml p-nitrophenyl phosphate in pure carbonate buffer was applied. Absorbance was read in a multichannel ELISA reader at 405 nm.

The levels of IgM against peptides 1–19 were assessed by a similar process with replacement of alkaline-phosphatase-conjugated antihuman IgG by an alkaline-phosphatase-conjugated antihuman IgM at dilution of 1:1000.

All tests were performed blindly to the clinical and immunological (NMD-IgG) status.

To identify the NMD patients mostly concerned by a high reactivity against each peptide, we established a cut-off value corresponding to the mean OD of the NBD sera plus two standard deviations.

We selected the most relevant peptides defined as those for which several patients had a result higher than the cut-off value. We then searched for a correlation between the IgG reactivity against these peptides and the presence of relapse. We used only data from patients with at least three serum samples.

Statistical Analysis

Differences in IgG and IgM levels between the 26 NMD and 21 NBD sera were first evaluated using the Mann-Whitney *U*-test. Because the high number of peptides screened in this study increased the risk of false-positive results, the significance of the *P* values was set at <0.01 . Then, for each peptide with an increased IgG or IgM level, we performed Fisher's exact test to look for a correlation between the presence of reactivity against the peptide (i.e. an OD exceeding the cut-off value) and NMD-IgG positivity.

We used Student's *t* test to look for a difference in IgG reactivity against the three most relevant peptides between patients with and patients without relapse.

Results

Patients' Characteristics

We tested sera from 26 NMD patients comprising 18 women (69.2%) and eight men (30.8%). The mean age of patients was

45 ± 14.7 years (mean \pm standard deviation [SD]; range: 20 to 70). Eighteen patients (69.2%) were positive for anti-AQP4 antibodies (Table 3). A longitudinal evaluation was possible in the eight patients for whom three or more serum samples were available. These patients include 87% women with a mean age of 42 years. Twenty-eight samples were analysed (28% during a relapse).

IgG Response

Comparison of IgG levels against the different peptides showed a significant increase in NMD sera for three peptides only: MBP(156–175) (peptide 3, $p < 0.001$), CSF114(G)G (peptide 11, $p = 0.008$) and PDH (167–186) (peptide 18, $p < 0.001$) (Figure 1). We noted a specific immune response in NMD against peptide 3 but not against its dextranated analogue (peptide 4) or the other MBP sequences such as peptides 1 and 2. We found no difference between NMD and NBD subjects concerning the reactivities against the derivatives of hMOG (25–45) (peptides 5 and 6) or hMOG(0–55) (peptides 8 and 9). We observed a higher reactivity in NMD against peptide 11 but not against its unglycosylated analogue (peptide 10). In addition, the CSF114 derivative peptides 12–17, characterized either by various sugar moieties or by different β -turn structures, were not able to detect an increased level of IgG in NMD. Another significant difference in IgG levels between the two sera groups was observed in the response against the unlipoylated peptide 18. By contrast, the reactivity against its lipoylated analogue (peptide 19) was similar in NMD and NBD sera.

Similarly, we found a significant proportion of NMD patients with a reactivity exceeding the cut-off value (mean value of NBD plus 2 standard deviations) only for the same three peptides (Figure 2). This was the case in 26.9% of NMD sera for peptide 3, 38.5% for peptide 11 and 38.5% for peptide 18. By contrast, the proportion of NBD sera exceeding the cut-off for the same peptides remained lower or equal to 10%.

We did not find any significant correlation between the NMD-IgG positivity of NMD patients and the presence of high IgG reactivity against peptides 3, 11 and 18.

IgM Response

Lohf et al. [11] found increased IgM levels against CSF114(G)G (peptide 11) in 50% of relapsing–remitting MS patient. We therefore investigated IgM levels in NMD and NBD sera against the three peptides 3, 11 and 18.

We observed a decrease in IgM reactivity against the three peptides in NMD patients compared with NBD (Figure 3), but which was not statistically significant.

Longitudinal Evaluation

We searched for a correlation between the onset of clinical relapse and the IgG levels against the three relevant peptides 3, 11 and 18, which could be helpful for the prediction of relapses in NMD patients. We observed an increased reactivity against CSF114(G)G (peptide 11, $p = 0.04$) (Table 4). Such a link is exemplified in Figure 4 for two patients.

Discussion

To date, the immune response in NMD is mainly characterized by the production of anti-AQP4 antibodies (NMD-IgG), but, using a large (for this rare disease) cohort of NMD sera, we have shown that another range of reactivity can be detected. Indeed, 26.9%

Patient no.	Gender (M/F)	Age (years)	NMO-Ig	Peptide 2	Peptide 11	Peptide 18
P1	F	34	-	-	-	+
P2	F	32	+	-	+	-
P3	F	30	+	-	+	-
P4	M	64	+	-	+	-
P5	F	20	+	-	+	-
P6	F	61	+	-	-	-
P7	F	56	+	+	-	+
P8	F	52	+	-	+	-
P9	F	30	-	+	-	-
P10	F	62	+	+	-	+
P11	F	36	-	+	+	+
P12	M	41	-	-	-	+
P13	M	38	-	-	+	+
P14	F	47	+	+	-	+
P15	M	40	+	-	+	+
P16	M	39	+	+	+	+
P17	F	64	-	-	-	-
P18	F	23	-	-	-	-
P19	F	34	+	-	-	-
P20	F	63	+	-	-	-
P21	M	44	-	-	-	-
P22	F	39	+	-	-	-
P23	M	70	+	-	-	-
P24	F	20	+	-	-	-
P25	F	23	+	+	+	+
P26	M	46	+	-	-	-
% seropositive patients			69.2	26.0	38.5	38.5
% seropositive patients in the anti-AQP4+ group				27.8	44	33.3
% seropositive patients in the anti-AQP4- group				2.5	12.5	5.0

Abbreviations: M, male; F, female; +, seropositive; -, seronegative. % seropositive patients in the anti-AQP4+ group: percentage of patients positive for anti-AQP4 Abs who presented a significant reactivity against each peptide; % seropositive patients in the anti-AQP4- group: percentage of patients negative for anti-AQP4 Abs who presented a significant reactivity against each peptide.

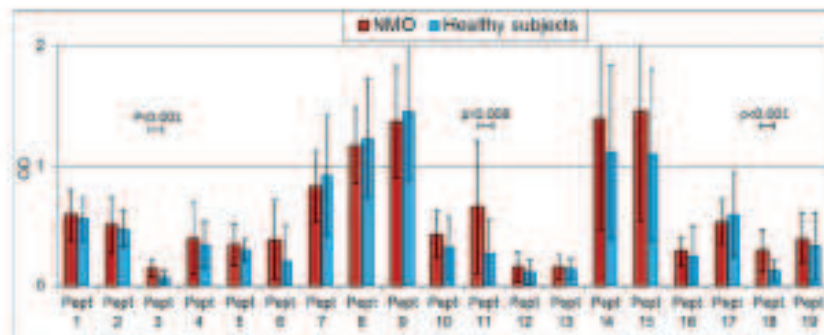


Figure 1. IgG response in NMO and NBD sera against peptides 1–19. Legend A: Mean optical density (OD) \pm 1 standard deviation of the NMO group is compared with mean OD \pm 1 standard deviation of the NBD group for each peptide or glycopeptide 1–19 (see Table 1), p values < 0.05 (corresponding to a statistically significant difference) are indicated.

of NMO patients presented a high level of IgG reactivity against MBP(156–175) (peptide 3), 88.5% against CSF114/Glc (peptide 11) and 38.5% against unglycosylated PDH(167–186) (peptide 18) (Figure 1B).

A reactivity against MOG and MBP proteins was previously described in NMO [18], but the epitopes involved were not

identified. We found that the patients' sera did not have any reactivity against MBP(49–68) (peptide 1) and its N-glycosylated analogue (peptide 2), demonstrating that this MBP sequence is not relevant for NMO. On the contrary, a significant difference between NMO patients and NBD was observed using the unmodified sequence MBP(156–175) (peptide 3) but not with its



Figure 2. Proportion of abnormal subjects in the NMO and NBD groups. Legend: This figure shows the percentage of NMO and NBD sera exceeding the cut-off value. NMO indicates neuromyelitis optica; NBD, normal blood donors.

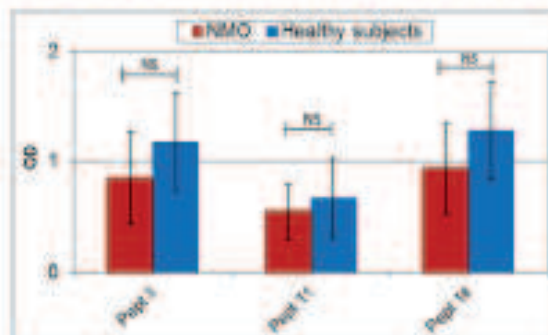


Figure 3. IgG response in NMO and NBD sera against peptides 3, 11 and 18. Legend: Mean optical density (OD) \pm 1 standard deviation of the NMO group is compared with mean OD \pm 1 standard deviation of the NBD group for peptides 3, 11 and 18 (see Table 3). NS indicates no significant difference (i.e. $p > 0.05$).

citruinated analogue (peptide 4). Furthermore, the high level of reactivity against CSF114(Glc) (peptide 11) suggests the presence of autoantibodies targeting [Asn¹¹(Glc)]rMOG(30–50) and [Asn¹¹(Glc)]rMBR53–99 because cross recognition of these antigens has been demonstrated in MS [10].

We also assessed the reactivity against peptide sequences derived from a mitochondrial and non-brain-specific protein. Although an immune response against several mitochondrial enzymes was reported in MS [27] and against PDH in EAE [23], the role of these proteins in MS or NMO has been poorly explored up to now. The mechanisms underlying the high reactivity against PDH in NMO remain unclear. In EAE, the onset of this reactivity has been attributed to a possible molecular mimicry between bacterial and autoantigens or an abnormal expression of the inner mitochondrial enzyme on the surface of cells [28].

Neither can we rule out the hypothesis of a structural similarity between peptide 18 and other antigens. In fact, a β -turn structure has been described in the E1 subunit of PDH complex [9], and the structure of peptide 18 is still under investigation by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy to confirm if the free peptide maintains this structure, which could explain similarities with peptide 11. However, the marked difference between peptides 11 and 18 in terms of amino acid sequence and nature of PTMs does not argue in favour of a structural similarity. Furthermore, as we did not find any correlation between NMO-IgG positivity and reactivity against the three positive peptides 3, 11 and 18, a structural similarity between these peptides and the epitope of AQP4 recognized by NMO-IgG is highly improbable (Table 3).

Our results indeed show that even subtle changes in peptide structure, especially by adding PTMs, strongly interfere with their recognition by NMO sera. The immune response in patients against untruncated MBP(156–175) peptides (peptide 3) or PDH(167–186) (peptide 18) is not found against their modified analogues (peptides 4 and 19, respectively). Such a decrease in the reactivity against citruinated peptide has already been described in MS [29] and the same lack of reactivity of the citruinated peptide 4, compared with its unmodified counterpart peptide 3, was recently described in MS (Papini et al., unpublished data). The use of CSF114 analogues (peptides 10, 12 and 13), in which the glucose was removed or replaced by other sugar moieties, precluded the recognition of the peptides by IgG (Figure 1A). In addition, changes in the β -turn structure of CSF114(Glc) (peptide 11) resulted in loss of specificity: peptides 14 and 15 detected significant levels of IgG in both NMO and NBD sera and showed no significant difference between the two groups. Similarly, rMOG(30–55) derivatives (peptides 7–9) were most likely recognized by antibodies unrelated to Asn(Glc) and irrelevant to NMO pathophysiology, and thus, they were not able to differentiate NMO patients from NBD.

Table 4. Impact of relapses on the IgG levels against peptides 3, 11 and 18

	Patients with relapses	Patients without relapses	P
Peptide 3 (OD, mean \pm SD)	0.097 \pm 0.01	0.107 \pm 0.08	NS
Peptide 11 (OD, mean \pm SD)	0.37 \pm 0.16	0.39 \pm 0.42	0.04
Peptide 18 (OD, mean \pm SD)	0.105 \pm 0.04	0.117 \pm 0.08	NS

Abbreviations: peptide 3 (OD, mean \pm SD), IgG reactivity against the peptide 3 expressed in terms of mean \pm standard deviation of the optical density; P, alpha risk of the comparison between samples taken during a relapse and samples not taken during a relapse; NS, not significant.

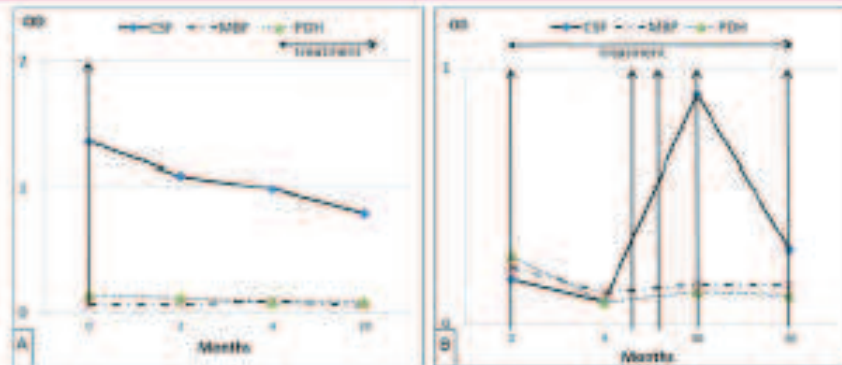


Figure 4. Comparison of reactivity against peptides 3, 11 and 18 and activity of the disease in two patients. Legend: Evolution of IgG levels against peptides 3, 11 and 18 in patient 11 (A) and 17 (B). OD: optical density; MBP indicates myelin basic protein peptide (156–175), peptide 3: CSF14 (Glc, peptide 11); PDH: pyruvate dehydrogenase peptide (167–186), peptide 18: vertical arrow, relapse. Horizontal arrows: presence of a treatment (rituximab followed by mycophenolate mofetil in patient 11; mycophenolate mofetil alone in patient 17).

It is still unclear whether the autoantibodies against the new targets described in our study are really involved in the NMO disease process or if they are only Ig markers for the presence of the disease. Passive transfer in animals could be performed to gain further insight into this issue [30,31]. Nevertheless, we believe that the new targets described can be useful in differentiating NMO from MS patients. This is particularly true for CSF14 (Glc) (peptide 11) because it has been shown that the IgM but not the IgG levels against this peptide are elevated in MS [11] and we have found that, in NMO, IgG levels are increased. The relevance of the anti-CSF14(Glc) reactivity was also confirmed by its correlation with the onset of relapse. It was reported that the relapses were frequently accompanied by a rise in serum anti-AQP4 Ab concentrations [17,32]. However, this correlation is not strong enough to justify treatment changes based only on anti-AQP4 Ab level variations, and a biomarker of disease activity predicting the relapses would be of particular interest for therapeutic purposes. A proteomic analysis of the targets of the immune response in NMO as already performed in EAE [23] and MS [27] would also be interesting.

In conclusion, our results suggest that AQP4 is not the unique target in NMO, and other myelin-related [CSF14(Glc) and MBP (156–175)] or non-myelin-related [PDH(167–186)] targets could be found in this disease. Longitudinal studies are however warranted to confirm these results and determine the clinical usefulness of the potential biomarkers.

Acknowledgements: We acknowledge the Académie Nationale de Médecine (Paris, France) for a grant for JBC, ANR Chaire d'Excellence 2009–2013 to AMP and Fondazione Ente Cassa di Risparmio di Firenze (Italy) for a grant to PeptiLab, University of Florence (AMP and PR).

References

- 1 Egger M, Zettl UK, Newek G. Autoantibodies in autoimmune diseases. *Curr Pharm Sci* 2010; 16(7): 1634–1643.
- 2 Prujsin GJ, Wolk A, Van Veenboij WO. The use of chitinized peptides and proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010; 12(1): 203.
- 3 Howard M, Fuller C, Broadhurst RW, Petham BK, Tang X, Quinn J, Diamond AG, Newman SJ. Three-dimensional structure of the major autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1998; 115(7): 139–146.
- 4 Quinn J, Diamond AG, Palmer JM, Broadhurst RW, James OF, Newman SJ. Lipoylated and arylsulfonylated domains of human PDC-E2 as autoantigens in primary biliary cirrhosis: significance of lipoyl attachment. *Hepatology* 1993; 18(6): 1304–1311.
- 5 Alvarez S, Fedele A, Caviglioli, Takano S, Fenucci G. Chitinization: the loss of tolerance and development of autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Neuroscience* 2008; 80(2): 85–94.
- 6 Pappas AM. The use of post-translationally modified peptides for detection of biomarkers of immune-mediated diseases. *J Rept Sci* 2009; 15(10): 627–628.
- 7 Mikas S, Conrath C. Natural history of multiple sclerosis risk factors and prognostic indicators. *Can Opin Neurol* 2007; 20(3): 269–274.
- 8 Mazzanti S, Maki S, Vergelli M, Rossi G, Nardi E, Mazzanti S, Chelli M, Lodi F, Gianninchi M, Piro F, Mariani L, Pappas AM. A synthetic glycopeptide of human myelin oligodendrocyte glycoprotein to detect antibody responses in multiple sclerosis and other neurological diseases. *Strope Med Chem Lett* 1999; 9(2): 167–172.
- 9 Costantini A, DiLuna AM, Nardi E, Pappas AM, Rossi F. Conformational analysis of a glycosylated human myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide epitope able to elicit antibody response in multiple sclerosis. *J Med Chem* 2007; 44: 2378–2381.
- 10 Lodi F, Mazzanti S, Costantini A, Bonetti S, Salatino G, Mazzanti S, DiLuna AM, Novellino E, Pazzagli M, Lovato L, Alcaro MC, Perini E, Pozzo-Caneo MC, Nuti F, Battistini L, Borvillini G, Chelli M, Rossi F, Pappas AM. An N-glycosylated peptide detecting disease-specific autoantibodies: biomarker of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(29): 10275–10278.
- 11 Lodi F, Mazzanti S, Pazzagli M, Perini E, Alcaro MC, Sabatino G, Lanzillo R, Brescia Mora V, Santoro L, Gagliardi C, Galgani S, DiLuna MM, Zupoli V, Sotgiu S, Pugliesi M, Rossi F, Chelli M, Pappas AM. The glycopeptide CSF14(Glc) detects serum antibodies in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2005; 167(1–2): 111–117.
- 12 Alcaro MC, Lodi F, Migliorini P, Chelli M, Rossi F, Pappas AM. Peptides as autoimmune diseases antigenic probes. *Chem Today* 2007; 25: 14–16.
- 13 De Saze L, Lebrun C, Stojkovic T, Penty D, Chabal M, Vennart P. Is Devic's neuromyelitis optica a separate disease? A comparative study with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2003; 9: 521–525.
- 14 Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer T, Pittock SJ, Lucchinetti G, Fujita S, Nakashima J, Weinshenker BG. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 2004; 364: 2106–2112.
- 15 Lennon VA, Kryzer T, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR. IgG marker of optic-sphincter multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med* 2005; 202: 473–477.
- 16 Manginier R, de Saze L, Mikas S, Durand-Dubief F, Zephir H, Wehrhahn F, Caba F, Caillon G, Hérinot L, Conrath C. NMO-IgG and Devic's neuromyelitis optica: a French experience. *Mult Scler* 2008; 14(4): 440–445.
- 17 Jarius S, Abouzaid E, Waters P, Kuenz S, Hauser A, Berger T, Lang W, Reindl M, Vincent A, Kribbenbach W. Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica. *Brain* 2008; 131(11): 3072–3080.

- 18 Haase GG, Schmidt S. Detection of brain-specific autoantibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein, SMO2beta and myelin basic protein in patients with Devic's neuromyelitis optica. *Neurosci. Lett.* 2001; **307**(2): 111–113.
- 19 Laiter PH, Menge T, Raman I, Crow RA, Gershin CP. Identification of new serum autoantibodies in neuromyelitis optica using protein microarrays. *Neurology* 2006; **67**(3): 176–177.
- 20 Corveia I, Fiol M. Activation of humoral immunity and autoantibody in neuromyelitis optica. *Neurology* 2004; **63**(12): 2163–2170.
- 21 Motcankin MA, Mastromarino FG, Wood JO. The role of oligodendrocyte protein suggests a novel mechanism in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurochem. Res.* 2007; **32**(2): 251–256.
- 22 Yermans J, Furlay SP, Damer O, James OF, Muthew D, Bevan DR. Primaryillary antibodies: identification of two major M2 mitochondrial autoantigens. *Lancet* 1996; **348**(9194): 1067–1070.
- 23 Zephir H, Almeria L, El Behi M, Durrant P, de Seze J, Steibel J, Trifiroff E, Dubucquoi S, Desautel F, Vermersch P, Prineas L, Lefranc D. Diversified serum IgG response involving nonmyelin CNS proteins during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 2006; **179**(1–2): 53–64.
- 24 Van de Water L, Fregieu O, Davis P, Anst A, Damer O, Leung P, Coppal R, Gershwin ME. Autoantibodies of primaryillary disease recognize dihydropyrimidine acetyltransferase and hN1et enzyme function. *J. Immunol.* 1993; **151**(7): 2321–2324.
- 25 Rinaldi J, Nuti F, Pizzo-Carraro M-C, Barbetti F, Kolevniks B, Seminski Z, Chelli M, Papini AM. A convenient microwave-assisted synthesis of N-glycosyl amino acids. *Tetrahedron Lett.* 2007; **48**(16): 2901–2904.
- 26 Wang Zhai DM, Larson VA, Pittack SJ, Lachyetti CF, Weinshanker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 2006; **66**(7): 1435–1440.
- 27 Almeria L, Lefranc D, Drobacq H, de Seze J, Dubucquoi S, Vermersch P, Prineas L. New antigenic candidates in multiple sclerosis identified by serological proteome analysis. *Proteomics* 2004; **4**(7): 2194–2194.
- 28 Luo A, Iveremid P, Mackay B, Prince H, Zhang BQ, Gershwin ME. Etiopathogenesis of primaryillary disease. *World J. Gastroenterol.* 2006; **14**(7): 1326–1337.
- 29 De Seze J, Dubucquoi S, Lefranc D, Vireopalan F, Naze S, Dutoit V, Vermersch P, Prineas L. IgG reactivity against oligodendrocyte myelin basic protein in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2001; **117**(1–2): 149–155.
- 30 Kurokita M, Nakatsuji Y, Komura T, Moriya M, Takata K, Okano T, Katsunaga A, Kojima K, Yoshikawa H, Sakoda S. Neuromyelitis optica positive transfer to rats by human immunoglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; **388**(4): 623–627.
- 31 Brad M, Laxman DH. Anti-aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica: how to prove their pathogenicity. *Annals of the NY Acad. Sci.* 2008; **115**(1): 75–78.
- 32 Kim W, Lee JE, Li XJ, Kim SH, Han BG, Lee BJ, Kim JK, Choi K, Kim HJ. Quantitative measurement of anti-aquaporin-4 antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay using purified recombinant human aquaporin-4. *Mol. Cell.* 2012; **18**: 578–586.

Commentaires:

a) Résultats principaux

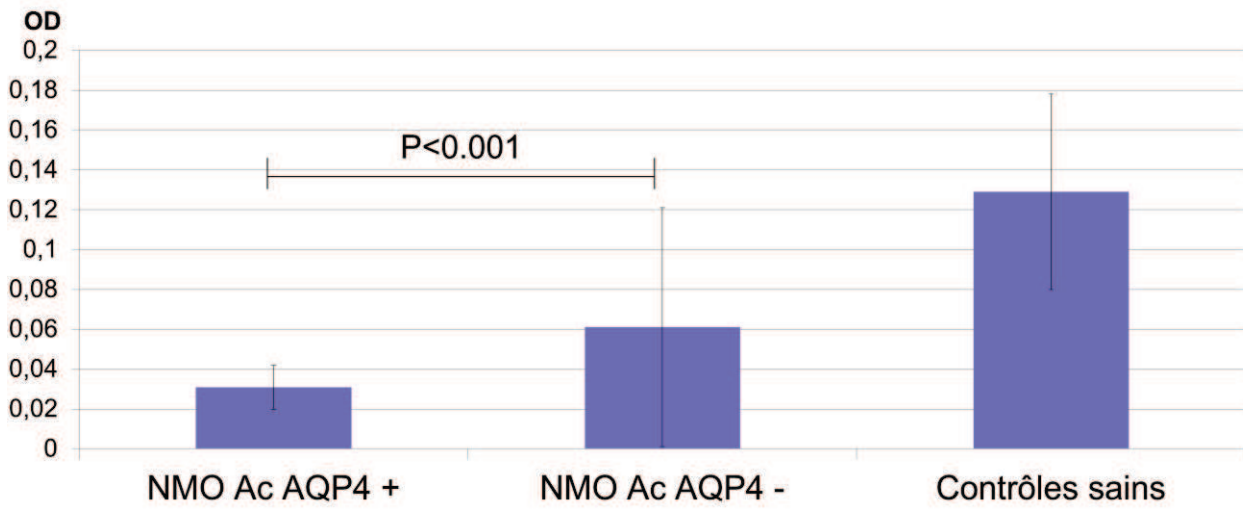
Les anticorps anti-AQP4 ne sont pas capables de déclencher seuls la maladie (Mitsdoerffer et al., 2013). Nous avons donc voulu rechercher une éventuelle réactivité contre de nouveaux antigènes à la fois pour proposer de nouveaux marqueurs utilisables pour le diagnostic et/ou le suivi de la NMO et pour suggérer de nouvelles pistes physiopathologiques. Nous avons sélectionné une librairie de peptides à partir de travaux antérieurs et avons détecté une réactivité significative envers 3 peptides chez les patients NMO par rapport aux contrôles sains. La sensibilité pour le diagnostic de NMO de chaque marqueur isolé est faible (de 29 à 38%) mais pourrait être augmentée par l'emploi des marqueurs de façon groupée. En effet 70% des patients séronégatifs pour l'AQP4 ont présenté une réactivité contre au moins un des 3 peptides. De plus la réactivité contre le CSF 114 glucosylée semblait corrélée à l'activité de la maladie ce qui est particulièrement intéressant car il n'existe pour l'instant aucun marqueur vraiment fiable de l'activité de la maladie (cf article 1 de cette thèse). Cette étude devra être confirmée sur de plus larges échantillons et la spécificité de ces réactivités mieux évaluées.

b) Données récentes sur la présence d'anticorps anti-MOG

Kitley et al. ont récemment rapporté la présence d'anticorps anti-MOG chez 4 patients parmi un groupe de 27 atteints de NMO. Ces quatre patients étaient tous séronégatifs pour les anticorps anti-AQP4. Les auteurs ont suggéré que les anticorps anti-AQP4 pourraient jouer un rôle de marqueur chez les patients négatifs pour les anticorps anti-AQP4 (Kitley et al., 2012). Comme les auteurs avaient utilisé la MOG entière nous avons mené un nouveau travail pour répliquer leurs résultats qui a été présenté sous forme de poster au congrès de l'ECTRIMS (European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis) :

Poster P206 : JB Chanson, G Pacini, N Collongues, G Rudolf, E Trifilieff, P Rovero, J De Seze, AM Papini. Absence of reactivity against myelin oligodendrocyte glycoprotein in neuromyelitis optica.

Nous avons analysé par ELISA (protocole similaire à celui de l'article 4) la concentration en IgG reconnaissant la MOG 1-117 recombinante de rat dans un groupe de 21 de nos patients (dont 8 séronégatifs pour les anticorps anti-AQP4). Il existait effectivement un taux d'IgG supérieur dans le groupe des patients séronégatifs (NMO Ac AQP4 -) par rapport à ceux séropositifs (NMO Ac AQP4 +) mais les deux groupes présentaient une réactivité significativement inférieure aux contrôles sains. Aucun patient NMO ne présentait de réactivité significativement supérieure aux sujets sains (plus de la moyenne des sujets sains plus deux déviations standard).

Figure 8 : Concentration d'IgG contre la MOG₁₋₁₁₇ chez les patients NMO

Légende : la concentration des IgG contre la MOG 1-117 recombinante de rat a été mesurée par ELISA et est exprimée par la densité optique (DO). NMO Ac AQP4 +/- : patients NMO séropositifs/séronégatifs pour les anticorps anti-AQP4.

La recherche de réactivité contre la MOG de grande taille semble donc moins prometteuse que la recherche de réactivité contre des peptides courts bien définis.

Cela est justement confirmé par un article publié encore plus récemment fin 2012 (Xu et al., 2012). Ses auteurs ont synthétisé 25 peptides de 7-8 acides aminés qui représentent chacun un morceau de la MOG. Ils ont ensuite recherché en ELISA la présence d'IgG envers chacun de ces peptides dans les sérums de patients NMO et SEP et de sujets sains. Il existait chez les patients NMO une tendance à l'augmentation de la réactivité envers tous les peptides par rapport aux sujets sains mais cette augmentation n'était vraiment significative qu'envers le peptide représentant le segment 27-35. Il existait même une relation entre la présence d'une poussée et la concentration des IgG contre ce peptide précis. Il s'agit justement de la zone dont la forme est mimée par le peptide synthétique CSF114. Cela confirme que c'est cette zone qui est la plus intéressante dans la physiopathologie de la NMO et/ou pour servir de marqueur diagnostique ou de l'activité de la maladie.

Les auteurs retrouvent cependant aussi une augmentation des IgG contre ce peptide dans la SEP et concluent que l'utilisation de cette réactivité pour différencier la SEP de la NMO sera difficile. Néanmoins ils n'ont pas mesuré le taux d'IgM qui pourrait faire la différence entre SEP et NMO (Lolli et al., 2005) ni recherché l'effet des modifications post-traductionnelles qui pourraient permettre de préciser leurs résultats et d'accroître leur utilité.

3) Recherche de marqueurs métaboliques

Article 5 (en révision dans le Multiple Sclerosis Journal): Moussallieh FM, Elbayed K, **Chanson JB**, Rudolf G., Piotto M, de Seze J, Namer IJ. Serum Analysis by ¹H Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy: a new tool for distinguishing neuromyelitis optica from multiple sclerosis

SERUM ANALYSIS BY ¹H NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY: A NEW TOOL FOR DISTINGUISHING NEUROMYELITIS OPTICA FROM MULTIPLE SCLEROSIS

F.-M. MOUSSALLIEH, PharmD, PhD^{1,2}, K. ELBAYED, PhD¹, J.B. CHANSON, MD^{3,4},
G. RUDOLF, PhD^{3,4}, M. PIOTTO, PhD^{1,5}, J. DE SEZE, MD, PhD^{3,4}, I.J. NAMER, MD, PhD^{1,2}

¹*ICube, Université de Strasbourg/CNRS UMR 7357, FMTS – Faculté de Médecine, 4 rue Kirschleger, 67085
Strasbourg Cedex, France.*

²*Service de Biophysique et Médecine Nucléaire and* ³*Service de Neurologie, Hôpitaux Universitaires de
Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, 1 avenue Molière, 67098 Strasbourg Cedex 09, France.*

⁴*INSERM U1119, FMTS – Faculté de Médecine, 4 rue Kirschleger, 67085 Strasbourg Cedex, France.*

⁵*Bruker BioSpin, 34 rue de l'industrie, 67160 Wissembourg, France*

Running Head: Serum Analysis by ¹H NMR of MS and NMO

Correspondence to:

F.-M. Moussallieh, PharmD, PhD

Service de Biophysique et de Médecine Nucléaire,

Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

Hôpital de Hautepierre,

1, avenue Molière, 67098 Strasbourg Cedex 09, France

Tel.: +33.388.12.84.43

Fax: +33.388.12.83.42

E-mail: fmmoussallieh@unistra.fr

ABSTRACT

Background: Neuromyelitis optica (NMO) and multiple sclerosis (MS), two inflammatory demyelinating diseases, are characterized by different therapeutic strategies. Currently, the only biological diagnostic tool available to distinguish NMO from MS is the specific serum autoantibody targeting aquaporin 4, but its sensitivity is low.

Objective: Therefore, we aimed to assess the diagnostic accuracy of metabolomic biomarker profiles in these two neurological conditions compared to control patients.

Methods: Serum spectra ($n=133$) were acquired using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Multivariate pattern recognition analysis was used to identify disease-specific metabolite biomarker profiles.

Results: Among the metabolites responsible for the discrimination of serum samples from the three different groups, the most discriminant were scyllo-inositol, which discriminated the MS group from the other groups, and acetate, which discriminated the NMO group from the two other groups. These two metabolites were quantified, and we found a significant difference in their respective average concentrations among the three different groups.

Conclusion: Consequently, we suggest a new analytical methodology based on the determination of the serum concentrations of these two metabolites using nuclear magnetic resonance spectroscopy. This new type of analysis can help clinicians make a more precise diagnosis and therefore choose the most appropriate strategy for treating their patients.

Key words: Multiple sclerosis, Neuromyelitis optica, metabolomics, serum, Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy

INTRODUCTION

Neuromyelitis optica (NMO), or Devic syndrome, is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS), characterized by severe attacks of optic neuritis and myelitis. Whether NMO is a variant of multiple sclerosis (MS) or a separate disease has long been debated (De Seze et al., 2003; Wingerchuk et al., 2007b). Today, NMO is recognized as a distinct clinical entity, distinguished from classical MS by clinical, neuroimaging and serological criteria (Wingerchuk et al., 2006b). The presence of a highly specific serum autoantibody marker (NMO-IgG) differentiates NMO from MS and has helped define an NMO spectrum (Lennon et al., 2004a). NMO-IgG targets aquaporin-4 (AQP4), the main channel that regulates water homeostasis in the CNS (Lennon et al., 2005a). However, the sensitivity of this antibody is relatively low (Marignier et al., 2008), between 50 and 70% and there is definitely a need to find a better marker of this disease (2012; Polman et al., 2005). As treatments usually used in NMO and MS differ substantially, the differential diagnosis between these two diseases is of uttermost importance (Papeix et al., 2007). Besides NMO-IgG, there are currently no other biological diagnostic tools to accomplish this task.

To date, very few studies have been conducted by ^1H NMR spectroscopy on serum (Mehrpour et al., 2013; Sinclair et al., 2010) and CSF samples (Sinclair et al., 2010) (Lutz and Cozzone, 2011; Lutz et al., 2007; Simone et al., 1996) of MS patients and no study has been reported on serum samples of NMO patients by this technique.

In this manuscript, we present a ^1H NMR metabolomic approach to look for metabolic markers capable of differentiating NMO from MS and healthy controls (2012).

MATERIALS AND METHODS

Patient population

Forty-seven MS patients and 44 NMO patients were included in this study. They were clinically assessed in the Department of Neurology of the Strasbourg University Hospitals (France), between 2005 and 2011. The NMO patients fulfilled the revised criteria of Wingerchuk (Wingerchuk et al., 2006b) and the MS patients satisfied the criteria of McDonald revised in 2005 (Polman et al., 2005). All NMO and MS patients had a relapsing remitting disease. The control group consisted of 42 healthy subjects, matched for age and gender, recruited among the personnel of the Strasbourg University Hospitals. All selected subjects had no acute or chronic pathologies. Permission for the study was obtained from the local research ethics committees and all participants gave written informed consent.

The MS patients were not treated or treated by natalizumab and NMO patients were not treated or treated by various immunosuppressants including mycophenolate mofetil, azathioprine, cyclophosphamide or rituximab.

Serum Samples

Blood samples were collected on 5-mL dried tubes and transported on ice before being promptly centrifuged at 2000 rpm for 10 min and aliquoted. All samples were stored at -80°C and analyzed after a maximum of two freeze-thaw cycles. Eighteen microliters of each patient's serum (previously thawed at room temperature) were introduced into a 30- μL disposable Kelf insert: 8 μL of deuterium oxide were then added to provide a lock frequency.

Data acquisition

HRMAS spectra(Lippens et al., 1999) were recorded on a Bruker Avance III 500 spectrometer operating at a proton frequency of 500.13 MHz. The spectrometer is equipped with a 4-mm double-resonance (^1H , ^{13}C) gradient HRMAS probe. All NMR experiments were conducted on samples spinning at 3502 Hz in order to keep the rotation sidebands out of the spectral region of interest. For each serum sample, a one-dimensional proton spectrum using a Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) pulse sequence(Meiboom and Gill, 1958) was acquired. This sequence allows a better observation of the metabolites by reducing the intensity of lipid signals in the spectrum. A total of 1024 transients were acquired, resulting in an acquisition time of 76 min. We chose this relatively large number of transients to obtain a sufficient signal-to-noise ratio on the small volume of serum used for the NMR measurement. It is important to note that the ^1H NMR experiments used to study serum samples in this manuscript do not necessarily have to be carried out on a HRMAS equipment but can also be performed using a regular high resolution NMR probe. The advantage of using a HRMAS probe is that a sample volume of only 30 μl can be used when a high resolution NMR probe can require a volume of 600 μl .

Free induction decays were multiplied by an exponential window function of 0.3 Hz prior to Fourier transformation and were corrected for phase and baseline distortions using TopSpin 2.1 (Bruker GmbH, Germany). The chemical shift was referenced to the peak of the methyl proton of L-lactate at 1.33 ppm. For the purpose of confirming resonance assignments, complementary 2D homonuclear ^1H - ^1H Total Correlation Spectroscopy (TOCSY) and ^1H - ^{13}C Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC) experiments were recorded on 8 samples, as previously described(Piotto et al., 2013).

Multivariate statistical analysis

The spectral region between 4.7 and 0.5 ppm of each 1D CPMG NMR spectrum was automatically binned into 0.01-ppm regions using the AMIX 3.8 software (Bruker GmbH, Germany). This procedure minimizes the effect of peak shifts due to pH variations. The peak integral within each 0.01-ppm region was computed

and normalized with respect to the total integral of the spectrum in the 4.7- to 0.5-ppm region. This process generated an X data matrix containing 421 columns (chemical shifts) and 133 rows (corresponding to the 47 serum samples from patients affected by MS, to the 44 serum samples from patients affected by NMO and finally to the 42 control serum samples).

Data sets were then imported into the SIMCA (“Soft Independent Modeling of Class Analogy”) P 11.0 software (Umetrics AB, Umeå, Sweden) and preprocessed using unit variance scaling of the X columns by weighing each integral region by $1/SD_k$, where SD_k represents the standard deviation of the k^{th} column in the X matrix. The X matrix was then analyzed using principal component analysis (PCA). This procedure quickly evaluates the quality of the data and identifies possible outliers. After the PCA analysis, partial least-square discriminant (PLS-DA) analysis was conducted in order to build a model that optimizes the separation between different classes of patients. PLS-DA(Tenenhaus, 1998) is a technique used to find the fundamental relations between two matrices (X representing the data and Y representing the patient’s class, typically 0 or 1 in a two class problem). A PLS-DA model tries to find the multidimensional direction in the X space that explains the maximum multidimensional variance direction in the Y space. The axis represented on a PLS-DA model corresponds to a linear combination of the variables (the buckets of the NMR spectrum or the metabolite concentrations in our case). The first component of the PLS-DA model (horizontal axis) is the most important to explain this separation. The exact number of components of a PLS-DA model is determined by cross-validation(Westerhuis et al., 2008).

Metabolite quantification

The two most discriminant metabolites were quantified using an external reference standard of lactate and the Pulcon principle(Wider and Dreier, 2006). First, spectra were automatically realigned and locally baseline-corrected for these two spectral regions of interest by an in house program(Benahmed et al., 2013)

using MATLAB 7.0 (Mathworks, Natick, MA, USA). Spectra were then normalized according to sample weight. Peaks of interest were automatically defined by another in house program. Peak integration was then compared to the peak of interest obtained with the lactate reference and was corrected according to the number of protons. Results were calculated in nmol.mg^{-1} and then transformed to be expressed in $\mu\text{mol.L}^{-1}$ of serum. Chemical shifts for regions of interest were adapted from the literature. For each of the two metabolites, the regions of interest in ppm and the number of protons per chemical group were defined with the following chemical shifts: scyllo-inositol (ScI; [3.346; 3.362], CH), acetate (Ace; [1.915; 1.925], CH_3).

Univariate statistical analyses

Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed to test the sensitivity/specificity of scyllo-inositol and acetate in discriminating between the three different groups. The areas under the ROC curves, their statistical comparison (P value) cut-off values, sensitivity and specificity were calculated. Statistical analyses were carried out with GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). We used also a non-parametric Mann-Whitney U test to search a correlation between the concentrations of the two relevant metabolites and patients' characteristics, i.e. positivity or negativity of anti-AQP4 antibodies (anti-AQP4 Ab status), disease duration and presence of a treatment. The level of significance was set $p=0.05$.

RESULTS

Patients

The characteristics of the MS patients, the NMO patients and the control group are summarized in Table 1.

Preliminary multivariate statistical analyses

The PCA analysis of the CPMG data applied to the 4.7- to 0.5-ppm chemical shift range and using the entire patient population was not able to discriminate either of the two pathologies considered from healthy serum samples in a statistically significant manner. A few outliers were however identified by this analysis. In this type of study, outliers can occur because sample pollution due to EDTA or by large signals from the different lipoproteins. In our study, 16 serum samples (five samples from the NMO group, six samples from the MS group and five samples from the control group) out of a total of 133 were removed, leaving a cohort of 117 serum samples.

The PLS-DA analysis of the CPMG data was initially performed on the same population of 117 serum samples. As for the PCA analysis, buckets within the 4.7- to 0.5-ppm range were initially used. To identify the main metabolites at the origin of the discrimination between the two patient groups for the three different hypotheses tested: NMO vs. MS, NMO vs. control group and MS vs. control, VIP plots (Tenenhaus, 1998) (“variable of importance for the projection”) were calculated for each model using SIMCA-P 11.0.

PLS-DA model for discriminating NMO patients from MS patients

Serum samples were first assigned to a Y column matrix as being either NMO (value of 0) or MS serum samples (value of 1). The analysis generated a two-component PLS-DA model characterized by a faithful

representation of the Y data ($R^2Y = 0.85$) and by a very good cumulative confidence criterion of prediction ($Q^2 = 0.80$). The score plot of the PLS-DA model (Fig. 1A) showed a very clear separation of the two sets of serum samples. The MS group was mainly characterized by the following discriminant metabolites: scyllo-inositol and glutamine. The NMO group was mainly characterized by the following discriminant metabolites: acetate, glutamate, lactate and lysine.

PLS-DA model for discriminating MS patients from control patients

Serum samples were initially assigned to a Y column matrix as being either MS (value of 0) or control serum samples (value of 1). The analysis generated a two-component PLS-DA model characterized by a faithful representation of the Y data ($R^2Y = 0.84$) and, more importantly, by a very good cumulative confidence criterion of prediction ($Q^2 = 0.68$). The score plot of the PLS-DA model (Fig. 1B) showed a very clear separation of the two sets of serum samples. The MS group was mainly characterized by the following discriminant metabolites: scyllo-inositol and lysine. The control group was mainly characterized by the following discriminant metabolites: glutamine and valine.

PLS-DA model for discriminating NMO patients from control subjects

Serum samples were initially assigned to a Y column matrix as being either NMO (value of 0) or control serum samples (value of 1). The analysis generated a two-component PLS-DA model characterized by a faithful representation of the Y data ($R^2Y = 0.77$) and by a very good cumulative confidence criterion of prediction ($Q^2 = 0.72$). The score plot of the PLS-DA model (Fig. 1C) showed a very clear separation of the two sets of serum samples. The NMO group was mainly characterized by the following discriminant metabolites: acetate, glutamate and lactate. The control group was mainly characterized by the following discriminant metabolites: glutamine, lysine and valine.

Among all these discriminant metabolites, we decided to select two candidate biomarkers: scyllo-inositol (for the MS group) and acetate (for the NMO group) because they had the highest discriminating

power in the three models considered and because the main goal of this study is the distinction between two neurological diseases: MS and NMO. These two metabolites were then subsequently quantified in all 117 serum samples studied.

Serum metabolic profile of MS patients: scyllo-inositol

Figure 2A reports the concentrations of circulating scyllo-inositol in MS patients, NMO patients and control subjects. Scyllo-inositol in MS patients (average concentration, $254.1 \pm 8.7 \mu\text{mol/L}$) showed a substantial 2.4-fold increase in comparison with the concentrations measured in the serum of NMO patients (average concentration, $105.7 \pm 6.6 \mu\text{mol/L}$) and a significant 2.6-fold increase in comparison with the concentrations measured in serum of control patients (average concentration, $95.3 \pm 4.1 \mu\text{mol/L}$).

Scyllo-inositol was not specifically correlated with the AQP4 status among the NMO population (data not shown). The ROC analysis performed on the scyllo-inositol concentration for discriminating NMO from MS patients allowed us to determine a cut-off value of $190.3 \mu\text{mol/L}$ (AUROC, 0.982; Se, 87.8%; Sp, 95%) for this metabolite. Thirty-seven subjects among the 39 NMO patients and 32 subjects among the 37 MS patients were correctly classified.

The ROC analysis performed for discriminating MS patients from healthy subjects allowed us to determine a cut-off value of $145.2 \mu\text{mol/L}$ (AUROC, 0.99; Se, 97.6%; Sp 97.3%) for this metabolite. Forty subjects among the 41 MS patients and 36 subjects among the 37 healthy subjects were correctly classified. We found no specific clinical or biological pattern among the patients wrongly classified.

Serum metabolic profile of NMO patients: acetate

Figure 2B reports the concentrations of circulating acetate in NMO patients, MS patients and control subjects. Acetate in NMO patients (average concentration, $31.1 \pm 3.6 \mu\text{mol/L}$ of serum) showed a substantial 1.8-fold increase in comparison with the concentrations measured in serum of MS patients (average

concentration, 17.3 ± 1.1 $\mu\text{mol/L}$ of serum) and a significant 3.4-fold increase in comparison with the concentrations measured in serum of control (average concentration, 9.1 ± 1.0 $\mu\text{mol/L}$ of serum). The concentrations were not specifically correlated with the disease duration or the type of treatment followed by the MS or NMO patients. They were not correlated either with the anti-AQP4 antibodies status among the NMO population. The ROC analysis performed for discriminating NMO from MS patients allowed us to determine a cut-off value of 18.5 $\mu\text{mol/L}$ (AUROC, 0.67; Se, 75.6%; Sp, 67.5%) for this metabolite. Twenty-five subjects among the 39 NMO patients and 29 subjects among the 37 MS patients were correctly classified.

The ROC analysis performed for the discrimination between NMO and control patients allowed us to determine a cut-off value of 10.9 $\mu\text{mol/L}$ (AUROC, 0.829; Se, 86.5%; Sp, 72.5%) for this metabolite. Twenty-nine subjects among the 39 NMO and 33 subjects among the 37 healthy subjects were correctly classified. We found no specific clinical or biological pattern among the patients wrongly classified. These two metabolites are emphasized on representative ^1H NMR spectra of each of the three different groups considered (Fig. 3).

Additional value of considering both scyllo-inositol and acetate concentrations as putative biomarkers for distinguishing NMO from MS patients

A multivariate PLS-DA model based solely on the serum concentrations of scyllo-inositol and acetate in NMO and MS patients was developed. Serum samples were assigned to a Y column matrix as being either NMO (value of 0) or MS samples (value of 1). The analysis generated a two-component PLS-DA model characterized by a faithful representation of the Y data ($R^2Y = 0.74$) and by a very good cumulative confidence criterion of prediction ($Q^2 = 0.73$). The score plot of the PLS-DA model (Fig.4) showed a very clear separation between the two sets of serum samples. An extensive cross-validation embedded in a Monte-Carlo resampling approach was used during the construction of the model in order to build a confusion matrix that allowed a direct visualization of the performances of the model (Picard and Cook, 1984; Xu and Liang, 2001). The confusion matrix resulting of this analysis revealed a sensitivity of 94.3% and a specificity

of 90.2% for NMO patients. 37 subjects among the 39 NMO and 33 subjects among the 37 MS patients were correctly classified.

It therefore appears that these two metabolites can be considered as potential biomarkers in the differential diagnosis between MS and NMO, which is of prime importance since these pathologies are characterized by different therapeutic protocols.

DISCUSSION

This study demonstrates for the first time the potential of ^1H NMR spectroscopy of serum samples as a novel analytical tool to discriminate two patient populations affected by MS or NMO using their respective serum metabolic profiles. The results suggest that the serum concentrations of two small metabolites, scyllo-inositol and acetate, have a high potential for distinguishing NMO from MS. The metabolomic changes occurring in the serum of these two patients has never been explored previously even though such diagnostic markers could be easily assessed and at a low cost. The two metabolites found by our untargeted analysis are particularly relevant because of their link with the alterations of brain metabolism.

Scyllo-inositol and its stereoisomer, myo-inositol, are the two most ubiquitous forms of inositol, present in brain, liver and kidney. Scyllo-inositol is the second largest isomer in abundance after myo-inositol, which contributes over 90% to the total (Kaiser et al., 2005). The two isoforms were found in the same tissues and a positive correlation between their concentrations was reported, suggesting a metabolic relationship between the two metabolites. It is not clear whether brain scyllo-inositol and myo-inositol are synthesized in situ or how much of them are produced elsewhere and transported into the brain. Scyllo-inositol is currently tested as a therapeutical agent to prevent the formation of amyloid deposits in Alzheimer's disease (Salloway et al., 2011). The results of brain in vivo MR spectroscopy studies suggest an increase of scyllo-inositol in patients with mitochondrial enzyme deficiency, infection by human immunodeficiency virus (HIV) or certain brain tumors and a decrease in hepatic encephalopathy (Kaiser et al., 2005). In inflammatory diseases of the central nervous system, spectroscopy studies found that MS was associated with an increase of myo-inositol concentrations in brain (Kirov et al., 2013) while NMO patients presented normal or decreased myo-inositol concentrations in brain (Cicarelli et al., 2013; De Seze et al., 2010a). No change in scyllo-inositol concentrations in brain was reported but it is not clear whether scyllo-inositol was correctly evaluated. The increase in myo-inositol has been suggested as a marker of the diffuse glial proliferation in MS brains which takes place after the demyelination and neuronal damages. This glial proliferation is not observed in NMO in which the immune attack targets the astrocytes and cause astrocytic

necrosis and cavitation rather than astrogliosis(Jacob et al., 2012b). It is not clear why scyllo-inositol but not myo-inositol concentrations were increased in the serum of MS patients. A specific increase in synthesis of scyllo-inositol by MS patients or an increased release/decreased uptake by the brain may explain this difference. The mechanisms involved in scyllo-inositol synthesis and transport deserve further research.

The involvement of the second metabolite, acetate, in brain metabolism and neurotransmitters synthesis (especially in the transformation of glutamate into glutamine) is already known. Acetate is preferentially metabolized by astrocytes due to a specific transport into these cells and its interest as a marker of astrocytic metabolism has been already suggested(Wyss et al., 2011a). Brain spectroscopy studies report an increase of acetate concentrations in amyotrophic lateral sclerosis(Kumar et al., 2010), but not in NMO or MS patients(De Seze et al., 2010a; Kirov et al., 2013). Some studies have also reported an increase of acetate concentrations in the cerebrospinal fluid of MS patients especially during the relapses(Simone et al., 1996; Sinclair et al., 2010). A previous study measured acetate in serum but found no difference between MS and control patients(Sinclair et al., 2010). Glial abnormalities are found in both MS and NMO but the astrocytes are particularly damaged in NMO. The latter disease has been even described as an astrocytopathy because of the extensive astrocytic loss probably related with anti-AQP4 antibodies(Jacob et al., 2012b). Accordingly, we found that MS and NMO patients presented respectively mild and marked changes in acetate concentration in serum. These changes may be related to a respectively mild or marked impairment of acetate uptake by astrocytes.

In clinical practice, scyllo-inositol could be very interesting for discriminating NMO from MS with a better sensitivity (95%) than that of anti-AQP4 antibodies (50-70%). The specificity (87.8%) is lower than that of anti-AQP4 (>90%) but remains high. Scyllo-inositol would be also useful to discriminate MS from control subjects. Acetate could be used to discriminate NMO from control subjects but the wide variation of its concentration resulted in a lower sensitivity (72.5%), which, however, remained higher than that of anti-AQP4 antibodies. The specificity was relatively good (89.2%). Other biomarkers, such as the analysis of MRI abnormalities pattern, have been proposed for discriminating NMO from MS. In a recent article Matthews et al. reported that MRI criteria (at least 1 lesion adjacent to the body of the lateral ventricle and in the inferior temporal lobe; or the presence of a subcortical U-fiber lesion; or a Dawson's finger-type lesion)

allow to discriminate MS from NMO with a sensitivity of 92% and specificity of 96%(Matthews et al., 2013). A study using an ultrahigh-high field (7 T) MRI(Kister et al., 2013b) found that 91% of lesion of NMO patients were not traversed by a veinule but this work included no MS or healthy subjects group and gave no estimation of sensitivity or specificity. However, one of the major advantages of scyllo-inositol and acetate is that they can be easily and quickly assessed in serum after a simple blood draw. Their measurement could be also less expensive than MRI or anti-AQP4 antibodies analysis. Concerning valine, our results are in accordance with the results of Monaco et al (Monaco et al., 1979). and Mehrpour et al.(Mehrpour et al., 2013) They also found a diminution of its concentration in the MS group compared to the control group(Mehrpour et al., 2013; Monaco et al., 1979).

These results have been obtained on a small group of patients because of the relative rarity of NMO. However, patients and controls were matched for age and gender, and the patients were under various therapies in each group to prevent the impact of a particular condition. We checked the absence of correlation between the metabolites concentrations and the duration of the disease or the presence of treatment. Especially, the increase in acetate was not related to the therapy by glatiramere acetate. Neither a particular diet nor a metabolic abnormality was reported in any of the three groups.

CONCLUSION

This study demonstrates for the first time the potential of ^1H NMR spectroscopy of serum as a novel analytical tool to discriminate two populations of patients affected by NMO or MS. Using the respective ^1H NMR metabolic profiles of these two classes of patients, an extremely promising PLS-DA model was developed to differentiate NMO from MS patients. Two PLS-DA models capable of differentiating NMO from control, and MS from control were also obtained.

More specifically, two metabolites were found to be particularly important for a clear discrimination between these two pathologies and a control group: scyllo-inositol, which discriminates MS patients from

other subjects (NMO patients and control subjects) and acetate, which discriminates NMO patients from other subjects (MS patients and control subjects).

The next step will be a simultaneous validation of these three PLS-DA models and of the two biomarkers (scyllo-inositol and acetate) on a larger cohort of patients. A determination of a cut-off value for the respective serum concentrations of these two metabolites, which could help clinicians choose the most appropriate therapeutic protocol to treat their NMO or MS patients, will also have to be validated. These validations will consist in performing the exact analysis described in this paper but on large sets of blind samples.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grants from the CARMEN project. The CARMEN project was supported by Région Alsace, Oséo, Communauté Urbaine de Strasbourg, Conseil Général du Bas-Rhin, Bruker BioSpin, Université de Strasbourg, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

The Authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ and Weinshenker BG. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurology*. 2007; 6: 805-15.
2. De Seze J, Lebrun C, Stojkovic T, Ferriby D, Chatel M and Vermersch P. Is Devic's neuromyelitis optica a separate disease? A comparative study with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*. 2003; 9: 521-5.
3. Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF and Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology*. 2006; 66: 1485-9.
4. Lennon PVA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: Distinction from multiple sclerosis. *Lancet*. 2004; 364: 2106-12.
5. Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS and Hinson SR. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *Journal of Experimental Medicine*. 2005; 202: 473-7.
6. Marignier R, De Sèze J, Vukusic S, et al. NMO-IgG and Devic's neuromyelitis optica: a French experience. *Multiple Sclerosis*. 2008; 14: 440-5.
7. **Méthode de diagnostic différentiel discriminant la sclérose en plaque de la maladie de Devic. 2012.**
8. **Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 Revisions to the "McDonald Criteria". *Annals of Neurology*. 2005; 58: 840-6.**
9. Papeix C, Vidal JS, de Seze J, et al. Immunosuppressive therapy is more effective than interferon in neuromyelitis optica. *Multiple Sclerosis*. 2007; 13: 256-9.
10. **Sinclair AJ, Viant MR, Ball AK, et al. NMR-based metabolomic analysis of cerebrospinal fluid and serum in neurological diseases - A diagnostic tool? *NMR in Biomedicine*. 2010; 23: 123-32.**
11. **Mehrpour M, Kyani A, Tafazzoli M, Fathi F and Joghataie MT. A metabonomics investigation of multiple sclerosis by nuclear magnetic resonance. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2013; 51: 102-9.**
12. **Simone IL, Federico F, Trojano M, et al. High resolution proton MR spectroscopy of cerebrospinal fluid in MS patients. Comparison with biochemical changes in demyelinating plaques. *Journal of the Neurological Sciences*. 1996; 144: 182-90.**
13. **Lutz NW, Viola A, Malikova I, et al. Inflammatory multiple-sclerosis plaques generate characteristic metabolic profiles in cerebrospinal fluid. *PLoS ONE*. 2007; 2.**
14. **Lutz NW and Cozzone PJ. Metabolic profiling in multiple sclerosis and other disorders by quantitative analysis of cerebrospinal fluid using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2011; 12: 1016-25.**
15. **Lippens G, Bourdonneau M, Dhalluin C, et al. Study of compounds attached to solid supports using High Resolution Magic Angle Spinning NMR. *Curr Org Chem*. 1999; 3: 147-69.**
16. Meiboom S and Gill D. Modified spin echo method for measuring nuclear relaxation times. *Rev Sci Instrum*. 1958; 29: 688.
17. Piotto M, Moussallieh F-M, Imperiale A, et al. Reproducible sample preparation and spectrum acquisition techniques for metabolic profiling of human tissues by ¹H HRMAS NMR. In: Lutz P, (ed.). *Methodologies in metabolomics: experimental strategies and techniques for metabolomics research*. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, 2013.
18. Tenenhaus M. *La régression PLS: Théorie et pratique*. Paris 1998.
19. Westerhuis JA, Hoefsloot HCJ, Smit S, et al. Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics*. 2008; 4: 81-9.

20. Wider G and Dreier L. Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*. 2006; 128: 2571-6.
21. Benahmed MA, Elbayed K, Daubeuf F, Santelmo N, Frossard N and Namer IJ. NMR HRMAS spectroscopy of lung biopsy samples: Comparison study between human, pig, rat, and mouse metabolomics. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2013.
22. Picard RR and Cook RD. Cross-Validation of Regression Models. *Journal of the American Statistical Association* 1984; 79: 575-83.
23. Xu QS and Liang YZ. Monte Carlo cross validation. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2001; 56: 1-11.
24. Kaiser LG, Schuff N, Cashdollar N and Weiner MW. Scyllo-inositol in normal aging human brain: ¹H magnetic resonance spectroscopy study at 4 Tesla. *NMR in Biomedicine*. 2005; 18: 51-5.
25. Salloway S, Sperling R, Keren R, et al. A phase 2 randomized trial of ELND005, scyllo-inositol, in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*. 2011; 77: 1253-62.
26. Kirov II, Tal A, Babb JS, Herbert J and Gonen O. Serial proton MR spectroscopy of gray and white matter in relapsing-remitting MS. *Neurology*. 2013; 80: 39-46.
27. De Seze J, Blanc F, Kremer S, et al. Magnetic resonance spectroscopy evaluation in patients with neuromyelitis optica. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2010; 81: 409-11.
28. Ciccarelli O, Thomas D, De Vita E, et al. Low myo-inositol indicating astrocytic damage in a case series of NMO. *Ann Neurol* 2013; doi: 10.1002/ana.23909.
29. Jacob A, McKeon A, Nakashima I, et al. Current concept of neuromyelitis optica (NMO) and NMO spectrum disorders. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2012.
30. Wyss MT, Magistretti PJ, Buck A and Weber B. Labeled acetate as a marker of astrocytic metabolism. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2011; 31: 1668-74.
31. Kumar A, Bala L, Kalita J, et al. Metabolomic analysis of serum by (¹) H NMR spectroscopy in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinica Chimica Acta*. 2010; 411: 563-7.
32. Matthews L, Marasco R, Jenkinson M, et al. Distinction of seropositive NMO spectrum disorder and MS brain lesion distribution. *Neurology*. 2013; 80: 1330-7.
33. Kister I, Herbert J, Zhou Y and Ge Y. Ultrahigh-Field MR (7T) Imaging of Brain Lesions in Neuromyelitis Optica. *Mult Scler Int*. 2013; doi: 10.1155/2013/398259.
34. Monaco F, Fumero S, Mondino A and Mutani R. Plasma and cerebrospinal fluid tryptophan in multiple sclerosis and degenerative diseases. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. 1979; 42: 640-1.

LEGENDS

Figure 1: Multivariate modeling of NMO patients, MS patients and controls.

PLS-DA score plots obtained when classifying serum samples from: (1A) NMO patients (empty triangles) and MS patients (black boxes) ($R^2Y=0.85$; $Q^2=0.80$), (1B) control subjects (empty circles) and MS patients ($R^2Y=0.84$; $Q^2=0.68$), (1C) control subjects and NMO patients ($R^2Y=0.77$; $Q^2=0.72$), using, for each model, the most discriminant metabolites.. In the model presented in 1A, the most discriminant metabolites were acetate, glutamate, lactate and lysine for the NMO group, and scyllo-inositol and glutamine for the MS group, respectively. In the model presented in 1B, the most discriminant metabolites were glutamine and valine for the control group and scyllo-inositol and glutamine for the MS group. In the model presented in 1C, the most discriminant metabolites were glutamine and lysine for the control group and acetate, glutamate and lactate for the MS group, respectively.

Axes represent the two first principal components responsible for the maximum of variance among the considered data. X axis represents the first principal component and y axis the second one.

Figure 2:

Scatter plot showing the concentrations of scyllo-inositol (2A) and acetate (2B) recorded in serum of 37 healthy controls (empty circles), 37 MS patients (black boxes) and 39 NMO patients (empty triangles). Horizontal bars indicate the mean values calculated in the three different groups.

Figure 3:

Representative ^1H NMR spectra of Control subjects, NMO patients and MS patients with a particular focus on scyllo-inositol, represented by a singlet resonating at 3.36 ppm, and acetate, represented by a singlet resonating at 1.92 ppm.

Figure 4

PLS-DA score plot obtained when classifying serum samples from NMO patients (empty triangles) and MS patients (black boxes), using solely their respective circulating concentrations ($R^2Y=0.74$; $Q^2=0.73$).

TABLE 1

	Controls	NMO patients	MS patients
Number of patients	42	44	47
Female: male	25 : 17	32 : 12	33 : 14
Average age at recruitment (years)	39.35 ± 13.47	43.89 ± 12.28	38.47 ± 9.84
Disease duration (years)	NA	8.27 ± 9.16	8.35 ± 5.24
Anti-AQP4 Ab status negative/positive	NA	22:22	NA
Number of patients following each treatment	NA	no treatment n= 11 mycophenolate mofetil n= 14 azathioprine n= 9 cyclophosphamide n= 6 mitoxantrone n= 2 rituximab n= 1 methotrexate n= 1 corticotherapy n= 1	no treatment n= 5 natalizumab n=39 interferon beta n= 3

Figure 1

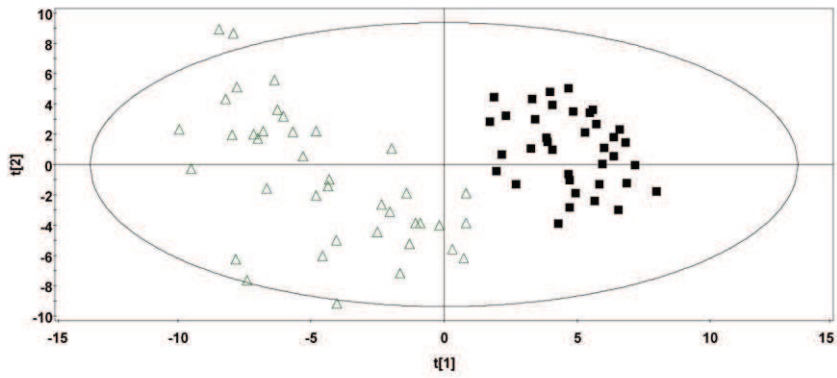
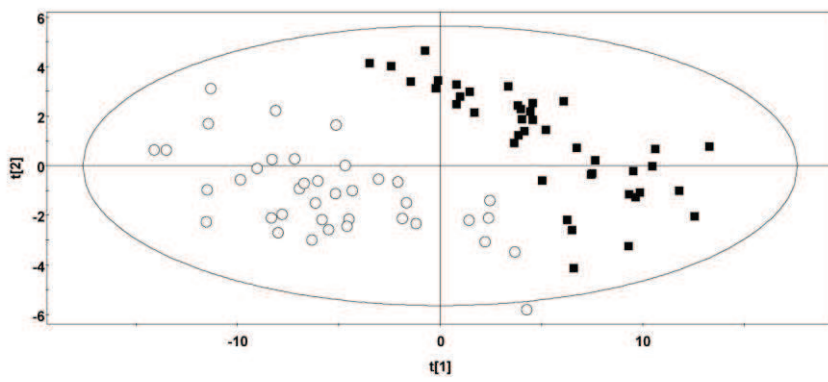
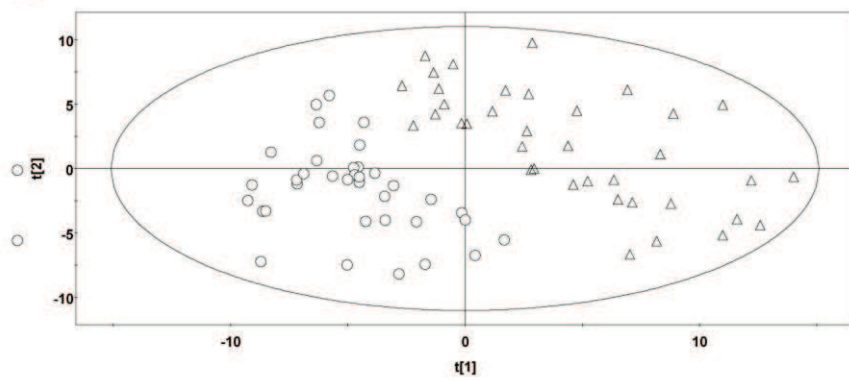
A**B****C**

Figure 2

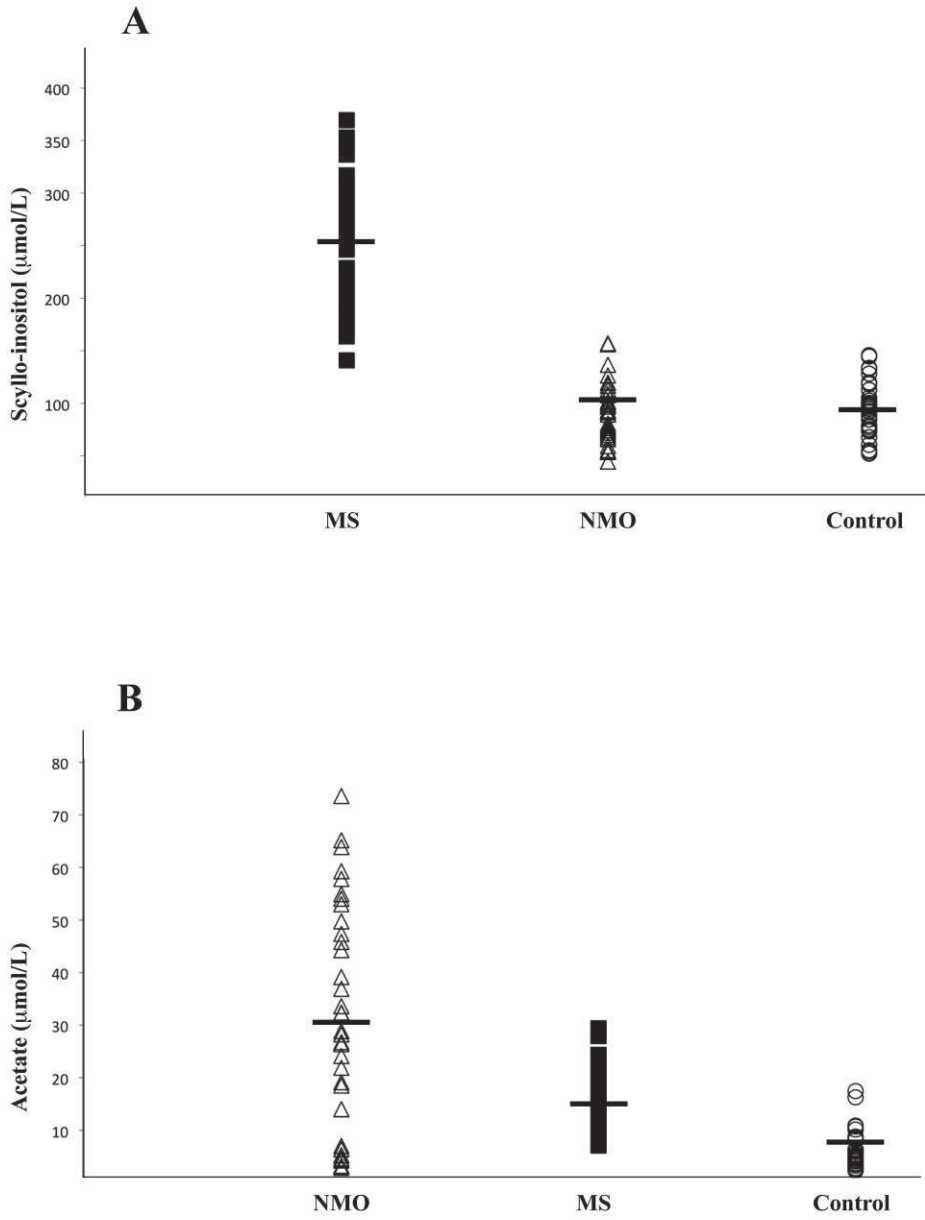


Figure 3

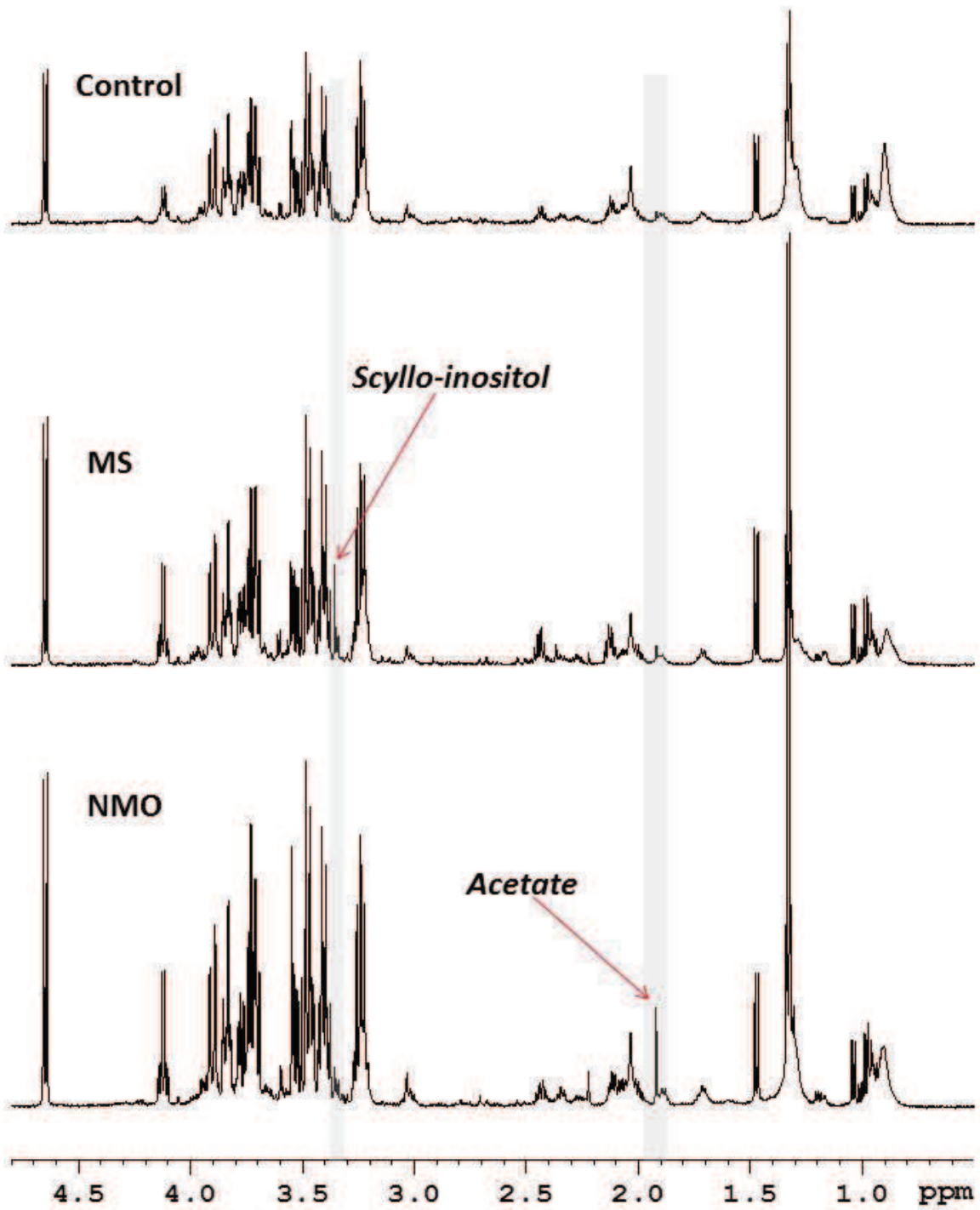
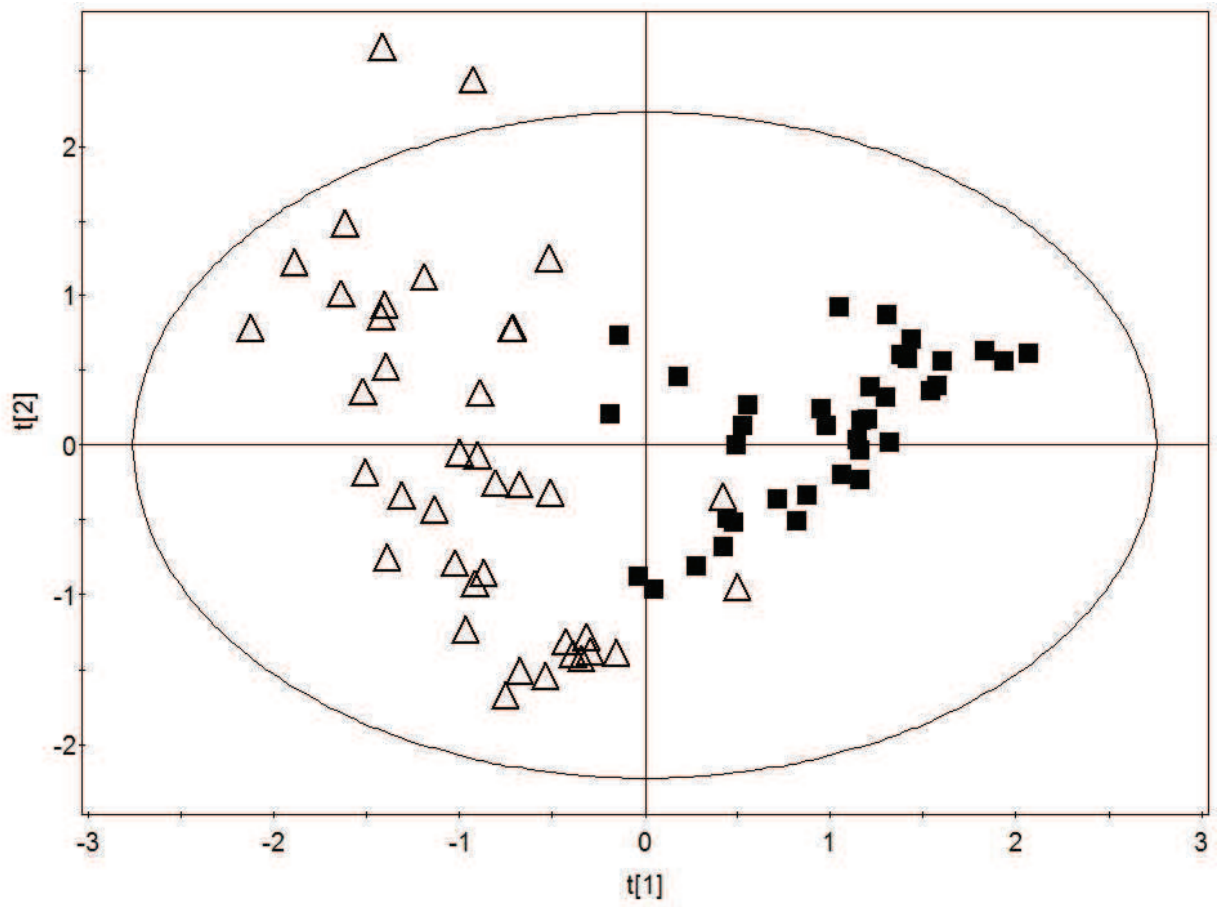


Figure 4



COMMENTAIRES:

Ce travail est issu d'une approche originale se fondant sur une technique de métabolomique sérique. Celle-ci a permis d'évaluer la concentration de plusieurs dizaines de métabolites en même temps dans des échantillons de sang venant de patients atteints de maladies différentes puis d'appliquer des tests statistiques pour déterminer les métabolites pertinents pour le diagnostic différentiel entre les maladies.

Nous avons retrouvé une augmentation du scyllo-inositol chez les patients atteints de SEP par rapport aux sujets NMO et sains et de l'acétate chez les patients NMO et SEP par rapport aux sujets sains. L'acétate était plus augmenté dans la NMO que dans la SEP (en moyenne 31 $\mu\text{mol/l}$ dans la NMO vs 17 chez les SEP et 9 chez les sujets sains.)

Ces résultats devront être testés sur des cohortes indépendantes. Il est possible en effet qu'ils résultent d'un hasard statistique ou soient le produit d'un syndrome inflammatoire général non spécifique. Cependant, la SEP et la NMO ne s'associent normalement pas à un syndrome inflammatoire général. Par ailleurs, il faut remarquer que l'analyse de nombreux métabolites a fait émerger seulement deux métabolites déjà connus en neurologie et impliqués dans le métabolisme du SNC.

La signification possible des modifications de l'acétate et du scyllo-inositol a été discutée dans l'article. L'augmentation de l'acétate suggérerait un déficit de la capture de ce métabolite par les astrocytes et l'augmentation du scyllo-inositol une augmentation du nombre d'astrocytes. On aurait donc dans la SEP une augmentation du nombre d'astrocytes (augmentation du scyllo-inositol) mais plutôt de type astroglieuse cicatricielle avec une fonction énergétique modérément diminuée (acétate légèrement augmenté dans le sérum). Dans la NMO il y aurait une dysfonction sévère des

astrocytes (acétate très élevé) sans astrogliose cicatricielle (scyllo-inositol normal). Ces théories sont globalement en accord avec les données anatomopathologiques (Lucchinetti et al., 2002; Ratelade and Verkman, 2012).

En dehors de ces deux marqueurs les plus significatifs, il est intéressant de noter une augmentation du glutamate dans la NMO et de la glutamine dans la SEP. Les astrocytes doivent normalement capturer le glutamate (neurotransmetteur exciteur) émis par les neurones, le transformer en glutamine non active sur les récepteurs exciteurs, transférer celle-ci aux neurones qui la retransforment en glutamate prêt à être libéré dans la fente synaptique. Il est donc logique que dans la NMO, où l'atteinte astrocytaire prédomine, le glutamate non recapturé par les astrocytes s'accumule et passe dans le sang. Dans la SEP, où les neurones meurent et sont remplacés par une gliose astrocytaire, il est aussi logique que la glutamine émise par les astrocytes ne soit pas récupérée par les neurones et passe dans le sang (Wyss et al., 2011b). L'accumulation de glutamate dans le cerveau a justement été évoquée comme un mécanisme possible des lésions de NMO.

Il est aussi intéressant de noter que le taux des métabolites n'était pas corrélé au statut des anticorps anti-AQP4 dans notre cohorte. Il semble donc que les patients séronégatifs pour cet anticorps présentent aussi une dysfonction astrocytaire. Nous n'avons pas assez de sérums par patients pour procéder à une étude longitudinale mais il serait intéressant de vérifier si les taux d'acétate ou de scyllo-inositol augmentent au cours des poussées.

En conclusion, l'étude métabolomique du sérum dans la NMO est un champ d'étude original qui pourrait permettre de valider de nouveaux biomarqueurs diagnostiques et de mieux comprendre la physiopathologie de la NMO et de la SEP.

IV) REPERCUSSIONS DE LA NEUROMYELITE OPTIQUE

1) Répercussions sur le volume cérébral

Article 6: **Chanson JB**, Lamy J, Rousseau F, Blanc F, Collongues N, Fleury M, Armspach JP, Kremer S, de Seze J. White matter volume is decreased in the brain of patients with neuromyelitis optica. *Eur J Neurol.* 2013 Feb;20(2):361-7

White matter volume is decreased in the brain of patients with neuromyelitis optica

J.-B. Chanson^{a,b}, J. Lamy^b, F. Rousseau^c, F. Blanc^{a,b}, N. Collongues^{a,b}, M. Fleury^a, J.-P. Armpach^b, S. Kremer^{d,d} and J. de Seze^{a,b}

^aDépartement de Neurologie, Hôpital Universitaire de Strasbourg, Strasbourg; ^bUniversité de Strasbourg and CNRS, LINC, UMR 7257, Strasbourg; ^cUniversité de Strasbourg and CNRS, LSRT, UMR 7068, Strasbourg; and ^dDépartement de Neuro-radiologie, Hôpital Universitaire de Strasbourg, Strasbourg, France

Keywords:

brain volume, MRI, neuromyelitis optica, white matter

Received 29 February 2012

Accepted 7 August 2012

Background: Neuromyelitis optica (NMO) is an inflammatory disease involving predominantly the spinal cord and optic nerves. Whether patients with NMO have a loss in white or grey matter (GM) volumes remains to be determined.

Methods: Thirty patients with NMO, 30 healthy subjects matched for age and gender, 21 patients with multiple sclerosis (MS) and 20 patients with a clinically isolated syndrome (CIS) were studied. We applied a SIENAX post-treatment software. We compared white matter (WM) and GM volumes between groups and explored correlations of changes in NMO patients with age, gender, duration, disease severity, visual acuity and T2 hyperintensities. We also performed a voxel-based morphometry (VBM) analysis to identify the regions affected by loss of volume.

Results: White matter volume was significantly reduced in patients with NMO ($764.4 \pm 58.3 \text{ cm}^3$) compared to healthy subjects ($883.1 \pm 49.3 \text{ cm}^3$) ($P < 0.001$), whereas no difference was observed for the GM. Patients with CIS also presented an elective atrophy of WM and MS an atrophy of both WM and GM. We did not find any predictive factors of brain atrophy. The decrease in WM volume in NMO was noted even in the absence of visible MRI hypersignals. The VBM analysis found a few regions of WM atrophy (corpus callosum and optic radiations, $P < 0.005$, uncorrected) and a few regions of GM atrophy (thalamus and prefrontal cortex, $P < 0.001$, uncorrected).

Conclusion: These results suggest a significant brain involvement in NMO, especially an involvement of WM which appears not to be limited to secondary degeneration after spinal cord and optic nerve damage.



Introduction

Neuromyelitis optica (NMO) is an inflammatory disease associating optic neuritis and myelitis [1,2]. In NMO, contrary to multiple sclerosis (MS), the brain was previously considered to be completely spared or to have a mild involvement. This lack of brain lesion was an important diagnostic criterion but was recently challenged by new data. First, the presence of brain abnormalities on MRI has been reported in 50–60% of cases. MRI findings may mimic those of MS (subcortical and periventricular T2 hyperintensities)

but, in many patients, they are different with an involvement of particular regions with a high concentration of aquaporin 4 (AQP4) such as the brainstem and diencephalon [3,4]. Moreover, studies using more advanced MRI techniques, such as diffusion tensor imaging (DTI), revealed abnormalities in the brain of patients with NMO [5]. The presence of cognitive abnormalities in this disease is also in favour of a significant brain involvement [6]. In addition, an epidemiological study of 125 patients with NMO suggested that the presence of T2 hyperintensities was associated with a poorer visual prognosis [7].

In MS, MRI abnormalities have been proved to be accompanied by a decreased brain volume involving the white matter (WM) and grey matter (GM). A link with the level of physical disability and cognitive

Correspondence: J.-B. Chanson, Neurologie, Hôpital de Hautepierre, 1 Avenue Molière, 67098 Strasbourg, France (tel.: +33 388116462; fax: +33 388116343; e-mail: jean-baptiste.chanson@chicr-strasbourg.fr).

impairment was suggested [8]. However, no previous study has focused on changes in the WM and GM volume in NMO. Therefore, the aim of this study was to investigate precisely these parameters in a group of patients with NMO and to compare them with healthy subjects but also with patients with MS and a clinically isolated syndrome (CIS). The results may provide further insights into the brain involvement in NMO.

Patients and methods

Patients and control subjects

Thirty patients with NMO followed up in the Neurology Department of the University Hospital of Strasbourg were prospectively registered from September 2008 to September 2010. The disease was diagnosed according to the revised criteria of Wingerchuk *et al.* [3]. Patient characteristics including the age, gender, disease duration and severity (evaluated by the Expanded Disability Status Scale, EDSS, and mean visual acuity of both eyes) and presence of an immunosuppressive treatment were also registered. The presence of NMO-IgG was assessed using a cell-based assay. Thirty healthy subjects matched for age and gender were used as controls. We also recruited 21 patients with MS and 24 patients with a CIS, that is, a unique episode of neurological signs with MRI T2 hyperintensities of the brain or oligoclonal bands in CSF consistent with an evolution towards a definite MS. Age and gender of healthy subjects, patients with MS and CIS were registered. Disease duration and EDSS score were registered for patients with MS but not CIS because they were all included for <3 months after the first sign and they presented only one episode. Written informed consent was obtained from all participants. The research protocol was approved by the CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés).

Brain MRI characteristics

All examinations were performed on a 1.5 T MR unit. MRI scans were not performed during a relapse period to prevent the possible interference of an oedema. We acquired 3D MPRAGE T1-weighted sequences with a voxel size of $1 \times 1 \times 2$ mm. Total brain volume as well as WM and GM volumes was calculated using the validated SIENAX software [9]. SIENAX attempts to estimate cross-sectional volume using a single time point scan. First, the brain and skull images are extracted from the given scan. The MNI152 standard brain is affine registered to the given brain,

using the extracted skull and the standard brain skull to constrain the scaling. At this step, a volumetric scaling factor, which is required for brain normalization at the final stage of the algorithm, is calculated. Then, a tissue type segmentation is performed on the original (unregistered) extracted brain, up to a sub-voxel accuracy. The cortical and deep GMs are separated from the WM. The total brain volume is derived from this segmentation result. Finally, normalization for head size is necessary, and to do this the brain volume is multiplied with the volumetric scaling factor derived earlier. We also performed T2-weighted sequences and registered the presence or absence of T2 hyperintensities in the WM.

Voxel-based morphometry

Focal brain volume loss was analysed on high-resolution T1-weighted images using the voxel-based morphometry (VBM) module of SPM 8 (Statistical Parametric Mapping, Wellcome Department of Cognitive Neurology, London, UK). Images were segmented into GM and WM using the 'New segment' algorithm of SPM 8. Statistical maps of atrophy were obtained separately for GM and WM using an *anova* without covariates, and thresholded at an uncorrected *P*-value of 0.001 with a minimum cluster size of 30 voxels. Owing to the small size of the groups, we performed the analysis again with an uncorrected *P*-value of 0.005 if no result was found with a *P*-value of 0.001. We compared patients with NMO to healthy subjects and then patients with MS to NMO.

Statistical analysis

We used a Student's *t*-test to compare the total, WM and GM volumes between patients with NMO, MS and CIS and healthy subjects. Differences in terms of age between the groups were searched with the same test. We also looked for a difference in total, WM and GM volumes (as well as for the patients' characteristics) between NMO patients with and without T2 hyperintensities. A Tukey multiple comparisons test was performed to detect a difference in terms of gender between the groups. We used a Spearman rank correlation test (for quantitative variables) or a Welch two sample *t*-test (for qualitative variables) to search for a correlation between WM volume of patients with NMO and their characteristics (age, gender, disease duration, EDSS score, presence of an immunosuppressive treatment, visual acuity and presence of NMO-IgG). The significance of the *P*-value was set at 0.005 because of the number of statistical tests.

Results

Demographic characteristics of patients and control subjects are summarized in Table 1. Fifty-seven per cent of patients were NMO-antibody positive. Eighty per cent of patients received an immunosuppressive treatment (mycophenolate mofetil for 33%, azathioprine for 23%, cyclophosphamide for 13%, rituximab for 7% or mitoxantrone for 3%), and another patient was only treated by oral corticoids. All NMO patients had a relapsing disease. Patients with NMO and MS as well as healthy subjects were similar in terms of age and gender. Age was lower, and percentage of women was higher in the CIS group compared to the NMO group. Patients with NMO and MS were similar in terms of disease duration. Patients with MS had a lower EDSS score (2.5 ± 1.9) than the NMO subjects (3.4 ± 2.3), but the difference was not statistically significant.

In patients with NMO, the WM volume was decreased compared to healthy subjects ($P < 0.001$), whilst the GM volume was similar between both groups (Table 2). The WM volume was equivalent in patients with NMO and MS, whilst the GM and total brain volumes were higher in patients with NMO ($P < 0.001$). Patients with CIS presented no significant difference in the GM and WM volumes compared to patients with NMO (Table 2). In patients with MS, both GM and WM volumes were decreased compared to healthy subjects ($P < 0.001$). In patients with CIS, only the WM volume was decreased compared to healthy subjects ($P < 0.001$).

T2 hyperintensities were found in 52% of patients with NMO. They were suggestive of MS (i.e. in at least two of the following areas: juxtacortical, periventricular, infratentorial or spinal cord [10]) only in 25% of cases and non-specific in the other cases. They were associated with a non-significant trend to a lower WM volume ($755.4 \pm 61 \text{ cm}^3$ in the NMO group with

T2 hyperintensities versus $785.9 \pm 44 \text{ cm}^3$ in the NMO group without them and $843.1 \pm 45 \text{ cm}^3$ in the healthy subjects). Both NMO groups with and without WM lesions had a markedly lower WM volume than healthy subjects ($P < 0.001$). NMO patients with T2 hyperintensities had a higher disease duration (12 ± 12.5 vs. 8.2 ± 5.3 years) and a non-significant trend to a lower visual acuity (5.2 ± 4.5 vs. 7.25 ± 4) but no difference in terms of gender, age, EDSS score, visual acuity and presence of anti-AQP4 antibodies or an immunosuppressive treatment. We found no correlation between the reduced WM volume and NMO patient characteristics.

The VBM analysis ($P < 0.001$, uncorrected) did not find any significant region of WM atrophy in patients with NMO compared to healthy subjects. However, using a P -value of 0.005 (uncorrected), we found atrophy in the optic radiations but also in intracerebral pathways (corpus callosum) (Fig. 1). We observed a significant WM atrophy in the internal and external capsules in MS compared to NMO patients ($P < 0.001$, uncorrected) (Fig. 2). Concerning GM (Fig. 3, $P < 0.001$, uncorrected), a significant loss of volume was found in thalamus and prefrontal cortex in NMO compared to healthy subjects. We observed a loss of volume in thalamus, insula and the occipital and parietal cortex in MS compared to NMO subjects.

Discussion

Our results provide the first evaluation of total, WM and GM volumes in NMO. We found a markedly decreased WM volume in patients with NMO compared to healthy subjects. This decrease is slightly less severe than in definite MS and is not accompanied by a reduction in the global GM volume as observed in MS. It is even found in the absence of T2 hyperintensities in WM and concerns intracerebral pathways. These data corroborate previous reports describing a significant brain involvement and especially a WM involvement in NMO.

This decrease in WM volume might be explained either by a degeneration after lesions of the spinal cord and optic nerves or by a direct inflammatory attack of the brain WM. The first hypothesis was supported by the results of Yu *et al.* [5,11] and Jeanroux *et al.* [12], which found abnormal diffusion parameters along the corticospinal tract of patients with NMO but not in intracerebral pathways. However, another study was in favour of the other hypothesis: Liu *et al.* [13] observed widespread diffusion abnormalities in WM including intracerebral pathways such as corpus callosum, external capsule and superior longitudinal

Table 1 Demographic characteristics of the four groups

	Age (years)	Gender (% women)	Disease duration (years)	EDSS score
NMO	46.2 ± 14	63	10.2 ± 9.2	3.4 ± 2.3
Healthy subjects	41.7 ± 13	63	NA	NA
MS	47 ± 11.3	69	10 ± 11.4	2.5 ± 1.9
CIS	31.3 ± 9*	79*	4.25*	NA

NMO, neuromyelitis optica; MS, multiple sclerosis; CIS, clinically isolated syndrome; NA, not applicable; EDSS, Expanded Disability Status Scale.

*Significant difference with the NMO group (α risk = 0.005).

Table 2 Brain volume in the four groups

	Grey matter volume (cm ³)	Difference with NMO group	White matter volume (cm ³)	Difference with NMO group	Total volume (cm ³)	Difference with NMO group
NMO	829.3 ± 92.8		764.4 ± 88.3		1593.7 ± 95.3	
Healthy subjects	815.3 ± 51.1	NS	843.1 ± 49.3	<i>P</i> < 0.001	1658.4 ± 91.3	<i>P</i> < 0.005
MS	737.3 ± 59.8	<i>P</i> < 0.001	748.2 ± 71.5	NS	1485.5 ± 112.8	<i>P</i> < 0.001
CS	832.9 ± 64	NS	776.2 ± 61.7	NS	1607 ± 96.6	NS

NMO, neuromyelitis optica; MS, multiple sclerosis; CS, clinically isolated syndrome; NS, not significant; *P* = alpha risk (significant difference for *P* < 0.005).

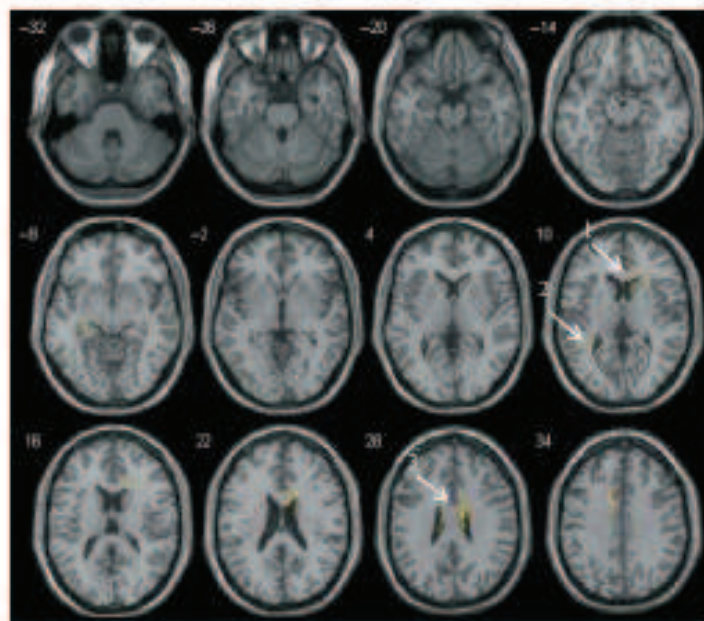


Figure 1 White matter volume regional decrease in neuromyelitis optica compared to healthy subjects. Left hemisphere is represented on the left part of each section. We observed a particular loss of volume in the anterior part of the corpus callosum (1), the optic midbody (2) and the body of the corpus callosum (3) (*P* < 0.005, uncorrected). Note that no difference was found for *P* < 0.001.

fascicle. A functional MRI study also found diffuse changes in neural activity in the resting state [14]. No metabolic abnormality was found in WM using spectroscopy [15]. The presence of MRI T2 hyperintensities in many NMO patients is consistent with an inflammatory attack on WM. In our study, we found a proportion of patients with these hyperintensities (52%), which is in the same range as that described in previous reports [3,4]. The WM volume was decreased even in the absence of T2 hyperintensities suggesting abnormalities in normal appearing WM. The regional analysis of WM volume changes did not identify any significant cluster of atrophy using a *P*-value of 0.001 (uncorrected). This value is frequently used in VBM studies but could not be adapted to small groups. The exploratory test with *P* < 0.005 (uncorrected) suggested that the loss of volume concerned several WM regions including strictly intracerebral pathways (corpus callosum) along with optic radiations. These

results must be taken with caution but are consistent with a direct attack of brain WM in NMO. A similar study has already been conducted in a different NMO group (but sharing some patients with our group) and found similar results [16].

Concerning GM, the global volume was not changed compared to healthy subjects but some focal areas of atrophy were found by the VBM analysis. Therefore, the GM involvement seems actual but limited to a few regions. These regions (thalamus and prefrontal cortex) are not directly connected to spinal cord or optic nerves. A recent VBM study in NMO also reported a loss of GM volume limited to some cortical areas (parietal cortex). The authors did not explore the changes in WM volume [17]. In contrast, marked GM lesions have been found in MS. They result in a decreased global GM volume in MS and may explain the difference in GM volume between NMO and MS [8].

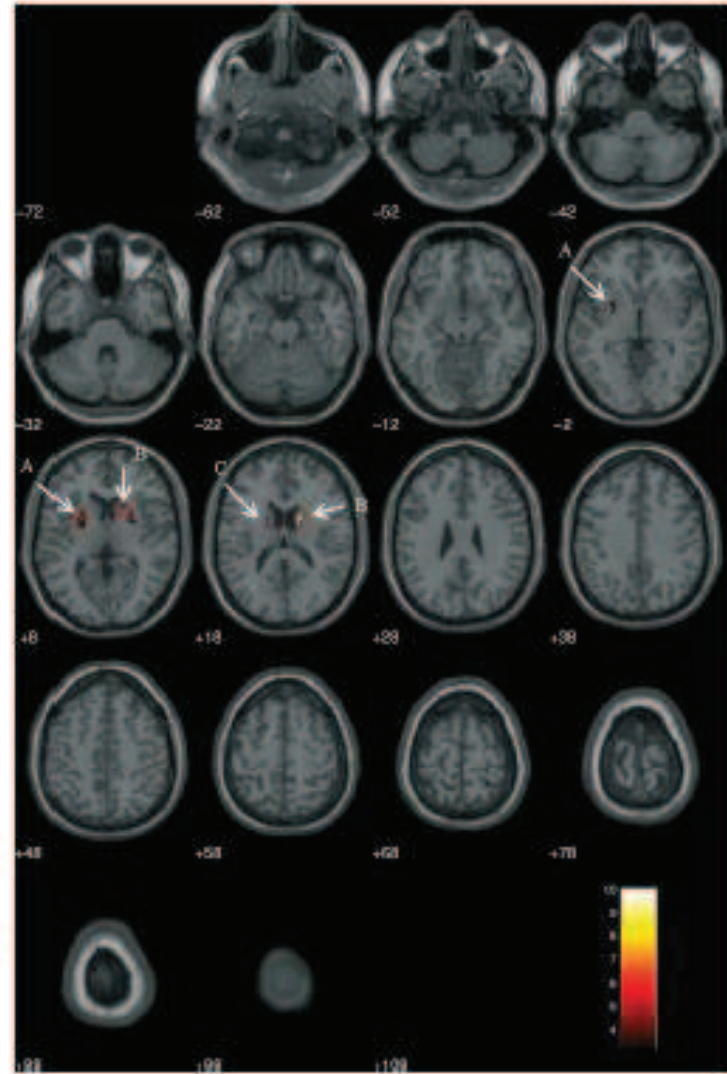


Figure 2 White matter volume regional decrease in patients with multiple sclerosis compared to patients with neuromyelitis optica. Left hemisphere is represented on the left part of each section. We observed a significant loss of volume in the left external capsule (A), the anterior part of the right internal capsule (B) and the anterior part of the left internal capsule (C) ($P < 0.001$, uncorrected).

Patients with CIS presented an elective loss of WM volume like NMO patients. Demyelinating lesion-related WM atrophy has been suggested to be an early event in MS, and thus it may be more apparent at the beginning of the disease. WM atrophy may precede GM atrophy which is more dynamic over the observation period of definite MS [8]. In CIS, WM atrophy has also been proposed to be related to a metabolic dysfunction revealed by magnetic resonance spectroscopic imaging [18]. This hypothesis was explored in NMO but no metabolic dysfunction was found in the WM [15].

Some limitations may interfere with these results. The relatively small size of the groups is attributed to

the rarity of the disease and may have prevented the detection of regional volume changes. Patients with CIS were younger than the patients with definite MS and NMO because, by definition, they presented no more than one inflammatory episode. However, in our cohort, we did not find a correlation between age and WM volume decrease, suggesting that the impact of age is mild. Similarly, the proportion of women was slightly higher in the CIS group but we did not find a correlation between gender and WM volume. Another point to consider is the high disease duration (10.2 years) compared to the relatively low disability level (mean EDSS score of 3.4) in our cohort. A possible explanation is that we selected patients

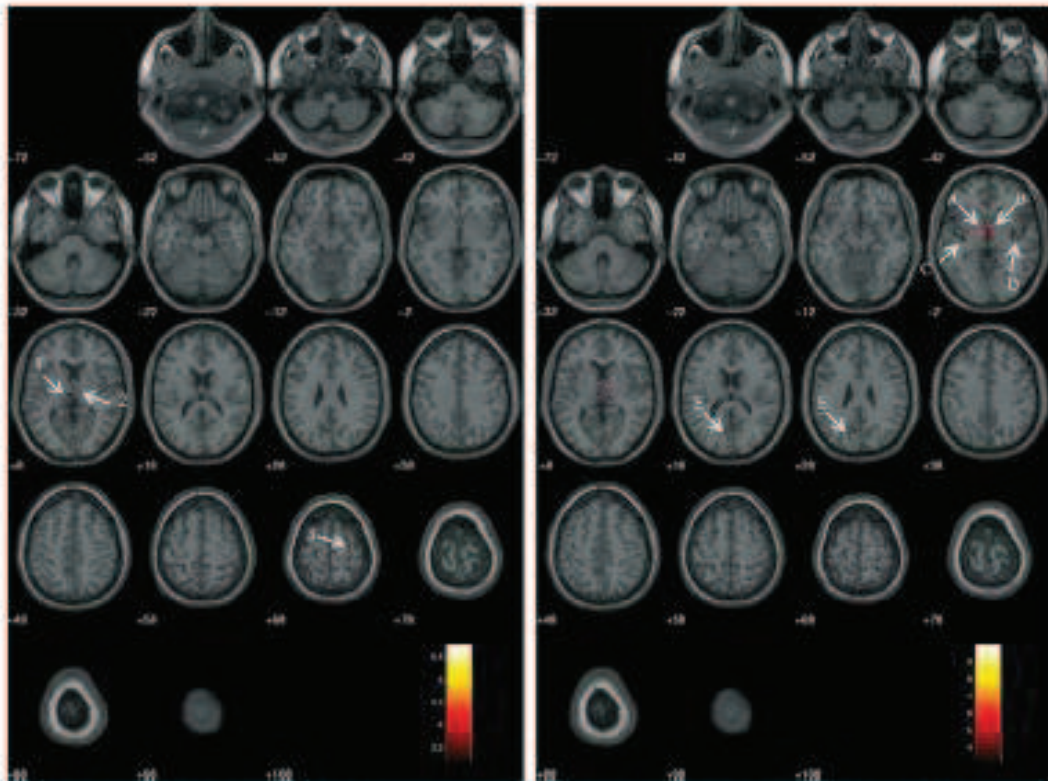


Figure 3 Gray matter (GM) volume regional decrease in neuromyelitis optica (NMO) compared to healthy subjects and in multiple sclerosis (MS) compared to NMO subjects. Left hemisphere is represented on the left part of each section. On the left of the figure, the GM volume decrease in NMO compared to healthy subjects: we observed a significant loss of volume in the left thalamus (1), the right thalamus (2) and the right prefrontal cortex (3) ($P < 0.001$, uncorrected). On the right, the GM volume decrease in MS compared to NMO subjects: we observed a significant loss of volume in the left thalamus (A), the right thalamus (B), the left insula (C), the right insula (D) and in some regions of bilateral occipital and parietal cortex (E) ($P < 0.001$, uncorrected).

who were not in a period of relapse and had a lower EDSS score than the patients of other studies. The EDSS score of MS patients with similar disease duration was slightly lower (2.5), which is consistent with the higher severity of NMO. The proportion of NMO IgG-positive patients (57%) is relatively low but similar or lower levels have been reported earlier [19,20].

Taken together, the data reported here suggest the presence of significant changes in brain volume of patients with NMO and point out the particular impact on WM. The changes might be diffuse in WM and restricted to a few areas in GM. The volume decrease can be found even in the absence of apparent T2 hyperintensities in the brain. This specificity may be useful to differentiate NMO from MS patients and understand the mechanisms of damage in both diseases. Other studies are needed to confirm these

results and explore the potential predictive factors of reduced WM volume.

Disclosure of conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- O'Riordan JI, Gallagher HL, Thompson AJ, et al. Clinical, CSF, and MRI findings in Devic's neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; **65**: 382-387.
- Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 2006; **66**: 1485-1489.
- Calera-Gomez JA, Kiese I. Conventional brain MRI in neuromyelitis optica. *Eur J Neurol* 2012; **19**: 812-819.

4. Pittack SJ, Lennon VA, Krecke K, Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Brain abnormalities in neuromyelitis optica. *Arch Neurol* 2005; **63**: 396-398.
5. Yu CS, Lin FC, Li KC, et al. Diffusion tensor imaging in the assessment of normal-appearing brain tissue damage in relapsing neuromyelitis optica. *Acta J Neurochil* 2006; **27**: 1009-1015.
6. Blume F, Zephir H, Leheran C, et al. Cognitive functions in neuromyelitis optica. *Arch Neurol* 2004; **65**: 84-88.
7. Collongues N, Marignier R, Zephir H, et al. Neuromyelitis optica in France: a multicenter study of 125 patients. *Neurology* 2010; **74**: 736-742.
8. Grunari B, Desgranges B, Eustache F, Defer G. Quantification and clinical relevance of brain atrophy in multiple sclerosis: a review. *J Neurol* 2009; **256**: 1397-1412.
9. Smith SM. Fast robust automated brain extraction. *Hum Brain Mapp* 2002; **17**: 143-155.
10. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald Criteria. *Ann Neurol* 2011; **69**: 292-302.
11. Yu C, Lin F, Li K, et al. Pathogenesis of normal-appearing white matter damage in neuromyelitis optica: diffusion-tensor MR imaging. *Radiology* 2008; **246**: 222-228.
12. Jeantroux J, Kremer S, Lin XZ, et al. Diffusion tensor imaging of normal-appearing white matter in neuromyelitis optica. *J Neurochil* 2011; [Epub ahead of print].
13. Liu Y, Duan Y, He Y, et al. A tract-based diffusion study of cerebral white matter in neuromyelitis optica reveals white-matter pathological alterations. *Mult Scler* 2011; **18**: 1013-1021.
14. Liang P, Liu Y, Jia X, et al. Regional homogeneity changes in patients with neuromyelitis optica revealed by resting-state functional MRI. *Clin Neurophysiol* 2011; **122**: 121-127.
15. De Seze J, Blain F, Kremer S, et al. Magnetic resonance spectroscopy evaluation in patients with neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; **81**: 409-411.
16. Blain F, Noblet V, Jung B, et al. White matter atrophy and cognitive dysfunction in neuromyelitis optica. *PLoS ONE* 2012; **7**: e33878. [Epub 2012 April 3].
17. Duan Y, Liu Y, Liang P, et al. Comparison of grey matter atrophy between patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis: a voxel-based morphometry study. *Eur J Radiol* 2012; **81**: e110-e114.
18. Audon B, Tharrola D, Malikova I, et al. Onset and underpinnings of white matter atrophy at the very early stage of multiple sclerosis - a two-year longitudinal MRI/MRSI study of corpus callosum. *Mult Scler* 2007; **13**: 41-51.
19. Calvo P, González-Quevedo A, Bonnan M, et al. Relapsing neuromyelitis optica: long term history and clinical predictors of death. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009; **80**: 1163-1164.
20. Petzold A, Marignier R, Verbeek MM, et al. Glial but not axonal protein biomarkers as a new supportive diagnostic criteria for Devic neuromyelitis optica? Preliminary results on 188 patients with different neurological diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; **82**: 467-469.

COMMENTAIRES

Historiquement, la NMO a été définie comme une maladie de la moelle épinière et des nerfs optique épargnant le reste de l'encéphale (Jarius and Wildemann, 2013). Cependant l'utilisation de l'IRM a montré la présence d'hypersignaux cérébraux en séquence FLAIR. C'est pourquoi les critères de Wingerchuk n'exigeaient pas que l'IRM cérébrale soit complètement normale mais qu'elle ne remplisse pas les critères de diagnostic de SEP (Wingerchuk et al., 2006a).

Nous avons cité dans l'article 6 plusieurs travaux qui s'étaient intéressés au retentissement de la NMO sur le cerveau par l'étude de l'IRM de diffusion, de la spectroscopie, de l'IRM fonctionnelle et de la mesure du volume de substance grise. Elles s'accordaient sur le fait qu'il existait une altération nette au niveau des voies motrices, sensibles et/ou visuelles attribuées à une dégénérescence wallérienne secondaire aux lésions de la moelle épinière et des nerfs optiques. La présence de lésions significatives en dehors de ces voies faisait par contre débat. Notre travail avait l'avantage d'avoir été réalisé sur un échantillon de taille relativement importante où les patients NMO étaient comparés à des patients SEP et d'autres atteints de syndrome cliniquement isolé et des sujets sains. Nous avons étudié à la fois le volume global de substance blanche et grise et le volume focal de chaque structure cérébrale par VBM. Nos résultats plaident en faveur d'une atteinte directe du cerveau, non limitée à une dégénérescence wallérienne.

De façon intéressante nous retrouvons une atrophie élective du corps calleux dans les zones périventriculaires sous-épendymaires riches en AQP4. Des hypersignaux transitoires avaient aussi été retrouvés dans certaines zones périventriculaires chez le rat (article 1). Ces résultats suggèrent qu'une inflammation à prédominance optico-médullaire aura tendance à concerner aussi les zones périventriculaires. La présence d'hypersignaux T2/FLAIR dans le corps calleux avait déjà été

signalée dans la NMO (Nakamura et al., 2009). Une étude récente en IRM à haut champ a confirmé la présence de lésions cérébrales sous-épendymaires chez l'homme (Kister et al., 2013a). Deux travaux récents en IRM de diffusion incluant 24 patients (Zhao et al., 2012) et en IRM classique incluant 28 patients (Makino et al., 2013) signalaient aussi des anomalies du corps calleux dans la NMO. Une autre étude utilisant plusieurs techniques d'exploration cérébrale (diffusion, volumétrie mais aussi transfert de magnétisation et spectroscopie) n'a pas trouvé de différence entre les patients NMO et les sujets sains (Pichiecchio et al., 2012). Elle s'était basée cependant uniquement sur 8 patients NMO ce qui peut restreindre la force statistique. De plus les auteurs retrouvent tout de même une diminution du volume de substance grise prédominant au niveau du cortex moteur et visuel mais concernant aussi les zones responsables du langage et des fonctions exécutives donc au niveau préfrontal comme dans notre étude.

Une étude récente anatomopathologique de la substance grise de patients NMO avec troubles cognitifs a montré de façon intéressante une perte neuronale en rapport avec une dysfonction astrocytaire corticale (diminution d'expression de l'AQP4 et de la GFAP) mais sans dépôts de complément ni même de modification du marquage des transporteurs des acides aminés excitateurs EAAT. Il n'y avait pas de démyélinisation ni de perte des oligodendrocytes contrairement aux lésions de la substance grise dans la SEP (Saji et al., 2013). Ces résultats sont en faveur d'une dysfonction corticale dans la NMO non liée à une inflammation localisée mais plutôt à l'action directe des anticorps anti-AQP4 ou d'autres facteurs sur les astrocytes. Cela pourrait expliquer pourquoi nous trouvons une perte du volume de substance grise limitée à quelques zones alors qu'aucun hypersignal cortical ou juxta-cortical n'est constaté en séquences T2/FLAIR, même en utilisant un champ de 7 teslas (Kister et al., 2013a). La lésion astrocytaire puis neuronale se produirait sans démyélinisation ni infiltration de cellules inflammatoires donc sans œdème visible à l'IRM classique qui mesure les variations de la teneur en eau du tissu. Cela pourrait aussi expliquer

pourquoi nos résultats de l'article 6 indiquent une atrophie de la substance blanche même en l'absence d'hypersignaux FLAIR : une partie significative des lésions ne provoquerait pas de démyélinisation.

Dans notre étude, l'atteinte du volume cérébral n'était pas corrélée à la présence ou non d'anticorps anti-AQP4 ce qui relativise leur rôle dans les lésions du cerveau. La recherche d'autres facteurs immunologiques pourrait être intéressante.

En conclusion la caractérisation de l'atteinte du cerveau dans la NMO par l'imagerie est un champ de recherche très dynamique. Notre travail entre dans ce cadre et devrait aider à mieux comprendre les répercussions de la NMO.

2) Répercussions sur la qualité de vie, la fatigue et l'humeur

Article 7: Chanson JB, Zephir H, Collongues N, Outteryck O, Blanc F, Fleury M, Vermersch P, De Seze J. Evaluation of health-related quality of life, fatigue and depression in neuromyelitis optica. *Eur J Neurol.* 2011 Jun;18(6):836-41.

Evaluation of health-related quality of life, fatigue and depression in neuromyelitis optica

J.-B. Chanson^a, H. Zéphir^b, N. Collongues^a, O. Outteryck^b, F. Blanc^a, M. Fleury^a, P. Vermersch^b and J. de Seze^a

^aDépartement de Neurologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Strasbourg, Strasbourg, France and ^bDépartement de Neurologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, Lille, France

Keywords:
neuromyelitis optica,
quality of life, fatigue,
depression, NMO-IgG

Received 23 June 2010
Accepted 22 September 2010

Background: The burden of multiple sclerosis (MS) includes fatigue, depression and worsening of health-related quality of life (HRQOL). These changes have not been yet measured in neuromyelitis optica (NMO). Our aim was to assess the HRQOL, fatigue and depression in NMO.

Methods: We administered French validated self-questionnaires on HRQOL (SEF-59), fatigue (EMIF-SEP) and depression (EHD) to 40 patients followed up in two centres. We assessed the relationship of these parameters with gender, age, disability, disease duration, visual acuity and NMO antibody status and also compared our results with equivalent data in MS and normal subjects derived from previous studies. **Results:** Health-related quality of life scores were lower ($P < 0.01$) in patients with NMO when compared to normal subjects. No significant difference was noted between patients with NMO and MS for most scores, the exceptions being HRQOL related to cognitive function (better in NMO than in MS), HRQOL related to sphincter dysfunction (worse in NMO than in MS), HRQOL related to psychological dimension of fatigue (milder in NMO than in MS). Disability was the main predictive factor of an unfavourable evolution.

Discussion: This study reveals the strong impact of NMO on HRQOL, fatigue and depression and the importance of screening patients, especially the more disabled, in order to initiate suitable treatment.

Introduction

Impairment of health-related quality of life (HRQOL) [1,2] as well as frequent and severe fatigue [3,4] and depression [5,6] are now recognized as a major part of the burden of multiple sclerosis (MS). The early detection of these changes is crucial for treatment adaptation, such as the prescription of antidepressants, but also for comprehensive action on the patient's environment [2]. Early detection requires the identification of reliable predictive factors [7,8]. In MS, disability, evaluated by the Expanded Disability Status Scale (EDSS) score [9], is reported to be correlated with fatigue [8] and a decrease in HRQOL [7,10]. The more disabled patients are therefore more likely to suffer from fatigue and have an impaired HRQOL and should be specifically screened for these disturbances.

Neuromyelitis optica (NMO or Devic's disease) is another inflammatory disease of the central nervous system in which lesions predominate on spinal cord and optic nerves [11]. It is generally considered as a more severe disease than MS because it results in more disabling symptoms requiring frequently an immunosuppressive treatment [11,12]. Guidelines on diagnosis and management of this disease have been recently published [13].

To date, however, no study has addressed the important issue of HRQOL, fatigue and depression in NMO. We therefore evaluated the importance of these disorders in NMO and assessed the reliability of some potential predictive factors. We then compared our results to the data available in patients with MS.

Patients and methods

Patients

The study participants comprised 40 consecutive patients with NMO, diagnosed according to the revised

Correspondence: J.-B. Chanson, Département de Neurologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Strasbourg, 1 place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, Cedex, France (tel.: +33 388116662; fax: +33 388116347; e-mail: jean-benoit.chanson@chru-strasbourg.fr)

criteria of Wingerchuk *et al.* (2006) [14] recruited in the Neurology Departments of the University Hospitals of Strasbourg and Lille between September 2008 and June 2009. Gender, age, disease duration and NMO-antibody status were recorded for each patient. We also looked for the presence of immunosuppressive treatment. Disability was evaluated using the EDSS score. To assess precisely the impact of partial loss of visual function, the visual acuity of both eyes was assessed by an ophthalmologist. The research protocol was approved by the ethics committee of the University Hospital of Strasbourg and the commission nationale de l'informatique et des libertés.

Methods

Three self-questionnaires were administered to each patient to study HRQOL, fatigue and depression. An informed consent was obtained from each subject.

Health-related quality of life was measured by the SEP-59 [15], the French version of Multiple Sclerosis Quality of Life (MSQOL)-54 Instrument [16]. This scale is widely used in MS and presents the advantage of having both generic (derived from the SF-36 scale [17]) and MS-specific HRQOL assessments. Thus, it allows a comparison with the general population and with patients suffering from numerous diseases, but also provides a precise evaluation of the specific HRQOL impairment in inflammatory neurologic diseases. Its French version has been validated [15] and includes 59 questions (54 from original MSQOL-54 and 5 additional questions) grouped into 14 multi-item subscales and two single-item subscales. The subscales assessed the following dimensions of HRQOL: (i) physical function (Phys func); (ii) role limitations because of physical problems (Role phys); (iii) role limitations because of emotional problems (Role emo); (iv) social function (Soc func); (v) pain; (vi) energy; (vii) emotional well-being (Emo WB); (viii) health perception; (ix) health distress; (x) cognitive function (Cog func); (xi) sexual function (Sex func); (xii) satisfaction with sexual function (Sat sex); (xiii) overall HRQOL (OH); (xiv) bladder and bowel function (BB func); (xv) sleep; and (xvi) social support (Soc supp). Scores were created by averaging items within subscales and transforming average scores linearly to 0-100 possible scores, with higher values indicating better HRQOL. Two composite scores, reflecting the physical (Phys comp) and mental (Ment comp) dimensions of HRQOL, were calculated as indicated by Vickrey *et al.* [12]. Our patients' results were compared to those of 117 patients with MS reported by Gerbaud *et al.* [18] (first MS group). For the items issued from SF-36 scale, our patients' results were also compared to those of a

cohort of 1008 normal subjects (normal subjects group) [19].

Fatigue was assessed by the EMIF-SEP [20], the French version of the Fatigue Impact Scale [3]. This scale in English includes 40 questions and is more precise than the Fatigue Severity Scale (nine questions) or the Modified Fatigue Impact Scale (21 questions). It provides a detailed assessment of the physical, cognitive and social aspects of MS-related fatigue. Its French version has recently been validated [20] and includes 43 questions grouped into four subscales evaluating the cognitive, physical, psychological and social dimensions of fatigue. All response items were rated on a four-point scale and scores were also created by averaging items within subscales and transforming average scores linearly to 0-100 possible scores, with higher values indicating higher fatigue. Our patients' results were compared to those of 297 patients with MS reported by Debouverie *et al.* [20] (second MS group).

Depression was evaluated by the EHD ('Echelle d'Humeur Dépressive' or Depressive Mood Scale) [6]. This 11-item French questionnaire has been specifically designed and validated for the assessment of depression in MS. It focuses on the detection of mood changes rather than somatic symptoms of depression because the latter ones could be confused with the MS (or NMO) symptomatology. A first subscale (seven items) assesses the lack of emotional control dimension (lack emo control) and a second subscale (four items) the 'blunted affect' dimension of depression. A positive correlation has been found between the total EHD questionnaire score and both subscores on the one hand, and the Beck Depression Inventory score [21] on the other hand. All response items were rated on a four-point scale (from one ('no sign of depression') to four ('severe mood disturbances')). The scores for each subscale were calculated by summing all the items related to the subscale. The global score was similarly obtained by summing all items. Our patients' results were compared to those of 77 patients with MS reported by Radat *et al.* [6] (third MS group).

For all questionnaires, the score for each subscale was calculated only if the participant had completed more than half of the questions comprising the subscale. For blind subjects, the questions were read by a doctor or a nurse, who also registered the patients' responses.

Statistical analysis

Differences in data across groups (NMO, MS and control groups) were assessed by the two-tailed Student's *t*-test.

Non-parametric statistical tests were used to study the correlations between the patients' characteristics and the results of the tests. We also assessed the impact of global depression and global fatigue on both the physical and mental composite scores of HRQOL. Mann-Whitney *U* test was used for non-numerical values (such as gender and presence of NMO-antibody) and the Kendall's tau b test for numerical values. The scores were adjusted for age and EDSS using a multiple linear regression to avoid the influence of these variables. Finally, we used the two-tailed Student's *t*-test to compare HRQOL, fatigue and depression between the patients with immunosuppressive treatment and without it.

A value of $P < 0.05$ was considered significant. The analyses were conducted using SPSS software (SPSS Inc®, Chicago, USA).

Results

Sixty-five per cent of patients with NMO were women. For all patients with NMO, mean age was 45.2 ± 13.7 years (mean \pm standard deviation), mean disease duration was 9.5 ± 9 years, mean EDSS score was 3.5 ± 2.4 and mean visual acuity (70) was 6.6 ± 4.1 . Thirty-nine per cent of patients were NMO-antibody positive. Ninety-five per cent of the subjects were outpatients. Fifty-five per cent were under immunosuppressive treatment (i.e. azathioprine, cyclophosphamide, rituximab, mycophenolate mofetil or mitoxantrone). Data for the other groups (i.e. MS and normal subjects groups) are summarized in Table 1. All groups were similar in terms of age, EDSS score and disease duration except for the age and EDSS score of the third MS group [6] and for the age of the normal subjects group [19]. Each item was completed by at least 90% of the patients with NMO except for the items 'sexual function' (84%) and 'satisfaction with sexual function' (84%).

The comparison between NMO and MS (Fig. 1) demonstrated significant differences in HRQOL related to bladder and bowel function (worse in NMO) and HRQOL related to cognitive function (better in NMO). We did not observe any significant difference for the

other subscores of SF-36 scale. A very significant worsening of HRQOL in patients with NMO compared to normal subjects was found in all items of the SF-36 scale. The scores for all dimensions of fatigue were lower in NMO than in MS but this difference reached the level of statistical significance only for the psychological dimension. The intensity of depression was similar in patients with NMO and MS.

A very strong correlation ($P < 0.001$) was observed between global fatigue, global depression and a decrease of physical and mental composite scores of HRQOL. The main predictive factor (Table 2) of impairment of HRQOL, fatigue and depression was a high EDSS score. Adjustment for duration of disease and age does not modify these correlations. We did not find significant differences between patients with treatment and without it.

Discussion

Our results provide the first evidence in NMO of a severe impairment of HRQOL, broadly similar to that reported in MS. The opticospinal localization of lesions in NMO could explain the higher score for HRQOL related to cognitive function and the lower score for HRQOL related to bladder and bowel function, compared to patients with MS. We similarly observed a non-significant trend towards a better HRQOL in mental dimensions of HRQOL (emotional well-being, energy), whereas a worse or similar HRQOL was noted in physical dimensions (physical function, sexual function). Accordingly, the physical health composite score was worse in NMO (46.8) than in MS (48.3) whilst the mental health composite score was better in NMO (55.2) than in MS (51.3). The mental dimension scores in NMO nevertheless remained lower than those in normal subjects. The 'role limitations because of physical problems' score was higher (i.e. better) in NMO than in MS, although the physical function score, which directly assesses the physical disabilities, was lower. Indeed, the first score evaluates the limitations in daily activities attributed by the patient to physical disabilities. Thus, the higher level of fatigue noted in MS could have resulted in a higher evaluation of limi-

Table 1 Characteristics of patients in the different groups

	Number of subjects	Age (years) (mean \pm SD)	% women	EDSS (mean \pm SD)	Disease duration (years) (mean \pm SD)
NMO group	60	45.2 \pm 13.7	65	3.5 \pm 2.4	9.5 \pm 9
First MS group [17]	117	43 \pm 10.2	73	3.6 \pm 2.1	9.2 \pm 7.9
Second MS group [19]	237	42.5 \pm 10.9	71.3	3.7 \pm 1.7	9.8 \pm 7.4
Third MS group [6]	77	60.6 \pm 9.9*	71.3	†	11.4 \pm 8
Normal subjects group [24]	1007	39*	51		

*Significant difference ($P < 0.05$) with NMO group; †mean and standard deviation not available; median EDSS score was 1.

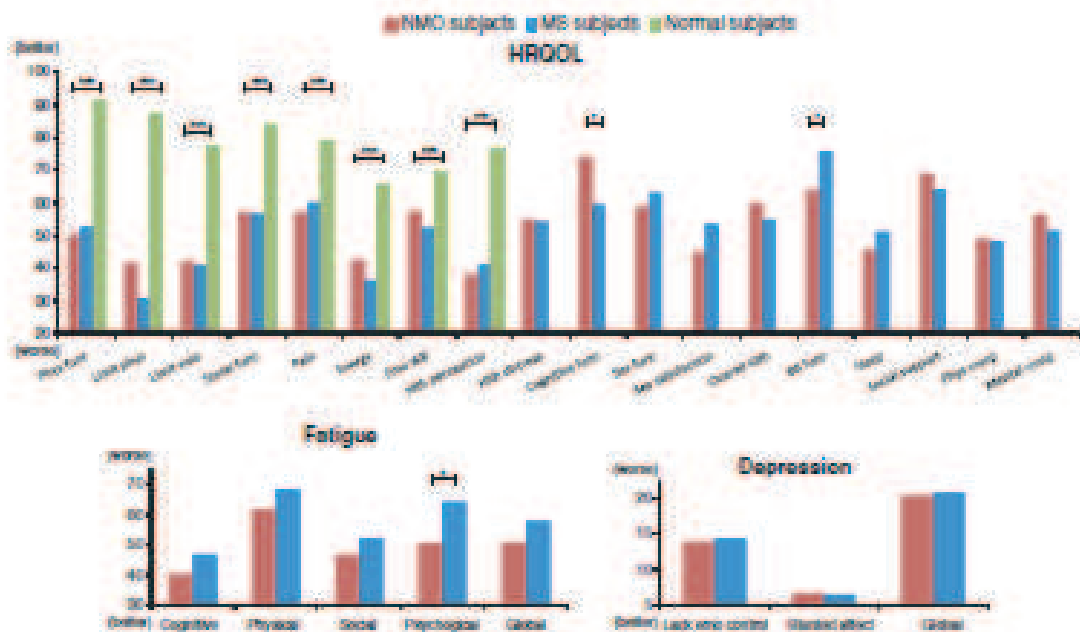


Figure 1 Comparison between NMO, MS and normal subjects for each subscore of HRQOL, fatigue and depression. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; a) Abbreviations are defined in the Patients and Methods section; higher scores in HRQOL subscores correspond to better symptoms, whereas higher scores in fatigue and depression subscores correspond to worse symptoms.

tations for a given level of physical disability which might therefore account for this apparent discrepancy.

All scores of fatigue are lower (i.e. better) in NMO than in MS, but this difference reached the level of statistical significance only for the psychological dimension. Interestingly, the difference between NMO and MS is similar in physical and cognitive dimensions of fatigue, although the opticospinal lesions should not interfere with cognitive functions. A lack of specificity of the subscales or the onset of depression because of consciousness of the physical and social limitations could have been responsible for this effect. A direct role of inflammation could also exist. Indeed, some studies have suggested that pro-inflammatory cytokines may play a causative role in the development of fatigue in MS [22,23]. A marked rise in cytokine production was also proved in NMO [24–26]. The pattern of cytokine secretion was not exactly the same as in MS [25] but these immune mediators could also play a role in the onset of fatigue in NMO.

These results provide a first approach to the severity of HRQOL, changes, fatigue and depression in NMO but some limitations must be pointed out. Firstly, the number of patients in this study was limited by the low prevalence of NMO, even though patients were recruited in two neurological centres. Secondly, we did

not ourselves apply the questionnaires to MS and normal subjects groups used in the comparisons. Indeed, several studies have still measured HRQOL, fatigue and depression in MS. Especially, the French and English versions of the questionnaires about HRQOL [1,7,15,16,18,27] and fatigue [4,8,20] have been widely used. Amongst the data identified in a search of the medical literature, we were able to select some MS cohorts similar to our NMO group in terms of age, gender, disease duration and EDSS score. However, because of the limited number of studies that used the EHD scale, we chose an MS group slightly younger than our NMO group (Table 1) [6]. The normal subjects in the control group of the study reported by Ferneger *et al.* [19] were also younger than our NMO patients but this cohort was the largest amongst those tested with the French version of the SF-36 scale. Its use enabled us to show a very significant difference between normal and NMO subjects ($P < 0.001$). We cannot therefore rule out the possibility of a different result with an age-matched group of normal subjects, though this seems unlikely.

Furthermore, some characteristics of our cohort should be noted. Firstly, the mean duration of disease is relatively high (9.5 years) whilst the level of disability is relatively low (mean EDSS score of 3.5). A possible

Table 2 Correlations between characteristics of patients and each subscale of (a) HRQOL and (b) fatigue and depression

	Male gender	Age	Duration	EDSS	Visual acuity	Aβ
(a)						
Phys. func.	0.238*	0.218*	0.421	-0.301***	0.256*	0.433
Role phys.	0.287	0.096	0.264	0.201	0.525	0.426
Role soc.	0.602	0.096	0.627	0.318*	0.119	0.770
Soc. func.	0.619	0.417	0.373	0.065	0.678	0.732
Pain	0.287	0.012*	0.704	0.065	0.236	0.196
Energy	0.111	0.038*	0.054	0.005**	0.408	0.483
Health WB	0.017	0.138	0.315	0.32	0.271	0.045
HP*	0.06	0.174	0.284	0.000**	0.07	0.627
HD	0.02	0.279	0.694	0.217	0.179	0.722
Cog. func.	0.09	0.103	0.066	0.74	0.21	0.292
Soc. func.	0.204	0.006**	0.006**	0.012*	0.272	0.397
Sat. sex	0.298	0.434	0.65	0.176	0.300	0.091
OD	0.026*	0.137	0.926	0.017*	0.236	0.116
HR func.	0.245	0.657	0.260	0.32	0.071	0.072
Sleep	0.157	0.285	0.212	0.528	0.025*	0.57
Soc. sup.	0.123	0.572	0.797	0.013*	0.012*	0.291
Phys. comp.	0.149	0.026*	0.92	0.002**	0.449	0.604
Mental comp.	0.149	0.54	0.95	0.015*	0.562	0.283
(b)						
Cognitive dim. fat.	0.277	0.228	0.695	0.115	0.021	0.951
Physical dim. fat.	0.121	0.065	0.282	0.019*	0.952	0.118
Social dim. fat.	0.092	0.228	0.558	0.021*	0.190	1
Psycho dim. fat.	0.295	0.29	0.529	0.091	0.221	0.671
Global fat.	0.026	0.107	0.909	0.012*	0.120	0.981
Lack of time control	0.613	0.002	0.721	0.226	0.002	0.407
Worried affect	0.202	0.212	0.549	0.02*	0.02	0.69
Depression	0.048	0.617	0.71	0.101	0.8	0.476

Numbers represent the value of alpha risk (p) calculated for each correlation between a patient characteristic and a subscale. Values < 0.05 (corresponding to a significant difference) are indicated in bold characters (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). M/Gender, male gender; A β , presence of NMO-antibodies; other abbreviations are defined in the Results and Methods section.

explanation is the high proportion of outpatients followed up for many years in Strasbourg and Lille. They were not in a period of relapse at the inclusion visit and had a lower EDSS score than patients of other studies. Our results are therefore more relevant for evaluation of HRQOL, fatigue and depression several years after NMO diagnosis than in newly diagnosed patients. Secondly, we found NMO-antibody in only 39% of patients. The sensitivity of NMO-antibody is usually evaluated between 55% and 75% but is not clearly established [15]. Our findings are within the range of recent studies reporting a sensitivity of NMO-antibody as low as 33%. [28,29]

The main factor predicting an unfavourable evolution of HRQOL, fatigue and depression in our NMO cohort was the EDSS score. Its main impact was on the physical dimensions of HRQOL (physical function and physical composite scores) but it also had an effect on some subscales assessing the mental dimensions of HRQOL (energy, health perception and mental composite score), as in MS [7,10,16]. We showed that the effect of EDSS score on fatigue predominates on the physical, social and global dimensions. A similar pattern of impact was previously reported in MS, [4,30]

though other studies failed to find a link between disability and fatigue in MS. [3,4] A mild effect of gender was observed with a worse HRQOL for men in two subscales. The physical activity subscore was 34.2 for men versus 58.4 for women and the overall health subscore was 48.5 for men versus 65.4 for women. We noted no significant difference for HRQOL related to sexual satisfaction (42.2 for men versus 46.4 for women) or sexual function (57.7 vs. 59.3). No impact of NMO-antibody status on HRQOL, fatigue and depression was observed. Age could have a negative impact on several aspects of HRQOL in NMO but a worsening of HRQOL scores with age is described in the general population [31]. Thus, the particular effect of age in NMO is difficult to determine. A treatment by immunosuppressive drugs did not result in significant HRQOL, fatigue and depression changes. An explanation could be that positive effects on the disease course are counterbalanced by side effects of the immunosuppressants. The particular characteristics of patients with this type of treatment probably played a role. The strong impact of depression and fatigue on HRQOL found in NMO has similarly been reported in

MS [28]. Longitudinal studies are needed to evaluate other potential factors of HRQOL alteration, fatigue and depression such as the number and type of relapses.

Taken together, the changes in HRQOL, fatigue and depression occurring in NMO seem to be as severe as in MS. This new aspect of the burden of NMO points to the importance of early and active treatment against NMO. Indeed, active treatment will be helpful to prevent not only the onset of physical disability but also the appearance of fatigue, depression and impairment of HRQOL, which are correlated to the EDSS score. Moreover, the evolution of this range of disorders could be a criterion for treatment efficiency in clinical trials. Currently, MSQOL-54 or fatigue scales form part of clinical trials in MS. In clinical practice, patients with NMO, and especially the most severely disabled, must be carefully screened for these disorders, possibly with the use of self-questionnaires. Their detection will enable specific treatment or other action to be initiated as early as possible and may also lead to a better understanding of the dimensions affected by the disease.

References

1. The Canadian Burden of Disease Study Group. Burden of illness of multiple sclerosis: part II: quality of life. *Can J Neurol Sci* 1998; **25**: 31–38.
2. Claessens P, Auclair C, Tallier F, Gerbaud L. Quality of life in Multiple Sclerosis. *Rev Neurol (Paris)* 2009; **165**(HS2): 123–128.
3. Poku JD, Pomegranat A, Eisinger PG, Archibald CJ, Murray TJ. The impact of fatigue on patients with multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 1994; **21**: 9–14.
4. Bakshi R. Fatigue associated with multiple sclerosis diagnosis, impact and management. *Mult Scler* 2003; **9**: 219–227.
5. Ziemssen T. Multiple sclerosis beyond EDSS: depression and fatigue. *J Neurol Sci* 2009; **273**(Suppl 1): S17–S41.
6. Radin F, Laffitte M, Ouallet JC, Brochet B, Jouvent B. Validation of EHD self-questionnaire in multiple sclerosis. *Encephale* 2007; **33**: 49–57.
7. Miller A, Dixon S. Health-related quality of life in multiple sclerosis: The impact of disability, gender and employment status. *Qual Life Res* 2006; **15**: 239–271.
8. Pélissier-Vinograd S, Debouverie M, Guillenot F, Vandenberghe N, Antonina R, Veyspinami H. Fatigue in multiple sclerosis is related to disability, depression and quality of life. *J Neurol Sci* 2006; **249**: 39–45.
9. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; **33**: 1444–1452.
10. Pittock SJ, Mayr WT, McClelland RL, et al. Quality of life is favorable for most patients with multiple sclerosis: a population-based cohort study. *Arch Neurol* 2004; **61**: 679–684.
11. Wingerchuk DM, Hagenang WF, O'Brien PC, Weinshenker BG. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology* 1999; **53**: 1107–1114.
12. De Saze J. Neuromyelitis optica. *Arch Neurol* 2003; **60**: 1334–1338.
13. Selzer J, Boggild M, Claus M, et al. EFNS guidelines on diagnosis and management of neuromyelitis optica. *Eur J Neurol* 2010; **17**: 1009–1020.
14. Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 2006; **66**: 1485–1490.
15. Vermye D, Gerbaud L, Biloay S, et al. Quality of life and multiple sclerosis: validation of the French version of the self-questionnaire (SEP-59). *Rev Neurol (Paris)* 2002; **158**: 247–263.
16. Vickrey BG, Hays RD, Haroon E, Myers LW, Ellison GW. A health-related quality of life measure for multiple sclerosis. *Qual Life Res* 1995; **4**: 317–326.
17. Ware JE Jr, Kosinski M. The MOS 36-Item Short-Form Health Survey (SF-36) I. Conceptual framework and item selection. *Med Care* 1992; **30**: 473–483.
18. Gerbaud L, Deffieux D, Muller A, Benoit F, Vermye D, Claessens P. Cognitive impairment and quality of life in multiple sclerosis patients. *Rev Neurol (Paris)* 2006; **162**: 976–979.
19. Peringer TV, Leplège A, Euzé JE, Rougemont A. Validation of a French-language version of the MOS 36-Item Short-Form Health Survey (SF-36) in young healthy adults. *J Clin Epidemiol* 1995; **48**: 1053–1060.
20. Debouverie M, Pélissier-Vinograd S, Louis S, Guillenot F. Validity of a French version of the fatigue impact scale in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2007; **13**: 1026–1032.
21. Beck AT, Steer E, Garlin M. Psychometric properties of the Beck Depression Inventory: twenty-five years of research. *Clin Psychol Rev* 1988; **3**: 77–100.
22. Pacherbauer P, Bähr L, Weber F, Grottelshik M, Toyka KV, Riedemann P. Cytokine mRNA expression in patients with multiple sclerosis and fatigue. *Mult Scler* 2004; **10**: 165–169.
23. Hagen C, Newirth L, Reich C, Bauer N, Schulz KH, Gold SM. Fatigue in multiple sclerosis: an example of cytokine mediated sickness behaviour? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; **77**: 34–39.
24. Peltin-Rol G, Gruesztes-Llana M, Martínez-Sánchez G, et al. TNF- α and IL-35 downregulation and marked oxidative stress in Neuromyelitis Optica. *J Inheren (Lond)* 2009; **2**: 6–14.
25. Ugueto A, Mari M, Liu M, et al. Markedly increased CSF interleukin-6 levels in neuromyelitis optica, but not in multiple sclerosis. *J Neurol* 2009; **256**: 2062–2064.
26. Corveale J, Fiol M (2004) Activation of humoral immunity and eosinophils in neuromyelitis optica. *Neurology* **63**:263–267.
27. Brochet B, Delort MS, Ouallet JC, et al. Pain and quality of life in the early stages after multiple sclerosis diagnosis: a 3-year longitudinal study. *Clin J Pain* 2009; **25**: 211–217.
28. Marignier E, De Saze J, Yukiue S, et al. NMO-IgG and Devic's neuromyelitis optica: a French experience. *Mult Scler* 2008; **14**: 440–445.
29. Cabrera-Gomez JA, Brown M, González-Quevedo A, et al. Neuromyelitis optica positive antibodies confer a worse course in relapsing-neuromyelitis optica in Cuba and French West Indies. *Mult Scler* 2009; **15**: 628–633.
30. Krosschell DC, Lynch SG, Dornay DR. Fatigue in multiple sclerosis: relationship to depression, disability, and disease pattern. *Mult Scler* 2005; **11**: 111–126.
31. Ware JE. *SF-36 Health Survey—Manual & Interpretation Guide*. Boston, MA: The Health Institute, 1992.

COMMENTAIRES :

La mesure des lésions IRM, du nombre de poussées et même du score EDSS des patients atteints de NMO ne donnent qu'un aperçu incomplet du handicap vécu par le patient. Or on sait que dans la SEP une grande partie du handicap vient de la fatigue (Bakshi, 2003), de la dépression (Ziemssen, 2009) et des troubles cognitifs ce qui entraîne une altération sévère de la qualité de vie (Clavelou et al., 2009). Il est donc important de mesurer ces paramètres qui n'avaient pas été étudiés auparavant et qui sont corrélés au plus près avec le vécu des patients.

Nos résultats confirment pour une certaine part la vision classique de la NMO. En effet on observe une atteinte plus importante que dans la SEP pour la qualité de vie liée à la vision et à la marche, 2 paramètres qui sont corrélés à l'atteinte des nerfs optiques et de la moelle épinière. De même on observe que la fatigue physique est plus importante que la fatigue psychique. Les patients SEP et NMO signalent une atteinte physique objective du même ordre (Phys) mais les patients SEP ont tendance à estimer qu'elle limite plus leur activité sans doute à cause de la fatigue, des troubles cognitifs ou de la dépression plus fréquente. Cependant les patients NMO obtiennent aussi des scores de bien être psychique mental et cognitif nettement inférieurs au maximum théorique. Il n'y a cependant pas de comparaison avec un groupe de sujets sains pour mesurer l'intensité de ces troubles. Des études ont suggéré la présence de troubles cognitifs dans la NMO, même en excluant les patients dépressifs (Blanc et al., 2008). Il pourrait donc y avoir une altération du bien être cognitif directement lié à la NMO.

Depuis la publication de notre article, une étude a confirmé la présence de troubles dysexécutifs chez 22 patients NMO et a notamment mis en lumière un lien important avec la dépression et la fatigue (He et al., 2011).

Un des déterminants importants de la qualité de vie est la douleur. Les données de la littérature soulignent la fréquence des symptômes douloureux dans la NMO. Une étude a retrouvé une douleur significative chez 83% de patients NMO contre 47% de patients SEP (Kanamori et al., 2011). L'étude de la qualité de vie liée à la douleur retrouvait des résultats généraux plus altérés dans la NMO que dans la SEP et cette altération prédominait dans le sous-score relié à la douleur. Une autre étude a confirmé le rôle important de la douleur dans l'altération de la qualité de vie et la survenue de la dépression chez les patients atteints de NMO (Qian et al., 2012). Le sous-score de qualité de vie liée à la douleur n'était pas le score le plus atteint dans notre travail mais il était tout de même au moins autant altéré que dans la SEP. La douleur devrait donc plus être prise en compte chez ces patients.

IV) DISCUSSION GENERALE ET PERPECTIVES

A) La dysfonction astrocytaire dans la NMO

La myéline constitue une grande partie du SNC et joue un rôle important pour faciliter la conduction nerveuse. Sa disparition, la démyélinisation, était une des données marquantes des analyses histologiques des patients atteints de SEP. Le dysfonctionnement, voire la mort, neuronal qui en résultait était facilement compréhensible. Les premières analyses anatomo-pathologiques de patients atteints de NMO s'étaient donc focalisées sur l'inflammation et ses rapports avec la myéline, les neurones et les oligodendrocytes et avaient négligé d'étudier en détail les astrocytes (Lucchinetti et al., 2002).

Suite à la découverte de la réactivité périvasculaire et des anticorps contre l'AQP4 en 2004-2005 (Lennon et al., 2005b; Lennon et al., 2004b), l'intérêt pour l'atteinte des astrocytes a été stimulée. L'hypothèse d'une atteinte des astrocytes a été appuyée par la diminution du marquage histologique GFAP chez les patients NMO (Misu et al., 2007; Roemer et al., 2007). Cette atteinte astrocytaire a été démontrée sur des cultures de cellules astrocytaires et des modèles in vitro de barrière entre le sang et le SNC (Sabater et al., 2009; Vincent et al., 2008). D'autres recherches ont suggéré que ces lésions astrocytaires étaient bien l'anomalie primaire dans la NMO et que les lésions oligodendrocytaires n'apparaissaient que secondairement. L'addition d'anticorps anti-AQP4 dans des cultures cellulaires d'oligodendrocytes et d'astrocytes mêlés pouvait en effet aboutir à un dysfonctionnement des oligodendrocytes mais seulement indirectement par l'altération de la fonction astrocytaire, notamment l'altération de la recapture du glutamate (Marignier et al., 2010). Il s'agissait d'une évolution conceptuelle importante par rapport à la SEP où l'atteinte primitive est

supposée se porter sur la myéline et l'oligodendrocyte. On a pu même qualifier la NMO d' « astrocytopathie » (Jacob et al., 2012a).

La recherche des mécanismes de l'atteinte astrocytaire a motivé de nombreuses études. Les recherches se sont notamment focalisées sur l'action des anticorps anti-AQP4 car ils constituaient un marqueur important de la maladie. Cependant cela ne doit pas occulter la recherche sur les formes séronégatives pour cet anticorps (cf ci-dessous). Plusieurs mécanismes d'action des anticorps anti-AQP4 ont été proposés (cf introduction). Un mécanisme important doit être l'attaque immune directe des astrocytes médiée par les anticorps. L'activation du complément et des cellules cytotoxiques (cellules NK, polynucléaires neutrophiles, macrophages) par les anticorps va aboutir à une nécrose astrocytaire sans apoptose (Sabater et al., 2009). Cela expliquerait les dépôts de complément et la présence de polynucléaires neutrophiles et éosinophiles périvasculaires authentifiés par les premiers travaux histologiques précis (Lucchinetti et al., 2002). Certains auteurs pensent que ce mécanisme est le seul significatif (Ratelade and Verkman, 2012; Sabater et al., 2009) . Au contraire, d'autres mettent en avant la possibilité de lésions astrocytaires indirectes qui seraient bien liées au contact entre l'anticorps anti-AQP4 et son antigène mais ne passeraient pas par une nécrose induite par le complément ou les cellules cytotoxiques. Dans ce cas de figure, l'anticorps anti-AQP4 altérerait la perméabilité de l'eau à travers les astrocytes et/ou provoquerait une internalisation de l'AQP4 et des canaux réabsorbant le glutamate et donc une excito-toxicité (Hinson et al., 2008; Hinson et al., 2012; Vincent et al., 2008).

Les résultats présentés dans cette thèse fournissent quelques éléments à apporter au débat.

La présence d'une augmentation nette des taux d'acétate sérique dans la NMO (article 4) est un nouvel argument suggérant une dysfonction astrocytaire significative dans la NMO et l'absence de gliose réactionnelle. En effet l'acétate est normalement absorbé préférentiellement par les astrocytes et son augmentation dans le sérum suggère une altération de cette capture par les

astrocytes. La présence d'une tendance à l'augmentation de la concentration de glutamate dans le sérum est intéressante car elle est en faveur d'une atteinte de la fonction astrocytaire de recapture de ce neurotransmetteur. Elle suggère qu'une excito-toxicité est à l'œuvre dans le SNC. Cette augmentation du glutamate pourrait être due au rôle spécifique des anticorps anti-AQP4 sur les récepteurs EAAT mais aussi à une destruction diffuse des astrocytes. Celle-ci pourrait en effet empêcher la recapture du glutamate de même que les autres fonctions astrocytaires.

Les résultats de nos études volumétriques (article 6) suggèrent une atteinte directe du cerveau dans la NMO. De façon intéressante, on constate une diminution du volume cérébral même chez les patients qui ne présentent pas d'hypersignaux en séquences T2/FLAIR. Ces hypersignaux apparaissent principalement en présence d'inflammation active avec œdème et démyélinisation qui perturbent la teneur en eau du tissu. Nos données suggèrent donc qu'un processus pathologique est à l'œuvre dans le cerveau d'apparence normal des patients NMO (matière blanche et certaines zones de matière grise). Ce processus pourrait passer par une autre voie que la nécrose astrocytaire génératrice d'œdème et d'hypersignaux T2/FLAIR. Ce raisonnement est appuyé par les résultats d'autres études. Ainsi il n'existe pas d'hypersignaux visibles en séquences T2/FLAIR de la substance grise corticale dans la NMO (Calabrese et al., 2012). L'analyse histologique du cortex ne montre en effet pas d'inflammation nette avec œdème et/ou démyélinisation qui pourrait être détectée par l'IRM classique. L'analyse anatomopathologique retrouve par contre des anomalies trophiques des astrocytes (gonflement, perte du marquage en AQP4 voire GFAP) retentissant sur les neurones sans altérer nettement les oligodendrocytes ni provoquer une démyélinisation. Ces lésions surviennent en l'absence de dépôts de complément ou d'infiltration cellulaire (Misu et al., 2012; Saji et al., 2013). L'astrocytopathie pourrait donc survenir par d'autres mécanismes que l'attaque du complément ou la cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps.

De même, dans notre modèle animal d'inflammation optico-médullaire (article 2), il est intéressant de noter la coexistence de plusieurs types de lésions. La présence d'une inflammation avec dépôt de complément et attraction de cellules polynucléaires avait déjà été décrite par Storch et al. (Storch et al., 1998). Nous avons complété cette description en montrant qu'à certains endroits (nerfs optiques) il existe une perte en AQP4 et GFAP suggérant une astrocytopathie « directe » avec inflammation et nécrose étendue des astrocytes sans apoptose. Ce mécanisme pourrait correspondre à une cytotoxicité médiée par le complément comme constaté dans les cultures cellulaires d'astrocytes où on rajoute des anticorps anti-AQP4 (Sabater et al., 2009). Dans la moelle épinière des rats, on trouve au contraire une apoptose astrocytaire sans diminution du marquage GFAP et AQP4 suggérant qu'un autre mécanisme, plus indirect, d'astrocytopathie est à l'œuvre. L'extrapolation à la NMO humaine doit être prudente mais il semble qu'un modèle animal d'inflammation optico-médullaire produise plusieurs types d'atteinte astrocytaire.

Les données de la littérature et celles présentées ici orientent donc vers la co-existence de plusieurs mécanismes à l'origine des lésions de NMO. Ils pourraient différer selon la localisation des lésions et impliquer de façon plus ou moins importante les anticorps anti-AQP4. La majorité des recherches s'est en effet portée jusqu'ici sur les mécanismes impliquant les anticorps anti-AQP4 mais la recherche sur les formes de NMO séronégatives pourrait nous suggérer d'autres pistes.

B) Les NMO séronégatives pour les anticorps anti-AQP4

Les anticorps anti-AQP4 jouent un rôle important de marqueur diagnostique et ont un certain rôle pathogénique. Cependant il existe une part importante de patients (entre 20 et 50% selon les études) remplissant les critères diagnostiques de NMO et qui n'ont pas d'anticorps anti-AQP4. Plusieurs études se sont intéressées à la problématique des différences entre les formes séronégatives et séropositives.

Sur le plan clinique, la positivité des anticorps anti-AQP4 a un rôle pronostique bien démontré au stade de la première poussée pour prédire l'évolution ou non vers une forme chronique. Dans le cadre d'une maladie déjà chronique, on constatait qu'il y avait beaucoup moins de différence entre les NMO séropositives et séronégatives. Une étude qui s'intéressait à l'évolution clinique de 35 patients NMO retrouvait une forme un peu moins sévère pour les patients séronégatifs mais avec une fréquence de poussées similaire (Akman-Demir et al., 2011). L'analyse la plus large portant sur 175 patients du spectre NMO signalait des poussées un peu plus sévères chez les patients séropositifs mais une fréquence des poussées et un score EDSS de gravité similaire entre les séropositifs et séronégatifs (Jarius et al., 2012). Un autre travail réalisé à Cuba et aux Antilles rapportait un pronostic plus grave chez les patients séropositifs avec cependant un taux de séropositivité anti-AQP4 très bas à 33% (Cabrera-Gomez et al., 2009).

Sur le plan de l'imagerie, une étude de 69 patients du spectre NMO a retrouvé que l'IRM des patients séropositifs remplissaient moins souvent les critères d'imagerie de McDonald qui suggèrent une SEP (5.6% versus 33.3%). Les lésions juxtacorticales et du corps calleux étaient aussi moins fréquentes chez les patients séropositifs (16.7% versus 46.7% pour les lésions

juxtacorticales; 5.6% versus 46.7% pour celles du corps calleux). L'implication de l'hypothalamus et des zones péri-aqueduales était au contraire moins fréquente chez les patients séronégatifs (Downer et al., 2012). Par contre une étude plus étendue portant sur 175 patients ne retrouvait pas de différence nette concernant la présence de lésions cérébrales, du tronc cérébral ou supratentorielle, mais sans détailler précisément la localisation des lésions (Jarius et al., 2012). Ces études doivent être prises avec précautions car elles incluait des patients du spectre NMO ce qui est un cadre plus hétérogène que la NMO stricto sensu. Certains cas de maladie du spectre NMO séronégatifs pourraient être en fait des SEP à prédominance optique ou médullaire. Une étude plus limitée sur 28 patients incluant uniquement des cas de NMO définie retrouvait plus de lésions cérébrales et moins de myélites extensives dans les formes séronégatives par rapport aux formes séropositives mais le pattern des hypersignaux IRM cérébraux ne rentrait jamais dans les critères de SEP même chez les patients séronégatifs (Kiyat-Atamer et al., 2013).

Les descriptions anatomopathologiques publiées ne donnaient malheureusement pas le statut en anticorps anti-AQP4 des patients car ils étaient souvent décédés avant que cette analyse soit disponible. Cependant, tous semblaient avoir globalement les mêmes lésions avec une perte astrocytaire et une diminution du marquage AQP4 et GFAP (Misu et al., 2007; Misu et al., 2012; Roemer et al., 2007). Il est donc peu probable que les patients séronégatifs présentent un aspect anatomopathologique fondamentalement différent des patients séronégatifs mais une analyse précise et comparative des patients séronégatifs et séropositifs serait intéressante. Les injections de sérum ou d'IgG de patients NMO à l'animal ont toutes été réalisées uniquement avec du sérum de patients séropositifs. Par contre on a pu vérifier que les sérums de patients NMO séronégatifs avaient une action cytotoxique propre sur les astrocytes en culture. Cette cytotoxicité était plus importante que celle provoquée par les sérums de patients SEP ou contrôles sains mais moins importante tout de même que celle des patients séropositifs (figure 9). Ce résultat confirme ceux de

nos expériences complémentaires sur l'animal où nous avons constaté que le sérum de patient NMO séronégatif causait des dégâts d'intensité intermédiaires entre celui du patient NMO séropositif et celui du contrôle sain (cf chapitre II).

Les différents travaux chez l'humain présentés dans cette thèse et basés sur la cohorte des patients NMO vus à Strasbourg ont par contre comme point commun de ne jamais avoir retrouvé de corrélation entre la présence d'anticorps anti-AQP4 et le phénotype. La présence d'anticorps anti-AQP4 n'était ainsi pas corrélée à la présence d'anticorps contre de nouveaux antigènes, ni aux changements métaboliques sériques, ni aux modifications du volume cérébral ni aux paramètres de qualité de vie, dépression ou fatigue.

Globalement, les différentes données issues de la littérature et de nos travaux suggèrent que les formes séronégatives de NMO partagent bien les caractéristiques majeures des NMO séropositives avec un phénotype légèrement moins classique.

Les hypothèses pour expliquer la physiopathologie des formes séronégatives sont diverses. Il est possible tout d'abord que les tests de détection des anticorps anti-AQP4 ne soient pas assez sensibles. On a constaté en effet une amélioration de la sensibilité du test en passant du test originel par immunofluorescence indirecte au test cellulaire. Il est possible aussi que le type d'épitope reconnu varie selon les patients (Yu et al., 2011).

Il est possible aussi que dans certaines formes l'anticorps anti-AQP4 ne soit pas présent dans le sang circulant mais plutôt dans le LCR. Chez de rares patients il a ainsi été retrouvé uniquement dans le LCR et la concentration d'anticorps anti-AQP4 dans le LCR pourrait être mieux corrélée à l'activité de la maladie que la concentration sérique (Dujmovic et al., 2011). Une étude incluant 33 patients NMO retrouvait une meilleure sensibilité de la recherche d'anticorps anti-AQP4 dans le LCR (86%) que dans le sérum (74%) mais il restait encore un pourcentage significatif de formes

négatives. Pour expliquer que les anticorps anti-AQP4 soient au long cours présents uniquement dans le LCR il faudrait aussi faire l'hypothèse d'une synthèse intrathécale de cet anticorps. Or, l'absence de follicules de lymphocytes B dans les méninges et la rareté de la synthèse intrathécale d'IgG dans la NMO (au contraire de la SEP) ne plaident pas pour cette hypothèse (Saji et al., 2013). Il serait aussi difficile d'expliquer comment se produiraient les lésions périvasculaires.

La réactivité envers l'AQP4 pourrait aussi faire intervenir une part d'immunité cellulaire. Il est possible de provoquer une reconnaissance de l'AQP4 par des lymphocytes T. Pohl et al. ont immunisé des rats contre l'AQP4 humaine, activé et cultivé les lymphocytes T ex vivo puis les ont injectés à d'autres rats. Une discrète réaction inflammatoire a été déclenchée dans le SNC. Cette réaction n'a pas été suffisante pour donner des signes cliniques ni pour provoquer une dysfonction astrocytaire mais par contre quand ces rats ont reçu une injection d'anticorps anti-AQP4, ils ont tout de suite déclenché une EAE sévère avec dysfonction astrocytaire. La réaction cellulaire T contre l'AQP4 avait pu ouvrir la barrière entre le sang et le SNC et fournir une atmosphère inflammatoire suffisante pour que les anticorps anti-AQP4 développent leur action pathogène (Pohl et al., 2011). La présence d'une réactivité des cellules T de souris contre l'AQP4 a été confirmée par un travail indépendant (Kalluri et al., 2011). Cette preuve de principe d'une réaction T contre l'AQP4 mérite des recherches complémentaires chez l'humain et pourrait jouer un rôle dans les NMO séronégatifs mais aussi séropositifs. Comme dans le modèle animal décrit ci-dessous la réaction cellulaire pourrait potentialiser l'entrée d'anticorps anti-AQP4 dans le SNC. Une revue récente a souligné le rôle important des cellules T dans la NMO à deux niveaux : dans la stimulation de la production des anticorps anti-AQP4 dans les ganglions et dans la progression des anticorps anti-AQP4 jusqu'à leur cible et la fixation à celle-ci (Mitsdoerffer et al., 2013).

Enfin il est possible que les patients séronégatifs présentent des réactions immunes contre d'autres antigènes que l'AQP4. Notre article 4 signalait des réactivités contre des épitopes de

protéines de la myéline (MBP, voire CSF114(Glc) si il correspond bien à un épitope de la MOG) ou ubiquitaire (PDH). Des articles récents ont signalé la présence de réactivité contre la MOG dans les formes séronégatives de NMO mais la fréquence de cette réactivité reste à déterminer (Kitley et al., 2012; Mader et al., 2011). Il sera important de bien préciser la cible de cette réactivité car nous ne la retrouvons pas si nous testons la réactivité contre la MOG entière de rat (poster P206). Cette réactivité pourrait se concentrer surtout contre la partie de la protéine qui correspondrait à l'épitope artificiel CSF114 englobant les acides aminés 25 à 35 ainsi qu'une autre étude l'a récemment confirmé (Xu et al., 2012). Il serait intéressant dans les futures études anatomopathologiques de bien identifier les patients séronégatifs pour voir si ils manifestent des lésions astrocytaires ou au contraire des dépôts d'immunoglobuline au contact des lésions de démyélinisation comme il est observé chez le rat Brown Norway qui réagit contre la MOG (Storch et al., 1998). Cela pourrait aider à déterminer si la réactivité contre la myéline est liée un phénomène bystander plutôt que vraiment causal dans la pathologie. Cette réactivité serait cependant intéressante comme marqueur diagnostique voire de suivi (article 4). La recherche de réactivité contre d'autres protéines astrocytaires serait intéressante.

En conclusion, les cas de NMO séronégatifs semblent constituer un groupe un peu plus hétérogène et variable que les cas de NMO séropositifs. L'atteinte y est peut-être un peu moins sévère et moins typique, mais elle partage quand même les grandes lignes de la physiopathologie de la NMO notamment la dysfonction astrocytaire. Les anticorps anti-AQP4 ne suffisent pas à eux seuls à induire la pathologie et les cas de NMO séronégatives offrent un terrain de choix pour étudier ces mécanismes complémentaires à la réaction entre l'anticorps anti-AQP4 et sa cible.

Figure 9 : Cytotoxicité des sérums de patients séropositifs et séronégatifs

(Image supprimée à cause du droit d'auteur)

Légende : % cytotoxicity : % de cellules astrocytaires lysées par cytotoxicité dépendante du complément mesurée par la libération de lactate deshydrogénase sous l'action du sérum de patients NMO séropositifs (NMO+), séronégatifs (NMO-) ou SEP (RRMS) ou contrôles sains (HC)(Sabater et al., 2009)

C) Topographie des lésions immunes

1) Localisations préférentielles des lésions

La NMO a été définie pendant longtemps d'après les données cliniques comme une maladie concernant uniquement les nerfs optiques et la moelle épinière. Les données histologiques étaient limitées et leur analyse se limitait souvent à détecter les zones d'inflammation très franche ce qui explique que les analyses histologiques n'ont souvent pas remis en cause la notion d'une atteinte optico-médullaire.

L'IRM est d'apparition plus récente. Son utilisation a certes permis de confirmer la présence de lésions médullaires sévères évoluant vers la cavitation mais a aussi permis de montrer la présence de lésions encéphaliques et de les caractériser. Le spectre phénotypique de la maladie a ainsi été élargi. Les séquences classiques T2/FLAIR qui détectent les zones d'inflammation, d'œdème et de démyélinisation ont mis en évidence des hypersignaux cérébraux chez au moins 50% des patients (Kim et al., 2012; Pittock et al., 2006). Leur significativité clinique a été d'abord débattue mais ils sont de plus en plus reconnus comme correspondant à des lésions inflammatoires authentiques. Ainsi, 18% des patients ont débuté leur NMO par des symptômes attribuables directement aux lésions encéphaliques, notamment les lésions encéphaliques diffuses et les lésions du tronc cérébral (Kim et al., 2011).

Les hypersignaux T2/FLAIR peuvent prendre la forme de :

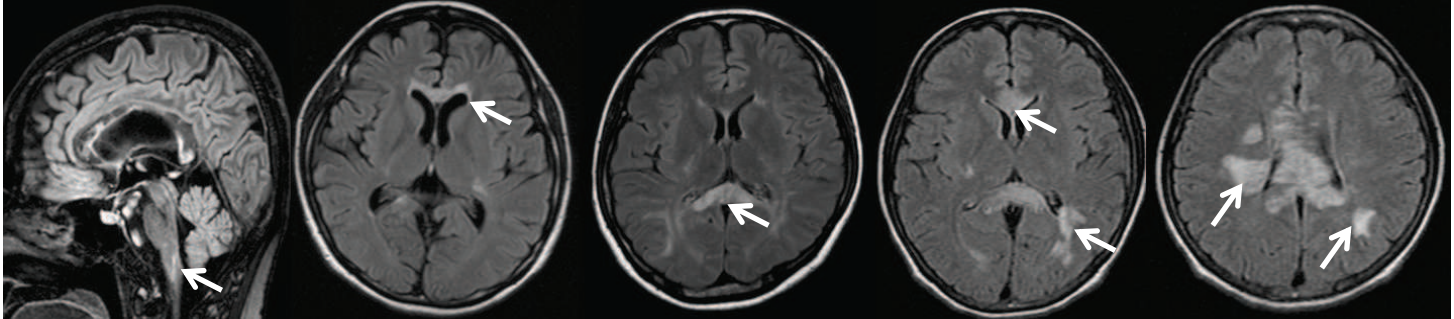
- Lésions peu spécifiques de la substance blanche profonde, de petite taille

- Lésions péri-épendymaires autour des ventricules latéraux notamment au niveau corps calleux (figure 10) qui sont plutôt étendues et de grand axe parallèle aux ventricules contrairement aux lésions de SEP (Nakamura et al., 2009).
- Lésions péri-épendymaires entourant le 3^{ème} ventricule. Elles peuvent inclure l'hypothalamus ce qui a été relié à certains troubles endocriniens observés dans la NMO tels que le syndrome de sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique, l'hypothyroïdie voire la narcolepsie (Viegas et al., 2009).
- Lésions péri-épendymaires entourant le 4^{ème} ventricule qui peuvent être responsables d'atteinte des nerfs crâniens (nyctagmus, ophtalmoplégie, paralysie faciale), de hoquet et ou de vomissements sévères (Misu et al., 2005)
- Lésions diffuses de la substance blanche sus-tentorielle en plage avec une prise de contraste « en nuage »

Il n'y a normalement pas de lésions corticales visibles en T2/FLAIR mais une inflammation leptoméningée peut être visible.

Les nouvelles techniques d'IRM ont permis d'apporter d'autres arguments pour l'implication du cerveau dans la NMO par l'analyse de nouveaux paramètres. La volumétrie va donner des informations sur l'évolution du volume global ou focal, la spectroscopie sur le métabolisme, l'IRM fonctionnelle sur la consommation d'oxygène et la diffusion sur les perturbations de la structure des fibres. Les résultats de ces analyses ont été discutés dans l'article 6 et ses commentaires. Ces techniques s'accordent généralement sur une atteinte des voies visuelles, motrices et sensitives, sans doute après une dégénérescence wallerienne qui n'est pas forcément visible en séquence T2/FLAIR. Une atteinte cérébrale plus large en dehors de ces voies a cependant été signalée par plusieurs études et selon plusieurs techniques.

Figure 10 : Hypersignaux T2/FLAIR dans la NMO



Légende : Ces IRM cérébrales en séquences FLAIR (Kim et al., 2012) montrent :

- *sur l'image de gauche des lésions à proximité du 4^{ème} ventricule*
- *sur la 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} image en partant de la gauche une lésion du corps calleux*
- *Sur la 4^{ème} et 5^{ème} image des lésions en plage de la substance blanche*

Dans ce cadre, les résultats de notre étude volumétrique soulignent l'impact particulier de la NMO sur le volume du corps calleux ce qui rejoint les résultats des analyses en séquences T2/FLAIR rapportant des hypersignaux dans cette zone (figure 10). Comme on l'a dit ci-dessus, l'étude en IRM du modèle animal d'inflammation optico-médullaire (article 2) a apporté aussi des éléments en faveur d'une atteinte périventriculaire. Nous n'avons pas retrouvé de perte de volume nette au niveau de l'hypothalamus et des zones autour du 3^{ème} et 4^{ème} ventricule mais il a pu être difficile de la mettre en évidence car il s'agit de zones plus petites. Une étude en diffusion a aussi montré des anomalies dans des voies intracérébrale notamment le corps calleux comme notre étude, la capsule externe et le faisceau longitudinal supérieur (Liu et al., 2011; Zhao et al., 2012). Une étude en IRM fonctionnelle a montré des anomalies de l'état de repos (Liang et al., 2011). Cependant d'autres études n'ont pas montré d'anomalie en dehors des voies visuelles, sensitives et motrices (de Seze et al., 2010b; Yu et al., 2006). Il est donc possible que l'atteinte du cerveau dans la NMO soit d'une intensité et d'une localisation variable selon les patients.

Les données cliniques permettent cependant d'apporter d'autres arguments pour une atteinte cérébrale diffuse dans la NMO. La présence de troubles cognitifs dans la NMO a été récemment rapportée et ne semble pas pouvoir être expliquée par l'atteinte médullaire, des nerfs optiques ou la dépression (Blanc et al., 2008; He et al., 2011; Saji et al., 2013). Ces déficits cognitifs qui prédominent sur la vitesse de traitement de l'information, l'attention et la mémoire sont plutôt de type sous-cortico-frontal. Ils pourraient être reliés aux petites lésions de la substance blanche profonde ou à une atteinte de la substance grise corticale préfrontale et des noyaux gris centraux.

L'article 7 apporte aussi de nouveaux éléments pour une atteinte cérébrale. Il montre l'existence dans la NMO d'une fatigue non seulement physique mais aussi psychique et d'une atteinte des paramètres de qualité de vie liés aux capacités cognitives même si c'est dans des proportions moins importantes que dans la SEP.

2) Mécanismes à l'origine de la topographie des lésions

La prédominance des lésions au contact des différents ventricules cérébraux pourrait orienter vers une attaque des anticorps anti-AQP4 ou d'autres agents transitant par le LCR envers les épendymocytes exprimant l'AQP4. L'atteinte préférentielle des nerfs optiques et de la moelle épinière pourrait être liée au fait que, avec les zones périventriculaires, c'est à ces endroits que de la substance blanche est exposée au contact du LCR. C'est en effet plutôt de la substance grise corticale qui est au contact du LCR dans le reste du cerveau. L'hypothèse d'un rôle particulier du LCR avait déjà été évoquée (Long et al., 2012) et pourrait être explorée de façon plus approfondie. Cependant il existe aussi des lésions cérébrales profondes à distance du LCR et les lésions histologiques les plus marquantes concernent les astrocytes périvasculaires. Il existe donc probablement aussi une attaque périvasculaire dans la NMO en plus d'une éventuelle attaque venant du LCR.

Une expression différente de l'AQP4 dans certains tissus pourrait fournir une explication de la topographie de l'inflammation. A titre de comparaison, une raison invoquée pour expliquer le tropisme optico-médullaire des lésions dans les modèles d'EAE induite par la MOG chez le rat Brown Norway était une plus grande expression de la MOG à ce niveau (Pagany et al., 2003) et aussi un tropisme particulier de la réaction anti-MOG chez l'animal (Berger et al., 1997). Chez l'homme, l'AQP4 est plus exprimée au niveau de la moelle épinière et des nerfs optiques (Nagelhus et al., 2004; Vitellaro-Zuccarello et al., 2005) mais est quand même exprimée aussi ailleurs. De façon surprenante l'isoforme M1 est nettement plus exprimée que l'isoforme M23 dans la moelle épinière. On n'a même retrouvé aucun ARNm de l'isoforme M23 dans les nerfs optiques alors que la plupart des études suggéraient que c'est les OAP formés par l'isoforme M23 qui favorisaient la

survenue de lésions de NMO (Saini et al., 2010). Cette découverte serait de nature à remettre en question le rôle prédominant de M23 dans la réponse immune de la NMO.

Une réactivité contre d'autres antigènes que l'AQP4 a été signalée dans cette thèse et pourrait guider l'inflammation vers certaines zones. Une analyse complète de l'ensemble des anticorps présents pendant et en dehors des poussées de NMO serait intéressante. De tels analyses commencent à être pratiquée dans la SEP (Ayoglu et al., 2012). Pour l'instant il n'y a pas eu d'analyse de ce type dans la NMO.

D) Perspectives

1) Amélioration du diagnostic et du suivi de la NMO

En l'état actuel des connaissances, le diagnostic de la NMO repose sur la clinique, l'IRM en séquences T1 et T2/FLAIR et la mise en évidence des anticorps anti-AQP4. Ces critères ne donnent pas totale satisfaction : le test de dépistage des anticorps est d'une sensibilité moyenne et les lésions IRM sont variables selon les patients. Une réflexion doit donc être engagée pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie lors de certaines étapes clés et améliorer le diagnostic et le suivi.

La première étape, avant l'action des anticorps anti-AQP4, est l'ouverture de la barrière entre le sang et le SNC et la constitution d'une ambiance inflammatoire indispensable à l'action des anticorps anti-AQP4 (Ratelade and Verkman, 2012). Il sera primordial d'explorer les facteurs (immunologiques ou autres) à l'origine de cette perméabilisation de la barrière. Une étude récente a montré que le sérum des patients atteints de NMO est capable d'induire une dysfonction de l'endothélium vasculaire qui passerait par une perturbation de la voie du VEGF (Shimizu et al., 2012). Cette atteinte ne semble pas liée aux anticorps anti-AQP4 car elle persiste même si ils sont exclus.

La deuxième étape est l'interaction des anticorps anti-AQP4 avec les astrocytes qui aboutissent à leur dysfonction. Plusieurs mécanismes semblent à l'œuvre (nécrose, apoptose ou simple dysfonctionnement astrocytaire). Il serait important de déterminer quels sont les mécanismes

prédominants et à quels endroits. Ceci pourrait expliquer pourquoi certaines régions du cerveau voient apparaître des hypersignaux en séquences IRM T2/FLAIR et d'autres non. Les mécanismes alternatifs à l'action des anticorps anti-AQP4, probablement à l'œuvre dans les NMO séronégatives, devront aussi être explorés. L'évaluation la plus complète possibles des IgG et de la réactivité des cellules T présentes dans la NMO pourrait permettre de dépister d'autres antigènes cibles, astrocytaires ou non (MOG ?). Le rôle des modifications post-traductionnelle des antigènes ne devra pas être négligé.

La troisième étape est la répercussion de la dysfonction astrocytaire sur le reste des cellules du SNC. Il sera important de comprendre comment cette dysfonction altère les oligodendrocytes et les neurones (altération du transfert de l'eau, des nutriments, du recaptage des déchets ?). Les analyses métaboliques sanguines pourront être poursuivies pour déterminer si elles peuvent constituer un marqueur de l'évolution de la maladie. L'acétate marqué radioactivement capturé par les astrocytes pourrait même fournir un marqueur in vivo de la fonction astrocytaire comme le glucose marqué en scintigraphie. Cela pourrait constituer un moyen de repérer les zones où la fonction astrocytaire est perturbée (Wyss et al., 2011b). Chez l'animal, des expériences pourraient être menées pour corréliser les changements métaboliques et en IRM aux changements histologiques.

2) Amélioration du traitement de la NMO

Actuellement, le traitement de la NMO fait surtout appel à des traitements immunosuppresseur non spécifiques (corticoïdes, azathioprine, mycophénolate mofétil,...) (Costanzi et al., 2011; Jacob et al., 2009; Sato et al., 2012). Le rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20), d'utilisation croissante, est déjà un peu plus spécifique car il vise les lymphocytes B qui sont probablement plus impliqués dans cette maladie à prédominance humorale (Sato et al., 2012).

Les deux dernières années ont cependant vu s'ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques. Celles-ci sont fondées sur la modification de l'interaction entre l'anticorps anti-AQP4 et son antigène. Une étude a ainsi testé l'action d'un anticorps monoclonal anti-AQP4 de haute affinité modifié au niveau de sa fraction constante pour ne pas provoquer de cytotoxicité. Cet anticorps artificiel va prendre la place de l'anticorps anti-AQP4 naturel et empêcher donc la cytotoxicité liée à ce dernier. Ce traitement a montré qu'il pouvait réduire la toxicité des anticorps anti-AQP4 sur coupe de moelle épinière en culture et après injection intracérébrale chez les souris (Tradtrantip et al., 2012b). La même équipe montra que certaines petites molécules comme l'antiviral arbidol étaient capable de se fixer sur l'AQP4 d'astrocytes en culture puis d'empêcher la fixation et l'action cytotoxique des anticorps anti-AQP4, ceci sans altérer le fonctionnement physiologique de l'AQP4 (Tradtrantip et al., 2012a). Un autre mécanisme potentiel était la modification de l'anticorps anti-AQP4 par des enzymes d'origine bactérienne soit par déglycosylation (Tradtrantip et al., 2013b), soit par coupure du fragment constant (Tradtrantip et al., 2013a) ce qui aboutit dans les deux cas à une nette diminution de la capacité des anticorps à provoquer une cytotoxicité. Les effets indésirables d'une injection in vivo de ces enzymes doivent cependant encore être évalués.

D'autres composés pourraient agir en aval de la fixation de l'anticorps anti-AQP4 sur sa cible. Un anticorps monoclonal anti-C1q a été testé et a montré sa capacité à diminuer les dommages infligés par les anticorps anti-AQP4 aux astrocytes en cultures (Phuan et al., 2012). Certains composés inhibant le fonctionnement des polynucléaires éosinophiles comme les anti-histaminiques ou un anticorps monoclonal anti-IL5 ont montré une action intéressante chez l'animal qui recevait des injections d'anticorps anti-AQP4 (Zhang and Verkman, 2013). Le tocilizumab, un inhibiteur des récepteurs de l'interleukine 6, se serait montré efficace chez 4 cas rapportés de patients NMO (Ayzenberg et al., 2013; Kieseier et al., 2012). Un essai a été réalisé chez les humains pour tester l'effet de l'éculizumab. Il s'agit d'un anticorps monoclonal contre la protéine C5 du complément qui a donc pour but d'empêcher la formation du complexe terminal C5b-C9 correspondant au complexe d'attaque membranaire. Dans un essai non contrôlé sur 14 patients et avec un suivi d'un an seulement, une baisse très significative de la fréquence des poussées a été constatée. L'incapacité fonctionnelle avait légèrement diminuée (Pittock et al., 2013). Il serait aussi intéressant d'explorer la possibilité d'intervenir sur la voie de l'interleukine 17 qui semble jouer un rôle important dans la NMO (Mitsdoerffer et al., 2013).

La recherche de traitements agissant sur l'anticorps anti-AQP4 et la cascade de la cytotoxicité liée au complément ou aux cellules effectrices est donc très dynamique.

Cependant, un champ d'investigation thérapeutique peu exploré jusqu'ici a été celui de la compensation de la dysfonction astrocytaire. Un traitement symptomatique, la fampridine, a récemment été commercialisé dans la SEP. Ce médicament n'agit pas sur la réponse auto-immune mais tempère les conséquences de la démyélinisation en facilitant la conduction électrique dans les neurones. De même des médicaments améliorant le transfert de l'eau, des ions, des nutriments, la recapture des déchets ou luttant contre l'excitotoxicité pourraient avoir une action bénéfique dans la NMO. Certains médicaments luttant notamment contre l'excitotoxicité du glutamate (mémantine,

riluzole) sont commercialisés dans d'autres pathologies touchant le SNC mais n'ont pas été essayés dans la NMO.

V) CONCLUSION

La compréhension de la NMO a beaucoup progressé depuis 10 ans. Cet exemple de maladie auto-immune du SNC, relativement bien définie grâce à la découverte d'un anticorps spécifique, nous apporte des connaissances scientifiques importantes sur les interactions entre le système immunitaires et le SNC. Ces informations peuvent à leur tour être exploitées pour améliorer le diagnostic et bientôt le traitement des patients.

Dans cette thèse, un modèle animal potentiel de NMO a été caractérisé ce qui a permis de mieux comprendre les mécanismes d'un exemple d'inflammation optico-médullaire. L'étude plus précise des cas humains de NMO a permis de relativiser la relation entre les concentrations d'anticorps anti-AQP4 et la survenue de poussées, qui ne semble pas utilisable comme outil prédictif en pratique clinique. La mise en évidence ensuite de nouvelles réactivités antigéniques potentiellement dirigées contre la myéline élargit notre conception de la réponse immune dans la NMO. Cette réponse immune semble avoir des conséquences sur le métabolisme général ce qui pourrait fournir de nouveaux marqueurs diagnostiques sanguins. Il existe aussi chez les patients NMO des changements de volume cérébral qui confirment l'atteinte spécifique de certaines zones cérébrales. Enfin nous avons recueilli des données sur la répercussion finale de la réponse immune, la qualité de vie des patients NMO. Un processus de retour vers le modèle animal a permis de tester dans notre laboratoire de données issues de l'humain.

Les recherches pourront être poursuivies afin de mieux comprendre la physiopathologie de la réponse immune et son interaction avec le SNC notamment les astrocytes.

REFERENCES :

- Acchiote P. Sur un cas de neuromyéélite subaiguë ou maladie de Devic. *Rev Neurol (Paris)* 1907; 15: 775-777.
- Akman-Demir G, Tuzun E, Waters P, Icoz S, Kurtuncu M, Jarius S, et al. Prognostic implications of aquaporin-4 antibody status in neuromyelitis optica patients. *J Neurol* 2011; 258: 464-70.
- Allbutt TC. On the ophthalmoscopic signs of spinal disease. *Lancet* 1870; 1: 76-78.
- Alvarenga MP, Alvarenga RM, Santos AM, Thuler LC. Anti-AQP(4) antibody in idiopathic acute transverse myelitis with recurrent clinical course: frequency of positivity and influence in prognosis. *J Spinal Cord Med* 2012; 35: 251-5.
- Ayoglu B, Haggmark A, Khademi M, Olsson T, Uhlen M, Schwenk JM, et al. Autoantibody profiling in multiple sclerosis using arrays of human protein fragments. *Mol Cell Proteomics* 2012.
- Ayzenberg I, Kleiter I, Schroder A, Hellwig K, Chan A, Yamamura T, et al. Interleukin 6 receptor blockade in patients with neuromyelitis optica nonresponsive to anti-CD20 therapy. *JAMA Neurol* 2013; 70: 394-7.
- Bakshi R. Fatigue associated with multiple sclerosis: diagnosis, impact and management. *Mult Scler* 2003; 9: 219-27.
- Benahmed MA, Elbayed K, Daubeuf F, Santelmo N, Frossard N, Namer IJ. NMR HRMAS spectroscopy of lung biopsy samples: Comparison study between human, pig, rat, and mouse metabolomics. *Magnetic Resonance in Medicine* 2013.
- Bergamaschi R, Tonietti S, Franciotta D, Candeloro E, Tavazzi E, Piccolo G, et al. Oligoclonal bands in Devic's neuromyelitis optica and multiple sclerosis: differences in repeated cerebrospinal fluid examinations. *Mult Scler* 2004; 10: 2-4.
- Berger T, Weerth S, Kojima K, Lington C, Wekerle H, Lassmann H. Experimental autoimmune encephalomyelitis: the antigen specificity of T lymphocytes determines the topography of lesions in the central and peripheral nervous system. *Lab Invest* 1997; 76: 355-64.
- Bettelli E. Building different mouse models for human MS. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1103: 11-8.
- Bichueti DB, Oliveira EM, Souza NA, Rivero RL, Gabbai AA. Neuromyelitis optica in Brazil: a study on clinical and prognostic factors. *Mult Scler* 2009; 15: 613-9.
- Blanc F, Zephir H, Lebrun C, Labauge P, Castelnovo G, Fleury M, et al. Cognitive functions in neuromyelitis optica. *Arch Neurol* 2008; 65: 84-8.
- Bouyon M, Collongues N, Zephir H, Ballonzoli L, Jeanjean L, Lebrun C, et al. Longitudinal follow-up of vision in a neuromyelitis optica cohort. *Mult Scler* 2013.
- Bradl M, Misu T, Takahashi T, Watanabe M, Mader S, Reindl M, et al. Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. *Ann Neurol* 2009; 66: 630-43.
- Brain WR. Critical Review: disseminated sclerosis. *QJM* 1930; 23.
- Burke DCC, D.J. Neuromyelitis optica. A review of the literature and a report of a case which followed traumatic paraplegia. *Paraplegia* 1968; 6: 79-89.
- Cabre BM, Olindo S, Brochet B, Smadja D. *Neuromyérites optiques*. Vol Neurologie: Elsevier Masson, 2007.
- Cabre P, Gonzalez-Quevedo A, Bonnan M, Saiz A, Olindo S, Graus F, et al. Relapsing neuromyelitis optica: long term history and clinical predictors of death. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009; 80: 1162-4.
- Cabre P, Heinzlef O, Merle H, Buisson GG, Bera O, Bellance R, et al. MS and neuromyelitis optica in Martinique (French West Indies). *Neurology* 2001; 56: 507-14.
- Cabrera-Gomez JA, Bonnan M, Gonzalez-Quevedo A, Saiz-Hinarejos A, Marignier R, Olindo S, et al. Neuromyelitis optica positive antibodies confer a worse course in relapsing-neuromyelitis optica in Cuba and French West Indies. *Mult Scler* 2009; 15: 828-33.
- Calabrese M, Oh MS, Favaretto A, Rinaldi F, Poretto V, Alessio S, et al. No MRI evidence of cortical lesions in neuromyelitis optica. *Neurology* 2012; 79: 1671-6.

- Cicarelli O, Thomas D, De Vita E, Wheeler-Kingshott C, Kachramanoglou C, Kapoor R, et al. Low myo-inositol indicating astrocytic damage in a case series of NMO. *Ann Neurol*. 2013; doi: 10.1002/ana.23909.
- Clavelou P, Auclair C, Taithe F, Gerbaud L. [Quality of life in multiple sclerosis]. *Rev Neurol (Paris)* 2009; 165 Suppl 4: S123-8.
- Collongues N, Cabre P, Marignier R, Zephir H, Papeix C, Audoin B, et al. A benign form of neuromyelitis optica: does it exist? *Arch Neurol* 2011a; 68: 918-24.
- Collongues N, Marignier R, Zephir H, Papeix C, Blanc F, Rittleng C, et al. Neuromyelitis optica in France: a multicenter study of 125 patients. *Neurology* 2010; 74: 736-42.
- Collongues N, Marignier R, Zephir H, Papeix C, Fontaine B, Blanc F, et al. Long-term follow-up of neuromyelitis optica with a pediatric onset. *Neurology* 2011b; 75: 1084-8.
- Costanzi C, Matiello M, Lucchinetti CF, Weinschenker BG, Pittock SJ, Mandrekar J, et al. Azathioprine: tolerability, efficacy, and predictors of benefit in neuromyelitis optica. *Neurology* 2011; 77: 659-66.
- De Seze J, Blanc F, Kremer S, Collongues N, Fleury M, Marcel C, et al. Magnetic resonance spectroscopy evaluation in patients with neuromyelitis optica. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 2010a; 81: 409-411.
- de Seze J, Blanc F, Kremer S, Collongues N, Fleury M, Marcel C, et al. Magnetic resonance spectroscopy evaluation in patients with neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010b; 81: 409-11.
- De Seze J, Lebrun C, Stojkovic T, Ferriby D, Chatel M, Vermersch P. Is Devic's neuromyelitis optica a separate disease? A comparative study with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 2003; 9: 521-525.
- de Seze J, Stojkovic T, Ferriby D, Gauvrit JY, Montagne C, Mounier-Vehier F, et al. Devic's neuromyelitis optica: clinical, laboratory, MRI and outcome profile. *J Neurol Sci* 2002; 197: 57-61.
- Devic E. Myélite subaigüe compliquée de névrite optique *Bulletin Médical (Paris)* 1894; 8: 1033-1034.
- Downer JJ, Leite MI, Carter R, Palace J, Kuker W, Quaghebeur G. Diagnosis of neuromyelitis optica (NMO) spectrum disorders: is MRI obsolete? *Neuroradiology* 2012; 54: 279-85.
- Dreschfeld J. Pathological contribution on the course of the optic nerve fibres in the brain. *Brain* 1882; 4.
- Dujmovic I, Mader S, Schanda K, Deisenhammer F, Stojkovic N, Kostic J, et al. Temporal dynamics of cerebrospinal fluid anti-aquaporin-4 antibodies in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders. *J Neuroimmunol* 2011; 234: 124-30.
- Fournie GJ, Saoudi A, Druet P, Pelletier L. Th2-type immunopathological manifestations induced by mercury chloride or gold salts in the rat: signal transduction pathways, cellular mechanisms and genetic control. *Autoimmun Rev* 2002; 1: 205-12.
- Fukazawa T, Kikuchi S, Sasaki H, Yabe I, Miyagishi R, Hamada T, et al. Genomic HLA profiles of MS in Hokkaido, Japan: important role of DPB1*0501 allele. *J Neurol* 2000; 247: 175-8.
- Gault F. De la neuromyéélite optique aigüe. *Faculté de Médecine Lyon: Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon*, 1894.
- Ghezzi A, Bergamaschi R, Martinelli V, Trojano M, Tola MR, Merelli E, et al. Clinical characteristics, course and prognosis of relapsing Devic's Neuromyelitis Optica. *J Neurol* 2004; 251: 47-52.
- Haase CG, Schmidt S. Detection of brain-specific autoantibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein, S100beta and myelin basic protein in patients with Devic's neuromyelitis optica. *Neurosci Lett* 2001; 307: 131-3.
- He D, Chen X, Zhao D, Zhou H. Cognitive function, depression, fatigue, and activities of daily living in patients with neuromyelitis optica after acute relapse. *Int J Neurosci* 2011; 121: 677-83.
- Hinson SR, McKeon A, Fryer JP, Apiwattanakul M, Lennon VA, Pittock SJ. Prediction of neuromyelitis optica attack severity by quantitation of complement-mediated injury to aquaporin-4-expressing cells. *Arch Neurol* 2009; 66: 1164-7.
- Hinson SR, Roemer SF, Lucchinetti CF, Fryer JP, Kryzer TJ, Chamberlain JL, et al. Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating EAAT2. *J Exp Med* 2008; 205: 2473-81.

- Hinson SR, Romero MF, Popescu BF, Lucchinetti CF, Fryer JP, Wolburg H, et al. Molecular outcomes of neuromyelitis optica (NMO)-IgG binding to aquaporin-4 in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 1245-50.
- Iorio R, Fryer JP, Hinson SR, Fallier-Becker P, Wolburg H, Pittock SJ, et al. Astrocytic autoantibody of neuromyelitis optica (NMO-IgG) binds to aquaporin-4 extracellular loops, monomers, tetramers and high order arrays. *J Autoimmun* 2013; 40: 21-7.
- Isobe N, Yonekawa T, Matsushita T, Masaki K, Yoshimura S, Fichna J, et al. Clinical relevance of serum aquaporin-4 antibody levels in neuromyelitis optica. *Neurochem Res* 2013; 38: 997-1001.
- Jacob A, Matiello M, Weinschenker BG, Wingerchuk DM, Lucchinetti C, Shuster E, et al. Treatment of neuromyelitis optica with mycophenolate mofetil: retrospective analysis of 24 patients. *Arch Neurol* 2009; 66: 1128-33.
- Jacob A, McKeon A, Nakashima I, Sato DK, Elson L, Fujihara K, et al. Current concept of neuromyelitis optica (NMO) and NMO spectrum disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012a.
- Jacob A, McKeon A, Nakashima I, Sato DK, Elson L, Fujihara K, et al. Current concept of neuromyelitis optica (NMO) and NMO spectrum disorders. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 2012b.
- Jacob A, Panicker J, Lythgoe D, Elson L, Mutch K, Wilson M, et al. The epidemiology of neuromyelitis optica amongst adults in the Merseyside county of United Kingdom. *J Neurol* 2013.
- Jarius S, Aboul-Enein F, Waters P, Kuenz B, Hauser A, Berger T, et al. Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica. *Brain* 2008; 131: 3072-80.
- Jarius S, Ruprecht K, Wildemann B, Kuempfel T, Ringelstein M, Geis C, et al. Contrasting disease patterns in seropositive and seronegative neuromyelitis optica: A multicentre study of 175 patients. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 14.
- Jarius S, Wildemann B. The history of neuromyelitis optica. *J Neuroinflammation* 2013; 10: 8.
- Kageyama T, Komori M, Miyamoto K, Ozaki A, Suenaga T, Takahashi R, et al. Combination of cyclosporine A with corticosteroids is effective for the treatment of neuromyelitis optica. *J Neurol* 2013; 260: 627-34.
- Kaiser LG, Schuff N, Cashdollar N, Weiner MW. Scyllo-inositol in normal aging human brain: 1H magnetic resonance spectroscopy study at 4 Tesla. *NMR in Biomedicine* 2005; 18: 51-55.
- Kalluri SR, Illes Z, Srivastava R, Cree B, Menge T, Bennett JL, et al. Quantification and functional characterization of antibodies to native aquaporin 4 in neuromyelitis optica. *Arch Neurol* 2010; 67: 1201-8.
- Kalluri SR, Rothhammer V, Staszewski O, Srivastava R, Petermann F, Prinz M, et al. Functional characterization of aquaporin-4 specific T cells: towards a model for neuromyelitis optica. *PLoS One* 2011; 6: e16083.
- Kanamori Y, Nakashima I, Takai Y, Nishiyama S, Kuroda H, Takahashi T, et al. Pain in neuromyelitis optica and its effect on quality of life: a cross-sectional study. *Neurology* 2011; 77: 652-8.
- Kieseier BC, Stuve O, Dehmel T, Goebels N, Leussink VI, Mausberg AK, et al. Disease amelioration with tocilizumab in a treatment-resistant patient with neuromyelitis optica: implication for cellular immune responses. *JAMA Neurol* 2012; 70: 390-3.
- Kim SH, Kim W, Huh SY, Lee KY, Jung IJ, Kim HJ. Clinical efficacy of plasmapheresis in patients with neuromyelitis optica spectrum disorder and effects on circulating anti-aquaporin-4 antibody levels. *J Clin Neurol* 2013a; 9: 36-42.
- Kim SM, Waters P, Woodhall M, Kim JY, Kim JE, Yang JW, et al. Utility of aquaporin-4 antibody assay in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mult Scler* 2013b.
- Kim W, Kim SH, Huh SY, Kim HJ. Brain abnormalities in neuromyelitis optica spectrum disorder. *Mult Scler Int* 2012; 2012: 735486.
- Kim W, Kim SH, Lee SH, Li XF, Kim HJ. Brain abnormalities as an initial manifestation of neuromyelitis optica spectrum disorder. *Mult Scler* 2011; 17: 1107-12.

- Kinoshita M, Nakatsuji Y, Kimura T, Moriya M, Takata K, Okuno T, et al. Neuromyelitis optica: Passive transfer to rats by human immunoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 386: 623-7.
- Kira J. Multiple sclerosis in the Japanese population. *Lancet Neurol* 2003; 2: 117-27.
- Kirov II, Tal A, Babb JS, Herbert J, Gonen O. Serial proton MR spectroscopy of gray and white matter in relapsing-remitting MS. *Neurology* 2013; 80: 39-46.
- Kister I, Herbert J, Zhou Y, Ge Y. Ultrahigh-Field MR (7 T) Imaging of Brain Lesions in Neuromyelitis Optica. *Mult Scler Int* 2013a; 2013: 398259.
- Kister I, Herbert J, Zhou Y, Ge Y. Ultrahigh-Field MR (7T) Imaging of Brain Lesions in Neuromyelitis Optica. *Mult Scler Int* 2013b; doi: 10.1155/2013/398259.
- Kitley J, Elson L, George J, Waters P, Woodhall M, Vincent A, et al. Methotrexate is an alternative to azathioprine in neuromyelitis optica spectrum disorders with aquaporin-4 antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013.
- Kitley J, Woodhall M, Waters P, Leite MI, Devenney E, Craig J, et al. Myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibodies in adults with a neuromyelitis optica phenotype. *Neurology* 2012; 79: 1273-7.
- Kiyat-Atamer A, Ekizoglu E, Tuzun E, Kurtuncu M, Shugaiv E, Akman-Demir G, et al. Long-term MRI findings in neuromyelitis optica: seropositive versus seronegative patients. *Eur J Neurol* 2013; 20: 781-7.
- Kumar A, Bala L, Kalita J, Misra UK, Singh RL, Khetrapal CL, et al. Metabolomic analysis of serum by (1) H NMR spectroscopy in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinica Chimica Acta* 2010; 411: 563-567.
- Lai C, Tian G, Takahashi T, Liu W, Yang L, Zhang X. Neuromyelitis optica antibodies in patients with severe optic neuritis in China. *J Neuroophthalmol* 2011; 31: 16-9.
- Lennon PVA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: Distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 2004a; 364: 2106-2112.
- Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *Journal of Experimental Medicine* 2005a; 202: 473-477.
- Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med* 2005b; 202: 473-7.
- Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 2004b; 364: 2106-12.
- Liang P, Liu Y, Jia X, Duan Y, Yu C, Qin W, et al. Regional homogeneity changes in patients with neuromyelitis optica revealed by resting-state functional MRI. *Clin Neurophysiol* 2011; 122: 121-7.
- Lippens G, Bourdonneau M, Dhalluin C, Warras R, Richert T, Seetharaman C, et al. Study of compounds attached to solid supports using High Resolution Magic Angle Spinning NMR. *Curr. Org. Chem.* 1999; 3: 147-169.
- Liu Y, Duan Y, He Y, Yu C, Wang J, Huang J, et al. A tract-based diffusion study of cerebral white matter in neuromyelitis optica reveals widespread pathological alterations. *Mult Scler* 2011; 18: 1013-21.
- Lolli F, Mulinacci B, Carotenuto A, Bonetti B, Sabatino G, Mazzanti B, et al. An N-glycosylated peptide detecting disease-specific autoantibodies, biomarkers of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 10273-8.
- Long Y, Qiu W, Lu Z, Bao J, Wu A, Wang Y, et al. Aquaporin 4 antibodies in the cerebrospinal fluid are helpful in diagnosing Chinese patients with neuromyelitis optica. *Neuroimmunomodulation* 2012; 19: 96-102.
- Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, Bruck W, Gleich G, Ransohoff RM, et al. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* 2002; 125: 1450-61.
- Lutz NW, Cozzone PJ. Metabolic profiling in multiple sclerosis and other disorders by quantitative analysis of cerebrospinal fluid using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2011; 12: 1016-1025.
- Lutz NW, Viola A, Malikova I, Confort-Gouny S, Audoin B, Ranjeva JP, et al. Inflammatory multiple-sclerosis plaques generate characteristic metabolic profiles in cerebrospinal fluid. *PLoS ONE* 2007; 2.

- Mader S, Gredler V, Schanda K, Rostasy K, Dujmovic I, Pfaller K, et al. Complement activating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in neuromyelitis optica and related disorders. *J Neuroinflammation* 2011; 8: 184.
- Makino T, Ito S, Mori M, Yonezu T, Ogawa Y, Kuwabara S. Diffuse and heterogeneous T2-hyperintense lesions in the splenium are characteristic of neuromyelitis optica. *Mult Scler* 2013; 19: 308-15.
- Mandler RN, Davis LE, Jeffery DR, Kornfeld M. Devic's neuromyelitis optica: a clinicopathological study of 8 patients. *Ann Neurol* 1993; 34: 162-8.
- Marignier R, De Sèze J, Vukusic S, Durand-Dubief F, Zéphir H, Vermersch P, et al. NMO-IgG and Devic's neuromyelitis optica: a French experience. *Multiple Sclerosis* 2008; 14: 440-445.
- Marignier R, Nicolle A, Watrin C, Touret M, Cavagna S, Varrin-Doyer M, et al. Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury. *Brain* 2010; 133: 2578-91.
- Matiello M, Lennon VA, Jacob A, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Wingerchuk DM, et al. NMO-IgG predicts the outcome of recurrent optic neuritis. *Neurology* 2008; 70: 2197-200.
- Matsushita T, Tateishi T, Isobe N, Yonekawa T, Yamasaki R, Matsuse D, et al. Characteristic cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in neuromyelitis optica, relapsing remitting or primary progressive multiple sclerosis. *PLoS One* 2013; 8: e61835.
- Matthews L, Marasco R, Jenkinson M, Küker W, Luppe S, Leite MI, et al. Distinction of seropositive NMO spectrum disorder and MS brain lesion distribution. *Neurology* 2013; 80: 1330-1337.
- Mehrpour M, Kyani A, Tafazzoli M, Fathi F, Joghataie MT. A metabonomics investigation of multiple sclerosis by nuclear magnetic resonance. *Magnetic Resonance in Chemistry* 2013; 51: 102-109.
- Meiboom S, Gill D. Modified spin echo method for measuring nuclear relaxation times. *Rev. Sci. Instrum.* 1958; 29: 688.
- Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, Banwell BL, Cohen JA, Freedman MS, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler* 2008; 14: 1157-74.
- Misu T, Fujihara K, Kakita A, Konno H, Nakamura M, Watanabe S, et al. Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain* 2007; 130: 1224-34.
- Misu T, Fujihara K, Nakashima I, Sato S, Itoyama Y. Intractable hiccup and nausea with periaqueductal lesions in neuromyelitis optica. *Neurology* 2005; 65: 1479-82.
- Misu T, Hoftberger R, Fujihara K, Wimmer I, Takai Y, Nishiyama S, et al. Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica. *Acta Neuropathol* 2012; 125: 815-27.
- Mitsdoerffer M, Kuchroo V, Korn T. Immunology of neuromyelitis optica: a T cell-B cell collaboration. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1283: 57-66.
- Miyamoto K, Nagaosa N, Motoyama M, Kataoka K, Kusunoki S. Upregulation of water channel aquaporin-4 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 2009; 276: 103-7.
- Monaco F, Fumero S, Mondino A, Mutani R. Plasma and cerebrospinal fluid tryptophan in multiple sclerosis and degenerative diseases. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 1979; 42: 640-641.
- Nagelhus EA, Mathiesen TM, Ottersen OP. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* 2004; 129: 905-13.
- Nakamura M, Misu T, Fujihara K, Miyazawa I, Nakashima I, Takahashi T, et al. Occurrence of acute large and edematous callosal lesions in neuromyelitis optica. *Mult Scler* 2009; 15: 695-700.
- Nakashima I, Fujihara K, Fujimori J, Narikawa K, Misu T, Itoyama Y. Absence of IgG1 response in the cerebrospinal fluid of relapsing neuromyelitis optica. *Neurology* 2004; 62: 144-6.
- Nicchia GP, Mastrototaro M, Rossi A, Pisani F, Tortorella C, Ruggieri M, et al. Aquaporin-4 orthogonal arrays of particles are the target for neuromyelitis optica autoantibodies. *Glia* 2009; 57: 1363-73.
- Nishiyama S, Ito T, Misu T, Takahashi T, Kikuchi A, Suzuki N, et al. A case of NMO seropositive for aquaporin-4 antibody more than 10 years before onset. *Neurology* 2009; 72: 1960-1.
- O'Riordan JI, Gallagher HL, Thompson AJ, Howard RS, Kingsley DP, Thompson EJ, et al. Clinical, CSF, and MRI findings in Devic's neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 60: 382-7.

- Osuntokun BO. The pattern of neurological illness in tropical Africa. Experience at Ibadan, Nigeria. *J Neurol Sci* 1971; 12: 417-42.
- Pagany M, Jagodic M, Bourquin C, Olsson T, Linington C. Genetic variation in myelin oligodendrocyte glycoprotein expression and susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2003; 139: 1-8.
- Papais-Alvarenga RM, Carellos SC, Alvarenga MP, Holander C, Bichara RP, Thuler LC. Clinical course of optic neuritis in patients with relapsing neuromyelitis optica. *Arch Ophthalmol* 2008; 126: 12-6.
- Papeix C, Vidal JS, de Seze J, Pierrot-Deseilligny C, Tourbah A, Stankoff B, et al. Immunosuppressive therapy is more effective than interferon in neuromyelitis optica. *Multiple Sclerosis* 2007; 13: 256-259.
- Phuan PW, Zhang H, Asavapanumas N, Leviten M, Rosenthal A, Tradtrantip L, et al. C1q-targeted monoclonal antibody prevents complement-dependent cytotoxicity and neuropathology in in vitro and mouse models of neuromyelitis optica. *Acta Neuropathol* 2012; 125: 829-40.
- Picard RR, Cook RD. Cross-Validation of Regression Models. *Journal of the American Statistical Association* 1984; 79: 575-583.
- Pichiecchio A, Tavazzi E, Poloni G, Ponzio M, Palesi F, Pasin M, et al. Advanced magnetic resonance imaging of neuromyelitis optica: a multiparametric approach. *Mult Scler* 2012; 18: 817-24.
- Piotto M, Moussallieh F-M, Imperiale A, Detour J, Bellocq J-P, Namer IJ, et al. Reproducible sample preparation and spectrum acquisition techniques for metabolic profiling of human tissues by 1H HRMAS NMR. In: Lutz P, editor. *Methodologies in metabolomics: experimental strategies and techniques for metabolomics research*. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, 2013.
- Pittock SJ, Lennon VA, de Seze J, Vermersch P, Homburger HA, Wingerchuk DM, et al. Neuromyelitis optica and non organ-specific autoimmunity. *Arch Neurol* 2008; 65: 78-83.
- Pittock SJ, Lennon VA, Krecke K, Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Brain abnormalities in neuromyelitis optica. *Arch Neurol* 2006; 63: 390-6.
- Pittock SJ, Lennon VA, McKeon A, Mandrekar J, Weinshenker BG, Lucchinetti CF, et al. Eculizumab in AQP4-IgG-positive relapsing neuromyelitis optica spectrum disorders: an open-label pilot study. *Lancet Neurol* 2013; 12: 554-62.
- Pohl M, Fischer MT, Mader S, Schanda K, Kitic M, Sharma R, et al. Pathogenic T cell responses against aquaporin 4. *Acta Neuropathol* 2011; 122: 21-34.
- Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 Revisions to the "McDonald Criteria". *Annals of Neurology* 2005; 58: 840-846.
- Qian P, Lancia S, Alvarez E, Klawiter EC, Cross AH, Naismith RT. Association of neuromyelitis optica with severe and intractable pain. *Arch Neurol* 2012; 69: 1482-7.
- Rash JE, Davidson KG, Yasumura T, Furman CS. Freeze-fracture and immunogold analysis of aquaporin-4 (AQP4) square arrays, with models of AQP4 lattice assembly. *Neuroscience* 2004; 129: 915-34.
- Ratchford JN, Quigg ME, Conger A, Frohman T, Frohman E, Balcer LJ, et al. Optical coherence tomography helps differentiate neuromyelitis optica and MS optic neuropathies. *Neurology* 2009; 73: 302-8.
- Ratelade J, Verkman AS. Neuromyelitis optica: aquaporin-4 based pathogenesis mechanisms and new therapies. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44: 1519-30.
- Rivera JF, Kurtzke JF, Booth VJ, Corona VTt. Characteristics of Devic's disease (neuromyelitis optica) in Mexico. *J Neurol* 2008; 255: 710-5.
- Roemer SF, Parisi JE, Lennon VA, Benarroch EE, Lassmann H, Bruck W, et al. Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Brain* 2007; 130: 1194-205.
- Saadoun S, Tait MJ, Reza A, Davies DC, Bell BA, Verkman AS, et al. AQP4 gene deletion in mice does not alter blood-brain barrier integrity or brain morphology. *Neuroscience* 2009; 161: 764-72.
- Saadoun S, Waters P, Bell BA, Vincent A, Verkman AS, Papadopoulos MC. Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice. *Brain* 2010; 133: 349-61.

- Sabater L, Giralt A, Boronat A, Hankiewicz K, Blanco Y, Llufríu S, et al. Cytotoxic effect of neuromyelitis optica antibody (NMO-IgG) to astrocytes: an in vitro study. *J Neuroimmunol* 2009; 215: 31-5.
- Saini H, Fernandez G, Kerr D, Levy M. Differential expression of aquaporin-4 isoforms localizes with neuromyelitis optica disease activity. *J Neuroimmunol* 2010; 221: 68-72.
- Saji E, Arakawa M, Yanagawa K, Toyoshima Y, Yokoseki A, Okamoto K, et al. Cognitive impairment and cortical degeneration in neuromyelitis optica. *Ann Neurol* 2013; 73: 65-76.
- Salloway S, Sperling R, Keren R, Porsteinsson AP, Van Dyck CH, Tariot PN, et al. A phase 2 randomized trial of ELND005, scyllo-inositol, in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 2011; 77: 1253-1262.
- Sato D, Callegaro D, Lana-Peixoto MA, Fujihara K. Treatment of neuromyelitis optica: an evidence based review. *Arq Neuropsiquiatr* 2012; 70: 59-66.
- Shimizu F, Sano Y, Takahashi T, Haruki H, Saito K, Koga M, et al. Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood-brain barrier. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 288-97.
- Shimizu Y, Ota K, Kubo S, Kabasawa C, Kobayashi M, Ohashi T, et al. Association of Th1/Th2-related chemokine receptors in peripheral T cells with disease activity in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Eur Neurol* 2011; 66: 91-7.
- Simone IL, Federico F, Trojano M, Tortorella C, Liguori M, Giannini P, et al. High resolution proton MR spectroscopy of cerebrospinal fluid in MS patients. Comparison with biochemical changes in demyelinating plaques. *Journal of the Neurological Sciences* 1996; 144: 182-190.
- Sinclair AJ, Viant MR, Ball AK, Burdon MA, Walker EA, Stewart PM, et al. NMR-based metabolomic analysis of cerebrospinal fluid and serum in neurological diseases - A diagnostic tool? *NMR in Biomedicine* 2010; 23: 123-132.
- Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallstrom E, Kerschensteiner M, et al. Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 1998; 8: 681-94.
- Takahashi T, Fujihara K, Nakashima I, Misu T, Miyazawa I, Nakamura M, et al. Anti-aquaporin-4 antibody is involved in the pathogenesis of NMO: a study on antibody titre. *Brain* 2007; 130: 1235-43.
- Tenenhaus M. *La régression PLS: Théorie et pratique*. Paris, 1998.
- Tradtrantip L, Asavapanumas N, Verkman AS. Therapeutic Cleavage of Anti-Aquaporin-4 Autoantibody in Neuromyelitis Optica by an IgG-Selective Proteinase. *Mol Pharmacol* 2013a; 83: 1268-75.
- Tradtrantip L, Ratelade J, Zhang H, Verkman AS. Enzymatic deglycosylation converts pathogenic neuromyelitis optica anti-aquaporin-4 immunoglobulin G into therapeutic antibody. *Ann Neurol* 2013b; 73: 77-85.
- Tradtrantip L, Zhang H, Anderson MO, Saadoun S, Phuan PW, Papadopoulos MC, et al. Small-molecule inhibitors of NMO-IgG binding to aquaporin-4 reduce astrocyte cytotoxicity in neuromyelitis optica. *FASEB J* 2012a; 26: 2197-208.
- Tradtrantip L, Zhang H, Saadoun S, Phuan PW, Lam C, Papadopoulos MC, et al. Anti-aquaporin-4 monoclonal antibody blocker therapy for neuromyelitis optica. *Ann Neurol* 2012b; 71: 314-22.
- Verkman AS, Ratelade J, Rossi A, Zhang H, Tradtrantip L. Aquaporin-4: orthogonal array assembly, CNS functions, and role in neuromyelitis optica. *Acta Pharmacol Sin* 2011; 32: 702-10.
- Viegas S, Weir A, Esiri M, Kuker W, Waters P, Leite MI, et al. Symptomatic, radiological and pathological involvement of the hypothalamus in neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009; 80: 679-82.
- Vincent T, Saikali P, Cayrol R, Roth AD, Bar-Or A, Prat A, et al. Functional consequences of neuromyelitis optica-IgG astrocyte interactions on blood-brain barrier permeability and granulocyte recruitment. *J Immunol* 2008; 181: 5730-7.
- Vitellaro-Zuccarello L, Mazzetti S, Bosisio P, Monti C, De Biasi S. Distribution of Aquaporin 4 in rodent spinal cord: relationship with astrocyte markers and chondroitin sulfate proteoglycans. *Glia* 2005; 51: 148-59.
- Watanabe S, Misu T, Miyazawa I, Nakashima I, Shiga Y, Fujihara K, et al. Low-dose corticosteroids reduce relapses in neuromyelitis optica: a retrospective analysis. *Mult Scler* 2007; 13: 968-74.

- Waters P, Vincent A. Detection of anti-aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica: current status of the assays. *Int MS J* 2008; 15: 99-105.
- Waters PJ, McKeon A, Leite MI, Rajasekharan S, Lennon VA, Villalobos A, et al. Serologic diagnosis of NMO: a multicenter comparison of aquaporin-4-IgG assays. *Neurology* 2012; 78: 665-71; discussion 669.
- Westerhuis JA, Hoefsloot HCJ, Smit S, Vis DJ, Smilde AK, Velzen EJJ, et al. Assessment of PLSDA cross validation. *Metabolomics* 2008; 4: 81-89.
- Wider G, Dreier L. Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 2006; 128: 2571-2576.
- Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology* 1999; 53: 1107-14.
- Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol* 2007a; 6: 805-15.
- Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurology* 2007b; 6: 805-815.
- Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 2006a; 66: 1485-9.
- Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 2006b; 66: 1485-1489.
- Wingerchuk DM, Weinshenker BG. Neuromyelitis optica: clinical predictors of a relapsing course and survival. *Neurology* 2003; 60: 848-53.
- Wu X, Zhou M, Ding H, Xu S, Wang C, Chan P. Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces aquaporin-4 autoantibodies in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2013.
- Wyss MT, Magistretti PJ, Buck A, Weber B. Labeled acetate as a marker of astrocytic metabolism. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2011a; 31: 1668-1674.
- Wyss MT, Magistretti PJ, Buck A, Weber B. Labeled acetate as a marker of astrocytic metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011b; 31: 1668-74.
- Xu QS, Liang YZ. Monte Carlo cross validation. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2001; 56: 1-11.
- Xu Y, Zhang Y, Liu CY, Peng B, Wang JM, Zhang XJ, et al. Serum antibodies to 25 myelin oligodendrocyte glycoprotein epitopes in multiple sclerosis and neuromyelitis optica: clinical value for diagnosis and disease activity. *Chin Med J (Engl)* 2012; 125: 3207-10.
- Yaguchi H, Sakushima K, Takahashi I, Nishimura H, Yashima-Yamada M, Nakamura M, et al. Efficacy of intravenous cyclophosphamide therapy for neuromyelitis optica spectrum disorder. *Intern Med* 2013; 52: 969-72.
- Yamakawa K, Kuroda H, Fujihara K, Sato S, Nakashima I, Takeda A, et al. Familial neuromyelitis optica (Devic's syndrome) with late onset in Japan. *Neurology* 2000; 55: 318-20.
- Yu CS, Lin FC, Li KC, Jiang TZ, Zhu CZ, Qin W, et al. Diffusion tensor imaging in the assessment of normal-appearing brain tissue damage in relapsing neuromyelitis optica. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; 27: 1009-15.
- Yu X, Green M, Gilden D, Lam C, Bautista K, Bennett JL. Identification of peptide targets in neuromyelitis optica. *J Neuroimmunol* 2011; 236: 65-71.
- Zephir H, Fajardy I, Outteryck O, Blanc F, Roger N, Fleury M, et al. Is neuromyelitis optica associated with human leukocyte antigen? *Mult Scler* 2009; 15: 571-9.
- Zhang H, Bennett JL, Verkman AS. Ex vivo spinal cord slice model of neuromyelitis optica reveals novel immunopathogenic mechanisms. *Ann Neurol* 2011; 70: 943-54.
- Zhang H, Verkman AS. Eosinophil pathogenicity mechanisms and therapeutics in neuromyelitis optica. *J Clin Invest* 2013; 123: 2306-16.
- Zhao DD, Zhou HY, Wu QZ, Liu J, Chen XY, He D, et al. Diffusion tensor imaging characterization of occult brain damage in relapsing neuromyelitis optica using 3.0T magnetic resonance imaging techniques. *Neuroimage* 2012; 59: 3173-7.

Zhou J, Kong H, Hua X, Xiao M, Ding J, Hu G. Altered blood-brain barrier integrity in adult aquaporin-4 knockout mice. *Neuroreport* 2008; 19: 1-5.

Ziemssen T. Multiple sclerosis beyond EDSS: depression and fatigue. *J Neurol Sci* 2009; 277 Suppl 1: S37-41.

Résumé :

La neuromyéélite optique (NMO) est une maladie inflammatoire du système nerveux central récemment mieux comprise par la découverte d'un anticorps sérique spécifique dirigé contre l'aquaporine 4 (anticorps anti-AQP4). L'objectif de cette thèse a été de développer une recherche translationnelle pour améliorer la connaissance de la réponse immunitaire dans la NMO. Nous avons d'abord développé et étudié un modèle animal de NMO en laboratoire afin de mieux comprendre la physiopathologie d'une inflammation optico-médullaire. Nous avons aussi amélioré la connaissance de la NMO humaine. Nous avons montré que la réactivité anti-AQP4 n'était pas corrélée à l'activité de la maladie et retrouvé une réactivité contre d'autres protéines que l'AQP4. Nous avons aussi mis en évidence des anomalies métaboliques sériques (scyllo-inositol et acétate), et une diminution du volume de la substance blanche cérébrale, ce qui ouvre la voie à de nouvelles recherches pour confirmer et exploiter ces résultats.

Mots-clés : neuromyéélite optique, système nerveux central, aquaporine 4

Résumé en anglais

Neuromyelitis optica (NMO) is an inflammatory disease of the central nervous system in which a specific antibody targeting aquaporin 4 (anti-AQP4) was recently found. The aim of this thesis is to develop a translational research in order to improve our knowledge of the immune response in NMO. We have therefore studied a animal model mimicking NMO and allowing a better comprehension of optico-spinal inflammation. In the human subjects suffering from NMO, we have also found that anti-AQP4 reactivity was not correlated to the disease activity and that reactivities against other proteins may exist. We have discovered changes in the serum concentrations of some metabolites (scyllo-inositol and acetate) and a decrease in the volume of brain white matter. These findings have to be confirmed by other studies and may improve our comprehension of NMO.

Mots-clés : neuromyelitis optica, central nervous system, aquaporin 4