



**HAL**  
open science

# Effet des Cellules Gliales Olfactives issues des Bulbes Olfactifs sur les cellules souches épendymaires et leur progénie après une lésion médullaire.

Axel Honoré

► **To cite this version:**

Axel Honoré. Effet des Cellules Gliales Olfactives issues des Bulbes Olfactifs sur les cellules souches épendymaires et leur progénie après une lésion médullaire.. Neurobiologie. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMR060 . tel-01962944

**HAL Id: tel-01962944**

**<https://theses.hal.science/tel-01962944>**

Submitted on 21 Dec 2018

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

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



Normandie Université

## THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE**

**Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie**

# **Effet des Cellules Gliales Olfactives issues des Bulbes Olfactifs sur les cellules souches épendymaires et leur progénie après lésion médullaire**

**Présentée et soutenue par**

**Axel HONORÉ**

**Thèse soutenue publiquement le 20/12/2017  
devant le jury composé de**

Mr François FÉRON	PR (Université d'Aix-Marseille)	Rapporteur
Mr Song LIU	CR (Université Paris-Sud 11)	Rapporteur
Mme Hélène CASTEL-GANDOLFO	DR (Université de Rouen Normandie)	Examineur
Mr Nicolas GUÉROUT	MCF (Université de Rouen Normandie)	Examineur
Mr Jean-Paul MARIE	PUPH (Université de Rouen Normandie)	Membre invité, Directeur de thèse
Mr David VAUDRY	CR (Université de Rouen Normandie)	Membre invité

**Thèse dirigée par Monsieur le Professeur Jean-Paul MARIE, Laboratoire de chirurgie expérimentale, EA3830 G.R.H.V, IRIB**





## REMERCIEMENTS

*J'adresse mes remerciements au Professeur Jean-Paul Marie pour son accueil dans son laboratoire. Je tiens particulièrement à vous témoigner mon profond respect et ma totale sympathie en raison de vos encouragements et votre soutien. Je souhaite souligner votre ouverture d'esprit, laquelle m'a permis d'appréhender ce travail de thèse avec une grande liberté. Je vous remercie également pour votre soutien financier durant ces années, qui a rendu possible ce travail de thèse.*

*J'exprime mes plus vifs remerciements au Professeur François Féron ainsi qu'au Docteur Song Liu, pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse en tant que rapporteur.*

*Je remercie le Docteur Hélène Castel-Gandolfo d'avoir acceptée de participer à ce jury de thèse en tant qu'examineur.*

*Je remercie le Docteur David Vaudry d'avoir accepté de participer à cette soutenance de thèse.*

*Je remercie le Docteur Nicolas Guérout d'avoir accepté de faire parti de ce jury de thèse en tant qu'examineur. Durant mon master, ainsi que ces derniers mois de thèse, j'ai pu bénéficier de sa qualité d'encadrement. Sa disponibilité, l'éveil scientifique et l'énergie mise à ma disposition ainsi que les encouragements, m'ont permis de mener à bien ce travail.*

*Je tiens particulièrement à remercier tous les membres de mon équipe Célia, Nicolas BM, Nathalie C, Nathalie B, Elise, Yacine, Ines, Chaïma, Quentin et Xiaofei pour leur soutien et les soirées passées ensemble. Merci également aux nouveaux arrivants. Très bonne continuation et le meilleur pour la suite.*

*Je souhaite également remercier tous les membres de l'équipe BOYER, et plus particulièrement les Docteurs Laurent Drouot et Marek Lamacz.*

*Merci à mes ami(e)s non scientifiques, Antoine, Joris, Frédo, Thomas, Nastasia, Hélène et Julian, pour m'avoir écouté parler de mon projet depuis quelques années...*

*Enfin, je voudrais remercier mes parents, ainsi que mes frères pour leur encouragements et soutien durant ces années de thèse.*

*Pour finir, Natacha, merci de ton soutien quotidien, plus particulièrement ces derniers mois malgré la distance.*



# SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES.....	I
LISTE DES ABREVIATIONS.....	III
AVANT-PROPOS.....	VI
INTRODUCTION.....	IX
CHAPITRE I : La moelle spinale.....	X
I. Anatomie et fonction.....	1
II. Les nerfs spinaux.....	2
III. Les méninges.....	3
IV. La substance grise.....	5
V. La substance blanche.....	6
VI. Le canal épendymaire.....	6
VII. Vascularisation.....	7
CHAPITRE II: Composition cellulaire de la moelle spinale.....	8
I. Les neurones.....	9
II. La névroglie.....	11
III. Les astrocytes.....	12
1. Marqueurs astrocytaires.....	13
2. Rôle de structure.....	14
3. Métabolisme énergétique.....	15
4. Formation de la barrière hémato-encéphalique.....	16
5. Régulation du flux sanguin.....	18
6. Signalisation calcique et synapse tripartite.....	19
IV. Les oligodendrocytes.....	22
1. Oligodendrogenèse.....	22
2. Myéline.....	28
3. Structure myélinique.....	29
4. Les lipides.....	32
5. Les protéines myéliniques.....	33
a. Myelin binding protein.....	33
b. Myelin proteolipid protein.....	34
c. 2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase.....	34
d. Myelin associated glycoprotein.....	35
e. Myelin oligodendrocyte glycoprotein.....	35
6. Le potentiel d'action et la conduction saltatoire.....	36
V. Les cellules épendymaires.....	38
1. Développement.....	38
2. Composition du canal central et place des cellules épendymaires.....	40
3. Marqueurs des cellules épendymaires.....	42
4. Les cellules épendymaires, cellules souches neurales ?.....	44
CHAPITRE III : Les lésions médullaires traumatiques.....	50
I. Incidence.....	51
II. Etiologie.....	52
III. Mortalité.....	53
IV. Description physiopathologique de la lésion médullaire traumatique.....	53
1. La phase primaire.....	54
2. La phase secondaire.....	55



a. La phase immédiate.....	55
b. La phase aiguë.....	56
c. La phase intermédiaire.....	59
d. La phase chronique.....	60
3. L'origine des nouvelles cellules en réponse à une lésion médullaire.....	60
4. La cicatrice gliale.....	63
a. La zone fibrotique.....	63
b. La zone gliale.....	64
c. La zone neurale saine réactive.....	65
V. Stratégies thérapeutiques de la LMT.....	66
1. Pratiques cliniques actuelles.....	66
2. Les thérapies cellulaires.....	68
a. Les cellules de Schwann.....	68
b. Cellules souches embryonnaires.....	70
c. Les cellules souches pluripotentes induites.....	71
d. Les progéniteurs neuronaux ou cellules souches neurales.....	71
e. Les cellules souches mésenchymateuses.....	73
VI. Les cellules gliales olfactives d'origine bulbaire.....	74
1. Les bulbes olfactifs.....	74
2. Les cellules gliales olfactives.....	75
3. Aspects morphologiques et expression antigénique des CGOs.....	75
4. Les sous-populations de CGOs.....	76
5. Les CGOs dans les lésions médullaires.....	77
OBJECTIFS DE THESE.....	80
RESULTATS.....	82
I. Introduction article I.....	84
Article I.....	88
II. Introduction article II.....	129
Article II.....	132
DISCUSSION.....	170
I. Discussion article I.....	172
II. Discussion article II.....	183
CONCLUSION.....	202
BIBLIOGRAPHIE.....	206
ANNEXES.....	228
ANNEXE I.....	229
ANNEXE II.....	240



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Planche anatomique descriptive de la colonne vertébrale humaine adulte .....	1
<b>Figure 2</b> : Développement de la moelle spinale chez l'Homme.....	1
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique des différents segments spinaux de la moelle spinale humaine adulte.....	2
<b>Figure 4</b> : Représentation schématique du passage de la moelle spinale au travers des vertèbres.....	2
<b>Figure 5</b> : Planche anatomique de la moelle spinale humaine.....	3
<b>Figure 6</b> : Diagramme illustratif des différents dermatomes chez l'Homme adulte.....	3
<b>Figure 7</b> : Planche anatomique descriptive des différentes méninges spinales présentes au sein de la moelle spinale humaine en vue postérieure.....	4
<b>Figure 8</b> : Représentation schématique des différentes parties anatomiques constituant la moelle spinale humaine.....	4
<b>Figure 9</b> : Schématisation de la stratification cytoarchitecturale d'une section cervicale de la moelle épinière humaine.....	5
<b>Figure 10</b> : Illustration des principaux faisceaux spinaux moteurs et sensitifs parcourant la substance blanche de la moelle spinale adulte.....	6
<b>Figure 11</b> : Représentation de la vascularisation artérielle irriguant la moelle spinale humaine adulte en coupe transversale.....	7
<b>Figure 12</b> : Structure d'un neurone.....	9
<b>Figure 13</b> : Mécanismes de transport antérograde et rétrograde s'opérant le long de l'axone.....	10
<b>Figure 14</b> : Les différents types de neurones composant le tissu nerveux de la moelle spinale adulte.....	10
<b>Figure 16</b> : Les cellules gliales dessinées par Santiago Ramón y Cajal.....	11
<b>Figure 17</b> : Illustration des différents types d'astrocytes du SNC.....	12
<b>Figure 18</b> : Représentation schématique de la localisation des astrocytes fibreux et protoplasmiques au sein de la moelle épinière.....	12
<b>Figure 19</b> : Illustration d'un syncytium astrocytaire.....	15
<b>Figure 20</b> : Mécanisme de transformation du glucose par les astrocytes.....	16
<b>Figure 21</b> : Formation de la barrière hémato-médullaire par les astrocytes.....	17
<b>Figure 22</b> : Mécanismes moléculaires de régulation du flux sanguin par le glutamate.....	18
<b>Figure 23</b> : Principales sources calciques au sein des astrocytes.....	20
<b>Figure 24</b> : Schématisation des différents stades de maturation des oligodendrocytes.....	22
<b>Figure 25</b> : Représentation schématique des zones d'émergence des cellules progénitrices d'oligodendrocytes (OPC) durant le développement.....	23
<b>Figure 26</b> : Représentation schématique des étapes de maturation des oligodendrocytes et de myélinisation des axones.....	25
<b>Figure 27</b> : Diagramme de corrélation entre le diamètre axonal et la vitesse de conduction.....	28
<b>Figure 28</b> : Illustration de la formation de la gaine de myéline par les oligodendrocytes.....	29
<b>Figure 29</b> : Représentation schématique des différentes régions composant la gaine de myéline d'un neurone.....	30
<b>Figure 30</b> : Interactions axo-gliales au niveau des nœuds de Ranvier.....	30
<b>Figure 31</b> : Représentation schématique des protéines et des lipides constituant la gaine de myéline.....	33



<b>Figure 32</b> : Modification d'un potentiel de membrane au cours d'un potentiel d'action (PA). .....	<b>36</b>
<b>Figure 33</b> : Rôles des canaux ioniques voltages dépendants dans la génération du potentiel d'action. ....	<b>36</b>
<b>Figure 34</b> : Conduction par contiguïté du potentiel d'action.....	<b>37</b>
<b>Figure 35</b> : Conduction saltatoire du potentiel d'action. ....	<b>37</b>
<b>Figure 36</b> : Régulation spatio-temporelle du devenir des cellules neurales au cours du développement. ....	<b>38</b>
<b>Figure 37</b> : Emergence des cellules épendymaires à E15,5 durant le développement embryonnaire de la moelle spinale murine. ....	<b>39</b>
<b>Figure 38</b> : Caractérisation des cellules épendymaires de la moelle spinale par microscopie électronique. ....	<b>40</b>
<b>Figure 39</b> : Tableau illustratif des différents marqueurs spécifiques des cellules épendymaires du SNC. ....	<b>42</b>
<b>Figure 40</b> : Expression du marqueur Nestine autour du canal central de la moelle spinale murine. ....	<b>45</b>
<b>Figure 41</b> : Neurosphères générées à partir d'un segment thoracique de moelle spinale adulte. ....	<b>45</b>
<b>Figure 42</b> : Nombre de neurosphères générées par des sections de 100µm coupées au vibratome d'un segment cervical de moelle spinale. ....	<b>46</b>
<b>Figure 44</b> : Hétérogénéité fonctionnelle des cellules épendymaires. ....	<b>49</b>
<b>Figure 45</b> : Variation globale de l'incidence annuelle des lésions médullaires traumatiques (LTM) par pays. ....	<b>51</b>
<b>Figure 46</b> : Physiopathologie de la lésion médullaire traumatique. ....	<b>55</b>
<b>Figure 47</b> : Contribution des cellules épendymaires à la cicatrice gliale après lésion médullaire.....	<b>61</b>
<b>Figure 48</b> : Les lésions médullaires traumatiques forment des régions tissulaires spécifiques. ....	<b>63</b>
<b>Figure 49</b> : Organisation du bulbe olfactif. ....	<b>74</b>
<b>Figure 50</b> : Représentation schématique de la glia limitans au niveau de la partie externe des bulbes olfactifs..	<b>74</b>
<b>Figure 51</b> : Caractérisation phénotypique d'une culture de CGOs.....	<b>75</b>
<b>Figure 52</b> : Représentation schématique de la répartition des sous-populations de cellules gliales olfactives dans le système olfactif primaire. ....	<b>77</b>



## LISTE DES ABREVIATIONS

**20-HETE** : 20-hydroxy-eicosatetraenoic acid

### A

---

**ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire

**AldhL1** : aldéhydes déshydrogénase

**AMPA** : *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*

**ANG1** : angiopoïétine 1

**ankG** : ankyrine G

**ANLS** : *Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle*

**ARA** : acide arachidonique

**ARNm** : Acide Ribonucléique messenger

**Ascl1** : *Achaete-scute homologue 1*

**ATP** : Adénosine triphosphate

### B

---

**BBB** : *Blood-brain barrier*

**BDNF** : *brain-derived neurotrophic factor*

**bFGF** : *basic fibroblastic growth factor*

**BLBP** : *Brain Lipid Binding Protein*

**BMP** : *Bone morphogenetic protein*

**BrdU** : Bromodésoxyuridine

**bCGO** : cellules gliales olfactives bulbaires

### C

---

**Ca** : calcium

**Caspr2** : *Contactin-associated protein-like 2*

**CBP** : *Ca<sup>2+</sup>-binding protein*

**CC** : canal central

**CD** : *cluster* de différenciation

**CGOs** : cellules gliales olfactives

**cGMP** : *cyclic guanosine monophosphate*

**CICR** : *Calcium Induced Calcium Release*

**COX-1** : Cyclooxygenase-1

**CNP** : *2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase*

**CNTF** : *ciliary neurotrophic factor*

**Cre** : *Causes Recombination* recombinaison

**CSPG** : *chondroitin sulfate proteoglycan*

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

**CS** : cellules de Schwann

**Cx43** : connexines 43

**Cx30** : connexines 30

### D

---

**DCX** : Double cortine

**DiL** : 1, 1'-dioctadecyl-3, 3, 3' 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate

**dP** : domaine progéniteur

**DREZ** : *dorsal root entry zone*

### E

---

**E** : *embryonic day*

**EAAT** : *Excitatory Amino Acid Transporter*

**EET** : *epoxyeicosatrienoic acid*

**EGF** : *epidermal growth factor*

**EPL** : couche plexiforme externe

**ESC** : *embryonic stem cells*

### F

---

**FAK** : *Focal Adhesion Kinase*

**FGF** : *fibroblastic growth factor*

**FoxJ1** : *Forkhead box protein J1*

### G

---

**GABA** : acide  $\gamma$ -aminobutyrique

**GalC** : enzyme galactosylcéramidase

**GAP43** : *Growth Associated Protein 43*

**GCL** : couche de cellules granulaires

**GD** : gangliosides axonaux

**GDNF** : *glial-derived neurotrophic factor*

**GFAP** : *glial fibrillary acidic protein*

**GFP** : *green fluorescent protein*

**GL** : couche glomérulaire

**GLAST** : *glial high-affinity glutamate transporter*

**GLT-1** : transporteur du glutamate de type 1

**Glu** : glutamate

**Glc-6-P** : glucose-6-phosphate

**GLUT** : transporteur de glucose



**GlyP** : glycogène phosphorylase  
**GlyS** : glycogène synthase  
**GPCR** : *G protein-coupled Receptor*  
**GPR17** : *Uracil nucleotide/ cysteinyl leukotriene receptor*  
**GRHV** : Groupe de recherche sur le handicap ventilatoire

---

## H

---

**HDAC1** : *Histone deacetylase 1*  
**HES1** : *hairy and enhancer of split-1*  
**HFH4** : *Hepatocyte Nuclear Factor-3/forkhead homologue-4*  
**HGF** : *Hepatocyte growth factor*  
**HSP** : Heat shock protein  
**HuC/D** : *ELAV-like protein 4*

---

## I

---

**ICAM-1** : *InterCellular Adhesion Molecule*  
**ID4** : protéine inhibitrice de liaison à l'ADN 4  
**Ig** : immunoglobuline  
**IL** : Interleukine  
**IP3** : inositol triphosphate  
**IP3R** : récepteur à inositol triphosphate  
**IPL** : couche plexiforme interne  
**iPSC** : *inducible pluripotent stem cells*  
**IRMf** : résonance magnétique fonctionnelle

---

## J

---

**JAM** : *Junctional Adhesion Molecule*

---

## K

---

**K** : Potassium  
**KO** : *knockout*  
**K<sub>v</sub>** : canal potassique sensible au voltage

---

## L

---

**L** : lombaire  
**Lac** : lactate  
**LCS** : liquide cérébro-spinal  
**LIF** : *Leukemia inhibitory factor*  
**LINGO-1** : *leucine riche repeat and immunoglobulin-like domain-containing protein 1*  
**LMT** : lésions médullaires traumatiques

**LOT** : tractus olfactif latéral  
**loxP** : locus de X(cross)-over dans P1

---

## M

---

**MAG** : *Myelin –associated glycoprotein*  
**MBP** : *Myelin Binding Protein*  
**MCL** : couche de cellules mitrales  
**MCT1** : *monocarboxylate transporter 1*  
**MCT2** : *monocarboxylate transporter 2*  
**MEC** : matrice extracellulaire  
**mGluR** : *metabotropic glutamate receptor*  
**mi-ARN** : micro-ARN  
**mmHg** : millimètre de mercure  
**MMP** : métalloprotéase matricielle  
**MOBP** : *Myelin-associated/ oligodendrocyte basic proteins*  
**MOG** : *Myelin oligodendrocyte glycoprotein*  
**MRD** : *myelin gene regulatory factor*  
**MSC** : *Mesenchymal stem cells*

---

## N

---

**Na** : sodium  
**NCAM** : *neural cell adhesion molecule*  
**NCX** : *sodium-calcium exchange*  
**NeuN** : *Feminizing Locus on X-3*  
**NG2** : *neural glial antigen 2*  
**NGF** : *nerve growth factor*  
**NF-186** : neurofascine  
**NMDAs** : acide N-méthyl-D-aspartique  
**NMDAR** : récepteur à l'acide N-méthyl-D-aspartique  
**NO** : *Nitric oxyde*  
**nNOS** : oxyde nitrique synthase  
**NPC** : *neural progenitor cells*  
**NSC** : *neural stem cell*  
**NT3** : *neurotrophin 3*

---

## O

---

**Olig** : *oligodendrocyte transcription factor*  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**OPC** : *Oligodendrocyte Precursor Cells*  
**ON** : nerf olfactif  
**ONF** : fibroblaste nerveux olfactif  
**ONL** : couche nerveuse olfactive



**OR** : récepteur olfactif

**OSP** : *Oligodendrocyte specific protein*

---

### P

---

**P2X** : récepteurs purinergiques

**p75NTR** : récepteur aux neurotrophines p75

**PA** : potentiel d'action

**PDGF** : *Platelet-derived growth factor*

**PDGFr $\alpha$**  : récepteur au PDGF

**PGs** : prostaglandines

**PIP<sub>2</sub>** : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

**PLA2** : phospholipase A2

**PLC $\beta$**  : enzyme phospholipase C beta

**PLP** : *Myelin proteolipid protein*

**PM** : potentiel membranaire

**PMCA** : *plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase*

**pMN** : *motor neuron progenitor domain*

**PSA-NCAM** : *polysialyted-neural cell adhesion molecule*

**Pyr** : pyruvate

---

### R

---

**RE** : réticulum endoplasmique

**RMS** : *rostrally migrating stream*

**RNS** : *Reactive Nitrogen Species*

**ROS** : *Reactive Oxygen Species*

---

### S

---

**S** : sacré

**SERCA** : *Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPases*

**Shh** : *Sonic hedgehog*

**SNC** : système nerveux central

**SNP** : système nerveux périphérique

**SOC** : *store-operated channels*

**SOCE** : *store-operated Ca<sup>2+</sup> entry*

**Sox** : *Sex determining region Y-box*

**SRY** : *Sex determining region Y*

**SVZ** : *subventricular zone*

---

### T

---

**T** : thoracique

**TAG-1** : *Transient axonal glycoprotein-1*

**TCF4** : facteur de transcription 4

**TGF- $\beta$**  : *Transforming growth factor beta*

**TNF $\alpha$**  : *Tumor necrosis factor alpha*

**TRK** : récepteurs neurotrophiques à activité tyrosine-kinase

**Troy** : *Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19*

---

### V

---

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

**VIP** : *Vasoactive intestinal peptide*

---

### Y

---

**YFP** : *yellow fluorescent protein*

**YY1** : *Yin Yang 1*



## AVANT-PROPOS

La moelle spinale est un élément essentiel du système nerveux central (SNC). Elle a pour principale fonction de transmettre les informations nerveuses depuis le cerveau vers le tronc et les différents membres, composant le corps humain. Bien que protégée des agressions physiques extérieures dans le canal rachidien de la colonne vertébrale, celle-ci peut, dans certains cas, subir des atteintes physiques graves. On désigne par lésion médullaire traumatique (LMT) un dommage physique ou blessure causés à la moelle spinale, lequel conduit bien souvent à une atteinte des voies nerveuses sensibles ascendantes et des voies nerveuses motrices descendantes. En fonction du niveau et de la gravité de la lésion, une LMT pourra entraîner de graves déficits temporaires ou permanents au niveau des fonctions motrices et sensibles, ainsi que des dysfonctionnements des systèmes nerveux autonomes. Bien que les LMT soient un phénomène relativement rare en comparaison à d'autres pathologies humaines du SNC, elles représentent néanmoins un problème majeur de santé publique, principalement dans les pays industrialisés. Selon un rapport officiel de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) publié en 2014, on estime entre 250 et 500 000 nouveaux cas de lésions médullaires chaque année dans le monde. Dans la plupart des cas, ces traumatismes sont engendrés par des causes évitables, comme des accidents de la circulation, des accidents domestiques ou par la violence criminelle.

Immédiatement après l'impact, de nombreux mécanismes physiopathologiques complexes, divisés chronologiquement en deux phases (primaire et secondaire), se mettent en place au sein de la moelle spinale, conduisant à une exacerbation des dommages tissulaires initiaux. Actuellement, seule une prise en charge chirurgicale précoce permet de limiter le déclenchement de ces mécanismes physiopathologiques et ainsi limiter la perte tissulaire. Bien que ceci ait permis de nettement améliorer l'espérance de vie des patients médullo-lésés au cours du temps, leur taux de mortalité reste encore malgré tout très élevé. Il y a donc une nécessité de trouver de nouveaux traitements. Depuis plusieurs décennies, les innovations médicales et technologiques ont permis d'améliorer l'accompagnement de ces patients et d'améliorer leur qualité de vie. Malheureusement, aucun de ces traitements prometteurs ne permet une récupération complète des fonctions motrices ou neurologiques perdues.

Du fait de l'aspect multifactoriel de la lésion médullaire, il existe, à l'heure actuelle, une variété de stratégies thérapeutiques en cours de développement qui font appel à des domaines

très divers. Parmi ces stratégies, l'utilisation de la thérapie cellulaire pour le traitement des LMT constitue l'une des stratégies thérapeutiques les plus prometteuses. Parmi tous les types cellulaires employés, on note une population démontrant des résultats cliniques prometteurs, ce sont les cellules gliales olfactives (CGOs).

De par leur fonction au sein du système olfactif primaire, les CGOs ont depuis longtemps attiré l'intérêt des chercheurs quant à leur utilisation dans le traitement des lésions du système nerveux. En effet, le système olfactif primaire des mammifères a la capacité unique de former de nouveaux neurones olfactifs primaires, par un mécanisme de neurogenèse permanent. C'est durant cette neurogenèse que les CGOs jouent un rôle prépondérant. Elles permettent la fasciculation et défasciculation des axones olfactifs ainsi que leur guidance vers leur glomérule cible. Leur utilisation dans des modèles expérimentaux de LMT et des protocoles précliniques a permis de décrire leurs effets bénéfiques sur la stimulation de la croissance axonale, la préservation des axones et des tissus, leur capacité de migration au sein du tissu cicatriciel, la capacité de promotion de l'angiogenèse et de remyélinisation axonale. De récentes données cliniques démontrant des récupérations spectaculaires de fonctions motrices et sensibles par la transplantation de CGOs d'origine bulbaire chez un patient médullo-lésé, confortent l'intérêt thérapeutique de ces cellules en clinique humaine. Néanmoins, de nombreuses interrogations quant aux mécanismes d'action des CGOs, et plus particulièrement leurs effets sur les cellules endogènes de la moelle spinale après lésion, restent méconnus.

Récemment, il fut découvert au sein de la moelle spinale l'existence d'une population souche neurale comparable à celle décrite au niveau du cerveau. Ces cellules décrites comme étant les cellules épendymaires bordant le canal central, ont démontré un rôle majeur dans les mécanismes cellulaires de réponse à la lésion et à la formation de la cicatrice médullaire. En culture, ces cellules ont la capacité de s'auto-renouveler indéfiniment et de générer des astrocytes, des oligodendrocytes et des neurones. Elles constituent à l'heure actuelle, un nouvel axe de recherche quant à leur intérêt thérapeutique dans le cadre des lésions médullaires.

A l'heure actuelle, aucune publication ne décrit l'effet d'une transplantation cellulaire sur les cellules souches endogènes et leur progénie après une lésion médullaire. C'est l'objectif des travaux décrits dans ce manuscrit de thèse.

La première partie de ce manuscrit consistera en des rappels bibliographiques scindés en trois chapitres. Dans un premier chapitre, nous reviendrons sur l'anatomie générale de la moelle spinale humaine, ainsi que sur les différentes structures anatomiques constituant la

moelle spinale humaine. L'objectif sera de mettre en exergue le rôle primordial que joue la moelle spinale au sein du SNC en condition physiologique. Dans un second chapitre, nous aborderons la composition cellulaire de la moelle spinale. Le but sera de décrire les différentes populations de cellules présentes au sein de la moelle spinale humaine et de définir, avec les dernières données de la littérature, leurs fonctions au sein de ce tissu nerveux. Ce chapitre se focalisera principalement sur les populations gliales, principales cellules composant la moelle spinale humaine. Enfin, dans un troisième chapitre, nous introduirons l'aspect pathologique des LMTs chez l'Homme et les différents mécanismes physiopathologiques qui lui sont propres. Nous aborderons ensuite les stratégies thérapeutiques actuellement mises en place pour le traitement des LMTs, avec une analyse bibliographique dirigée sur les thérapies cellulaires les plus prometteuses, plus particulièrement les CGOs.

Dans la seconde partie de ce manuscrit, nous exposerons les différents résultats obtenus au cours de cette thèse. Après une courte introduction, l'ensemble des résultats sera présenté sous la forme d'articles scientifiques rédigés au format d'une pré-soumission. Cette partie se divisera en deux sections. Une première section concernera l'étude du rôle de *FoxJ1* au cours du développement embryonnaire et chez la souris adulte, ainsi que l'intérêt des différents modèles transgéniques actuellement disponibles quant à l'étude des cellules épendymaires en condition physiologique et pathologique. Dans la seconde section, nous présenterons l'ensemble des résultats obtenus quant à l'étude de l'effet de la transplantation de CGOs d'origine bulbaires, sur les cellules souches épendymaires et leur progénie après lésion médullaire.

Nous terminerons avec la dernière partie de ce manuscrit, par une discussion générale des deux sections de la partie « Résultats ». Nous reviendrons sur les différents résultats obtenus pour chacune des études et en accord avec les données bibliographiques récentes, nous discuterons des différentes hypothèses pouvant expliquer les différents phénomènes observés. Nous tenterons de dégager les perspectives pouvant faire suite à ce travail. Ensuite, nous terminerons ce manuscrit par une conclusion générale.

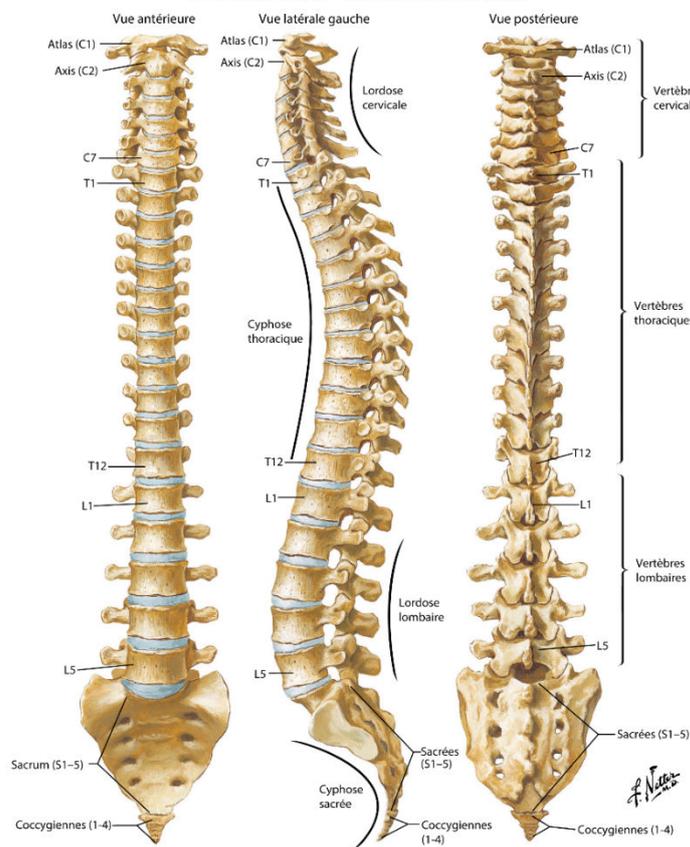


# INTRODUCTION

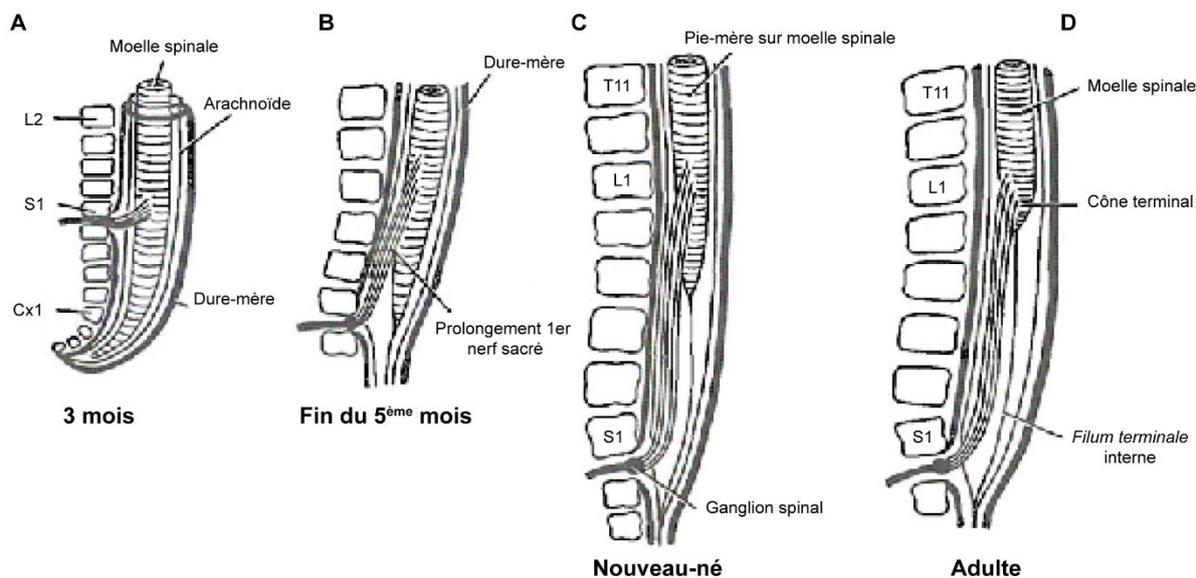


# **CHAPITRE I : La moelle spinale**

## COLONNE VERTÉBRALE



**Figure 1: Planche anatomique descriptive de la colonne vertébrale humaine adulte.** Cette planche présente les différents segments vertébraux ; vertèbres cervicales (C1-C7), thoraciques (T1-T12), lombaires (L1-L5), sacrales (S1-S5) et coccygiennes (1-4) (Netter, 2006).



### Position de la moelle spinale durant le développement chez l'Homme

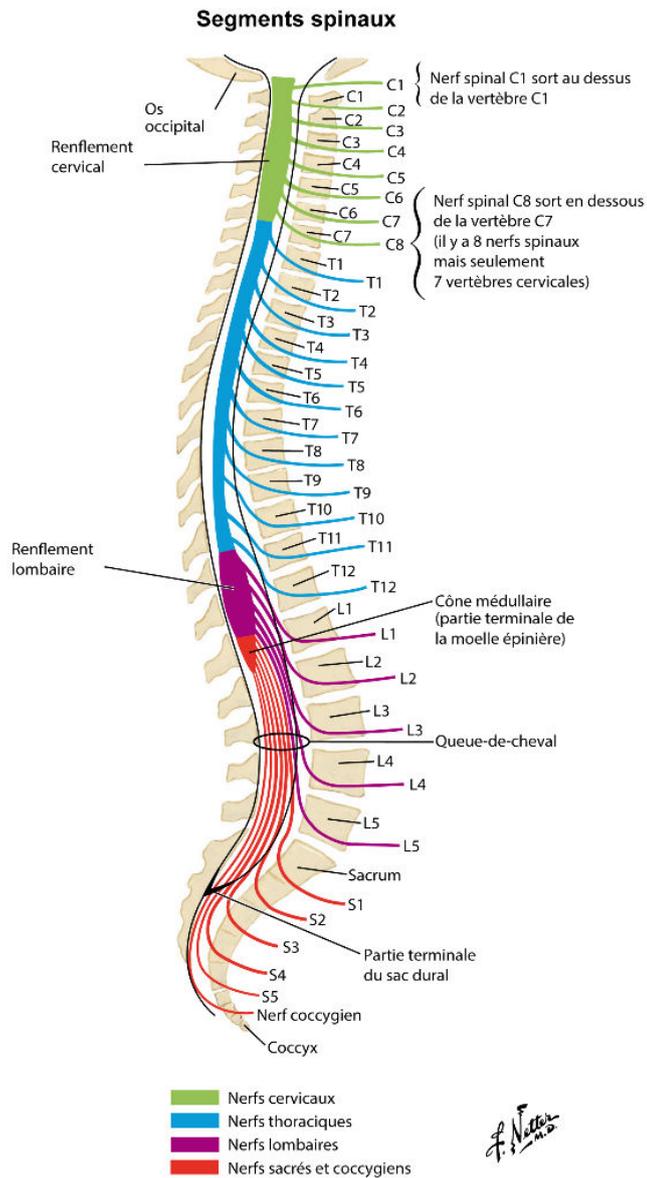
**Figure 2 : Développement de la moelle spinale chez l'Homme.** (A) A trois mois de développement, la moelle épinière s'étend sur toute la longueur de l'embryon et les nerfs rachidiens traversent les forams intervertébraux à leur niveau d'origine. (B) Fin du 5<sup>ème</sup> mois, la colonne vertébrale et la dure-mère s'allongent plus rapidement que la moelle spinale, ce qui déplace graduellement l'extrémité terminale vers un niveau vertébral plus élevé. (C) Au moment de la naissance le cône terminal se situe au niveau L3, les nerfs spinaux sortent maintenant obliquement depuis leur segment spinal jusqu'à leur segment vertébral. (D) A l'âge adulte, le cône terminal est au niveau L1. En dessous, il ne subsiste de la moelle que le *filum terminale* (Pansky, 1982).

La moelle spinale (épine) désigne une partie du système nerveux central (SNC), qui se prolonge depuis la base du tronc cérébral jusqu'au niveau des lombaires. Chez les mammifères, la moelle spinale est un élément essentiel du SNC permettant le mouvement volontaire des muscles du tronc et des membres ainsi que l'acquisition des informations sensorielles émanant de différentes parties du corps. De bonnes connaissances anatomiques de la moelle spinale sont essentielles pour comprendre et interpréter les diverses pathologies rencontrées en clinique humaine.

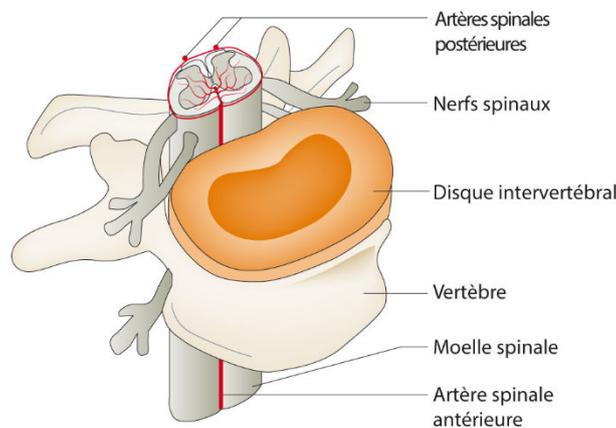
### I. Anatomie et fonction

L'observation anatomique du squelette humain montre une caractéristique inhérente à tous les squelettes des vertébrés, la présence d'une « longue tige osseuse », appelée colonne vertébrale ou rachis. Cette colonne est constituée d'un alignement successif de 33 vertèbres qui subdivisent celle-ci en plusieurs segments vertébraux; vertèbres cervicales (C1-C7), thoraciques (T1-T12), lombaires (L1-L5), sacrales (S1-S5) et coccygiennes (1-4) (Netter, 2006) (**Figure 1**), les deux derniers segments étant des vertèbres soudées. En comparaison, chez la souris, la colonne vertébrale ne se compose que de 7 vertèbres cervicales, 13 thoraciques, 6 lombaires et 4 sacrales. L'articulation des vertèbres est permise par la présence de disques intervertébraux, sorte de joints fibro-cartilagineux, intercalés entre chaque vertèbre. Ces disques permettent une absorption des contraintes mécaniques, mais également la flexion (en avant, en arrière et sur les côtés) ainsi que la rotation du tronc. La colonne vertébrale a pour fonction le maintien de la tête, l'ancrage du gril costal, de la ceinture pelvienne ainsi que des muscles du dos. Elle assure également une protection osseuse à un élément important du SNC, la moelle spinale. Celle-ci est protégée des agressions physiques extérieures au sein du canal rachidien de la colonne vertébrale.

La moelle spinale est un prolongement de l'encéphale, qui court le long de la colonne, passant d'une vertèbre à l'autre au sein du canal rachidien formé par les différents foramen intervertébraux. Chez un homme adulte, sa taille totale n'excède pas les 45 cm (contre 42 cm chez la femme), soit une longueur dix fois supérieure à celle mesurée chez la souris (Watson and Kayalioglu, 2009). De façon surprenante, la moelle spinale ne représente que les deux tiers de la colonne vertébrale. Cette longueur inférieure s'explique par une croissance différentielle de la colonne vertébrale durant le développement embryonnaire et après la naissance par rapport à la moelle spinale (Pansky, 1982) (**Figure 2**). Ce long tube de tissus nerveux et de cellules gliales, émerge de la *medulla oblongata* par le foramen magnum de l'os occipital puis se



**Figure 3 : Représentation schématique des différents segments spinaux de la moelle spinale humaine adulte.** La moelle spinale est subdivisée arbitrairement en 31 différents segments médullaires; 8 cervicaux, 12 thoraciques, 5 lombaires, 5 sacrés et 1 coccygien (Netter, 2006).



**Figure 4 : Représentation schématique du passage de la moelle spinale au travers des vertèbres.** A chaque segment médullaire émerge de la moelle spinale une paire de nerfs spinaux. Ces nerfs sortent de la colonne vertébrale par les foramens intervertébraux (Ahuja et al., 2017).

termine au niveau du bord supérieur de la seconde vertèbre lombaire, par le *conus medullaris* ou cône terminal. Cette extrémité est prolongée par une extension fibreuse baptisée le *filum terminale*.

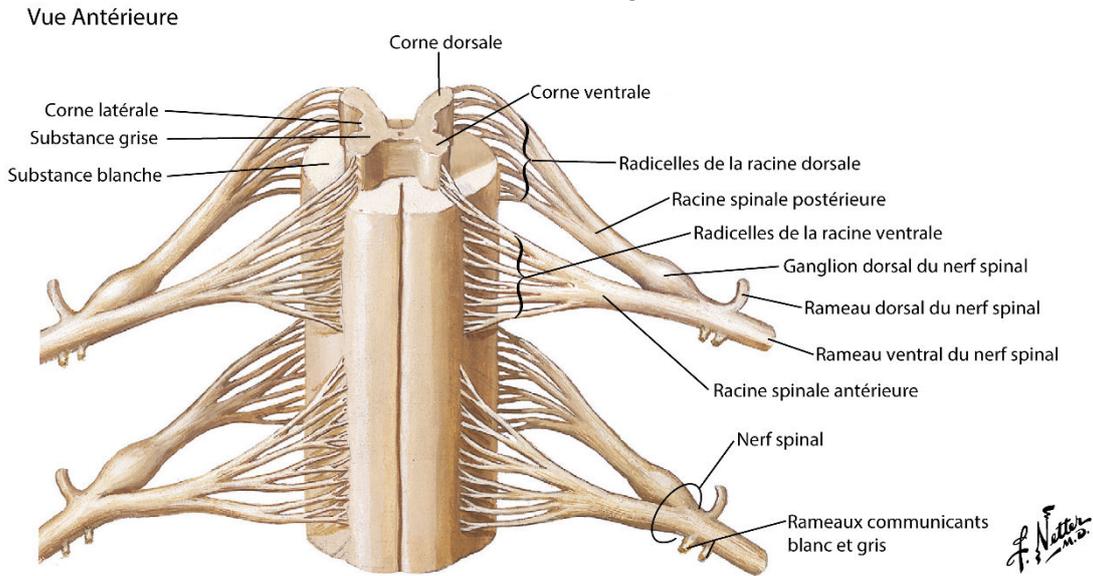
La moelle spinale présente deux renflements, un cervical et un lombaire, correspondant aux points d'entrée et de sortie des neurones sensitifs et moteurs innervant les membres antérieurs et postérieurs, ce qui a pour conséquence d'augmenter son diamètre (Netter, 2006) (**Figure 3**). De forme ovoïde, le diamètre de la moelle spinale varie entre 64 mm au niveau thoracique et 1,27 cm au niveau cervical et lombaire. Bien que n'étant pas physiquement segmentée, la moelle spinale fut subdivisée arbitrairement en 31 différents segments médullaires; 8 cervicaux, 12 thoraciques, 5 lombaires, 5 sacrés et 1 coccygien (**Figure 3**). Le concept de la segmentation médullaire vient du fait que chaque segment comporte symétriquement, une paire de nerfs spinaux, formée par la fusion des racines dorsales et ventrales. Seule exception pour le segment C1, qui est atrophié voire absent chez certaine personne, il ne contient donc qu'une seule racine ventrale. Ainsi, il a été référencé la présence de 31 nerfs spinaux émergeant de la moelle spinale chez l'Homme, contre 34 chez la souris (8 cervicaux, 13 thoraciques, 6 lombaires, 4 sacrés et 3 coccygiens) (Watson and Kayalioglu, 2009).

### II. Les nerfs spinaux

A chaque segment médullaire émerge de la moelle spinale une paire de nerfs spinaux. Ces nerfs sortent de la colonne vertébrale par les foramens intervertébraux (Ahuja et al., 2017) (**Figure 4**). Les nerfs spinaux ont pour principale fonction de relier le SNC avec la périphérie du corps par l'intermédiaire du système nerveux périphérique (SNP). Du fait d'une croissance différentielle entre la moelle spinale et la colonne vertébrale, les segments médullaires ne descendent pas plus bas que l'étage vertébral L2. C'est pour cette raison qu'il existe un décalage entre les segments médullaires et les segments vertébraux. Au niveau des segments cervicaux, la région rachidienne est la même, mais en dessous de celle-ci, les nerfs spinaux émergent de plus en plus en biais par rapport à leur foramen de référence. Ainsi chez l'Homme, le segment C8 se localise au niveau de la vertèbre C7, le segment T12 entre les vertèbres T9-10 et le segment L5 entre T11-12.

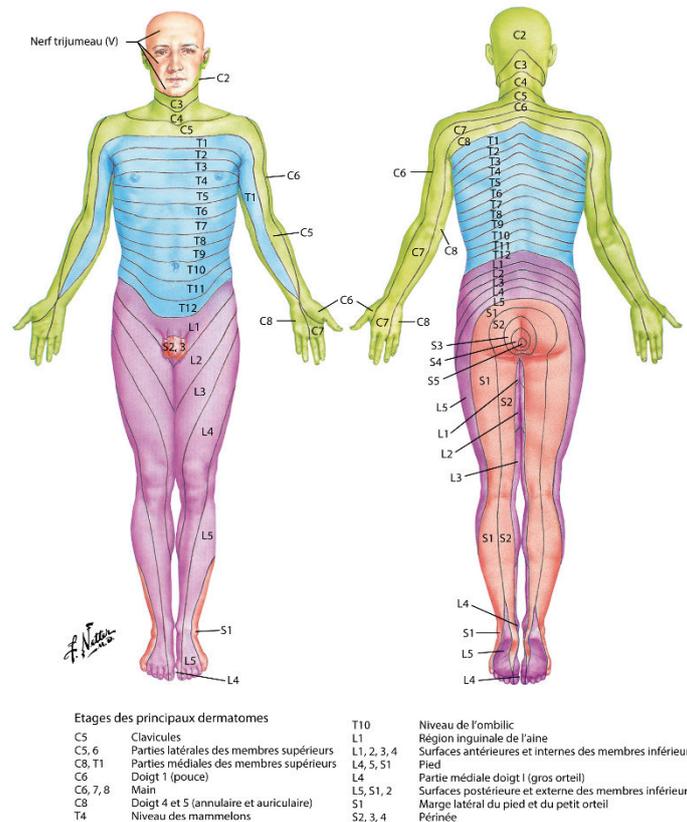
Ces nerfs spinaux sont formés par la fusion des racines spinales antérieures avec les racines spinales postérieures (Netter, 2006) (**Figure 5**). Ces deux racines sont elles-mêmes issues de la fusion de plusieurs radicelles spinales. Chez l'Homme, entre 6 et 8 radicelles

## Anatomie de la moelle spinale



**Figure 5 : Planche anatomique de la moelle spinale humaine.** Les nerfs rachidiens sont formés par la fusion des racines rachidiennes antérieures avec les racines rachidiennes postérieures. Ces deux racines sont elles-mêmes issues de la fusion de plusieurs radicelles spinales. Après fusion de ces radicelles, la racine spinale postérieure transmet les influx nerveux sensitifs au cerveau. Elle comporte un renflement, appelé ganglion spinal, dans lequel se trouve les corps cellulaires de neurones pseudo-unipolaires (Netter, 2006).

## Dermatomes



**Figure 6 : Diagramme illustratif des différents dermatomes chez l'Homme adulte.** Les zones colorées en vert correspondent aux aires de la peau innervées par les racines sensitives des segments cervicaux, en bleu les segments thoraciques, en violet les segments lombaires et en orange les segments sacrés (Netter, 2006).

émergent de chaque segment contre 15 radicelles chez le rongeur (Watson and Kayalioglu, 2009). Après fusion de ces radicelles, la racine spinale postérieure transmet les influx nerveux sensitifs au cerveau. Elle comporte un renflement, appelé ganglion spinal, dans lequel se trouve les corps cellulaires de neurones pseudo-unipolaires. Il n'y a aucune synapse dans les ganglions spinaux. Avec leur unique axone, ces neurones pseudo-unipolaires relient les afférences périphériques des récepteurs sensitifs au cerveau en passant par les cornes dorsales de la moelle spinale. Chacun de ces ganglions reçoit des afférences d'un territoire cutané précis, réparti sur l'ensemble du corps. Ces territoires sont répartis en bandes parallèles appelées « dermatome » (Netter, 2006) (**Figure 6**).

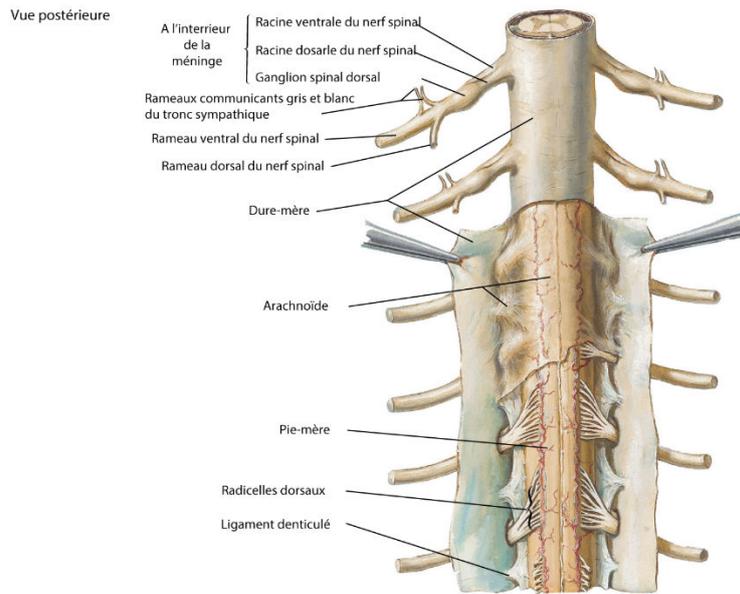
Les racines antérieures, quant à elles, transmettent les commandes motrices de la moelle vers les effecteurs, à savoir les muscles. Ces racines antérieures sont principalement composées par les axones des motoneurones, dont le corps cellulaire réside dans la corne antérieure de la substance grise.

Après la fusion des deux racines, les nerfs spinaux se divisent en deux rameaux nerveux, un petit rameau dorsal primaire et un gros rameau ventral primaire. Le rameau dorsal primaire contient des nerfs qui relaient les informations sensitives et motrices des systèmes nerveux somatique et autonome des muscles postérieurs du tronc et de la peau. Quant au rameau primaire dorsal, il contient également des nerfs relayant les informations sensitives et motrices des systèmes nerveux somatique et autonome, des muscles ventraux du tronc, des membres supérieurs et inférieurs et de la peau. Les nerfs spinaux sont reliés au système nerveux sympathique par le biais de cordons nerveux fins et courts provenant du tronc sympathique. Ces cordons sont appelés rameaux communicants et il en existe deux types : les rameaux communicants blancs et les rameaux communicants gris (Netter, 2006) (**Figure 5**).

### III. Les méninges

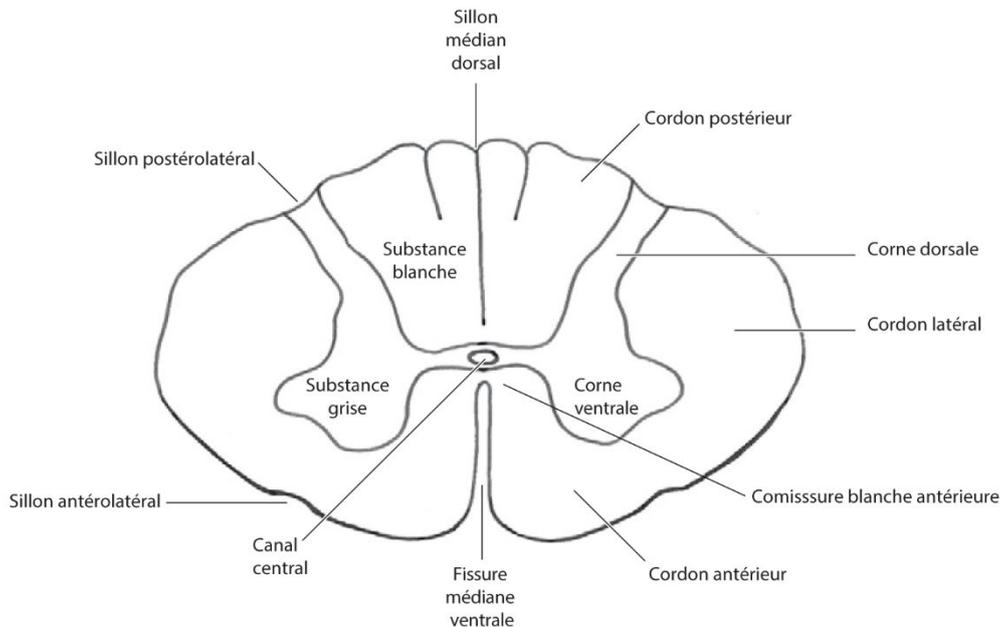
Tout comme l'encéphale, la moelle spinale est enveloppée par 3 membranes de tissus conjonctifs, appelées méninges spinales (Netter, 2006) (**Figure 7**). La pie-mère, du latin *pia mater* signifiant « tendre matrice » est une fine membrane de tissu en contact intime avec la moelle spinale. Elle a pour principale fonction de protéger la moelle spinale, étant donné qu'elle est la membrane la plus interne. Elle joue un rôle nourricier pour la moelle et la névroglie (Cho, 2015). En effet, celle-ci est parcourue par de nombreux vaisseaux qui apportent l'oxygène et les nutriments nécessaires au bon fonctionnement tissulaire nerveux. Elle joue également un rôle de structure pour la moelle spinale car elle permet la formation de nombreux points

## Méninges spinales



**Figure 7 : Planche anatomique descriptive des différentes méninges spinales présentes au sein de la moelle spinale humaine en vue postérieure.** La moelle spinale est enveloppée par 3 membranes de tissus conjonctifs, appelées méninges spinales composées de la pie-mère, de l'arachnoïde et de la dure-mère (Netter, 2006).

## Structure anatomique de la moelle spinale



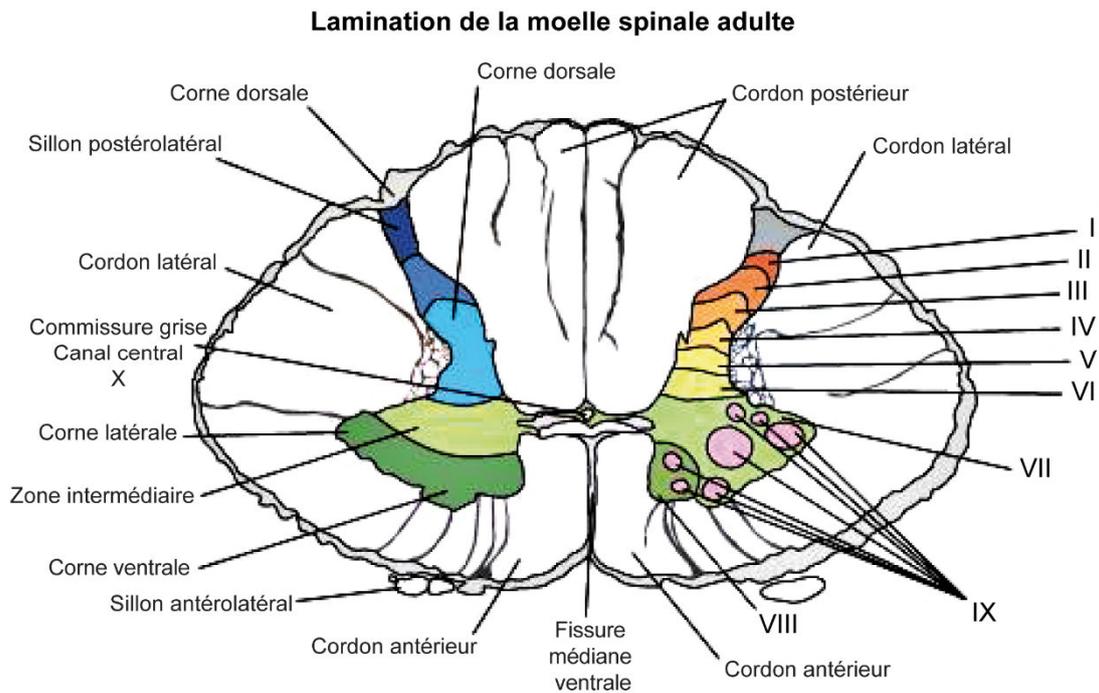
**Figure 8 : Représentation schématique des différentes parties anatomiques constituant la moelle spinale humaine.** La coupe histologique transversale d'une moelle spinale adulte dévoile en son centre, la présence d'une zone foncée (la substance grise) en forme de H ou de papillon, circonscrite par une zone blanche (Watson and Kayalioglu, 2009).

d'ancrages avec la colonne vertébrale, stabilisant l'ensemble tissulaire au sein du canal rachidien. En effet, pour chaque segment spinal, la pie-mère s'étire latéralement entre les racines spinales depuis la face externe de la moelle, traverse l'arachnoïde, pour se fixer à la dure-mère et forme un point de fixation appelé ligament denticulé. Chez l'Homme, on dénombre 21 ligaments denticulés, répartis sur toute la longueur, permettant le maintien de la moelle spinale dans le canal rachidien. En partie caudale, la pie-mère continue en amont de la moelle spinale, le long du *filum terminale*, pour se fixer à la dure-mère entre la seconde vertèbre lombaire et le début de la région coccygienne (Netter, 2006) (**Figure 7**).

Une seconde membrane en forme de toile d'araignée, non vascularisée, appelée arachnoïde, vient envelopper la pie-mère. Elles forment ensemble un espace, appelé espace sous-arachnoïdien dans lequel circule le liquide cérébro-spinal (LCS) provenant du système ventriculaire. L'arachnoïde s'étend depuis le foramen magnum jusqu'au niveau de la seconde vertèbre sacrée. Au niveau de la seconde lombaire, celle-ci forme un espace sous arachnoïdien permettant le passage des nerfs de la queue-de-cheval («*cauda equina*»).

La membrane la plus externe des trois méninges est appelée la dure-mère, du latin *dura mater cerebri*, signifiant « la mère dure du cerveau ». Contrairement à l'encéphale, où elle est formée de deux couches, la méninge interne et le feuillet externe (periostée), la dure-mère spinale n'est constituée qu'à partir de la méninge interne. C'est une membrane épaisse, descendant du cerveau par le foramen magnum et s'étendant jusqu'au niveau de la seconde vertèbre sacrée, où elle fusionne avec la pie-mère pour former le ligament coccygien. Ce ligament offre un point de fixation sécurisé pour la partie caudale de la moelle. La dure-mère ne repose pas directement sur les vertèbres. En effet, l'espace péri-dural est composé de tissu cellulo-graisseux, de racines rachidiennes, de vaisseaux lymphatiques, d'artères spinales et de veines intrarachidiennes, ce qui maintient la dure-mère éloignée des vertèbres (Lajat et al., 1994).

La moelle spinale est partiellement scindée en deux hémisphères par une profonde fissure médiane ventrale sur sa face antérieure et un sillon médian dorsal en partie postérieure (Watson and Kayalioglu, 2009) (**Figure 8**). Cette fissure médiane ventrale est tapissée par un double repliement de la pie-mère et son fond est désigné comme la commissure blanche antérieure. Sur chaque hémisphère est également observée la présence des sillons antérolatéraux, qui correspondent aux points d'entrée des racines spinales ventrales et des sillons postérolatéraux, qui sont les points d'entrée des racines dorsales.



**Figure 9 : Schématisation de la stratification cytoarchitecturale d'une section cervicale de la moelle épinière humaine.** Les couches de Rexed sont divisées en 10 zones. La corne dorsale comprend les couches I à VI où se fait le premier relais des voies nociceptives. La corne ventrale comprend les couches VII à IX qui comprend les motoneurones, La couche X entoure pour sa part le canal central. D'après *Britannica encyclopedia, 2007.*

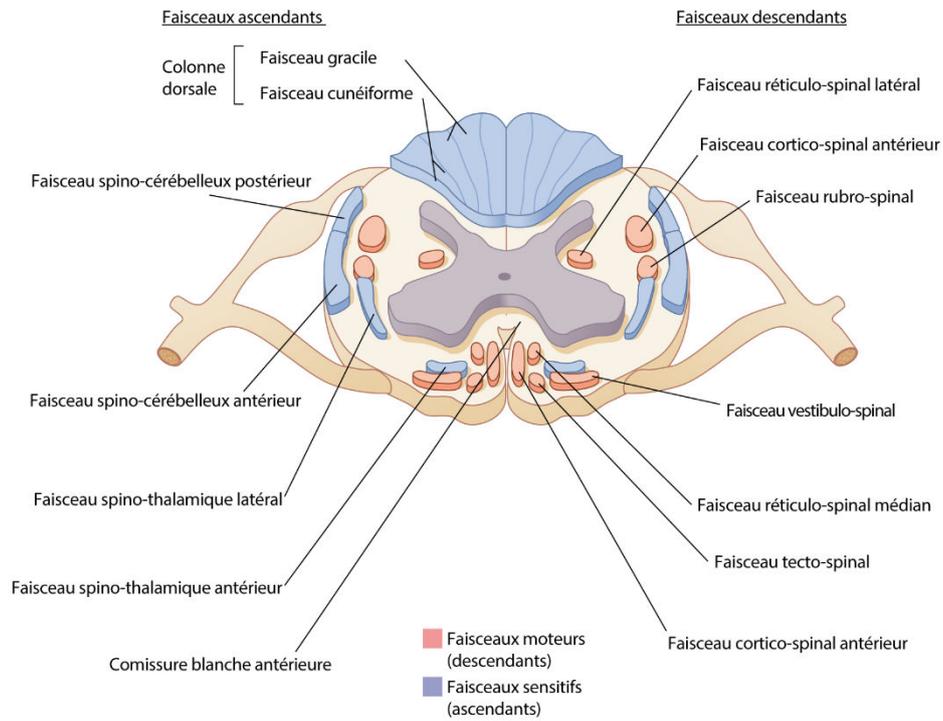
Une coupe histologique transversale caractéristique d'une moelle spinale adulte dévoile en son centre, la présence d'une zone foncée (la substance grise) en forme de H ou de papillon, circonscrite par une zone blanche.

#### IV. La substance grise

La substance grise est principalement composée des corps cellulaires des neurones et de leurs arbres dendritiques maintenus par des cellules gliales. Elle consiste en deux hémisphères symétriques, reliés par une commissure de substance grise dans laquelle passe le canal épendymaire, issu du tube neural (**Figure 9**). Chacun de ces hémisphères est composé de deux expansions (parfois trois selon la localisation), l'une en face ventrale appelée corne antérieure et l'autre en dorsale, appelée corne postérieure (Bican et al., 2013). Ce sont des centres névralgiques pour l'intégration et le relais des influx nerveux sensitifs et moteurs. La corne antérieure est principalement une aire d'acquisition des fonctions motrices. Elle contient tous les corps cellulaires des trois différents types de neurones, à savoir les motoneurones alphas, gammas et les interneurones. Elle est organisée somatiquement : les neurones qui contrôlent les muscles axiaux (muscles spinaux) sont placés au centre, suivis par les neurones des muscles des membres proximaux et de la ceinture, puis latéralement par les neurones des muscles des membres distaux. Les motoneurones sont aussi organisés par fonction. Ainsi ceux placés dans la partie ventrale de la corne antérieure contrôlent les muscles extenseurs, contrairement aux neurones de la partie dorsale qui contrôlent les muscles fléchisseurs (Bican et al., 2013).

La corne postérieure reçoit, quant à elle, les informations sensibles émanant des différentes parties du corps. Les neurones des racines dorsales (neurones sensitifs primaires) relaient leurs informations aux neurones sensitifs secondaires et aux interneurones constituant la corne postérieure.

En 1952, les travaux de Rexed sur l'architecture tissulaire de la moelle spinale du chat révélèrent que la substance grise était constituée d'une superposition de 10 lames cellulaires (Rexed, 1952) (**Figure 9**). Rexed les baptisa de son nom et les numérotait de I à X dans le sens dorso-ventral de la substance grise, à l'exception de la lame X qui est centrale. Dans la partie lombo-sacrée, il y a davantage de matière grise du fait de la présence d'une plus grande masse musculaire nécessitant donc une plus grande innervation. La substance grise de la moelle spinale est entourée d'une autre substance plus claire, appelée substance blanche.



**Figure 10 : Illustration des principaux faisceaux spinaux moteurs et sensitifs parcourant la substance blanche de la moelle spinale adulte.** Ce schéma montre la taille et la position des différents faisceaux spinaux parcourant la moelle spinale humaine. Cette cartographie des différents faisceaux sur une coupe transversale de la moelle spinale révèle que la partie postérieure contient principalement les faisceaux sensitifs (ascendants) et la partie antérieure, les faisceaux moteurs (descendants) (Sheerin, 2004).

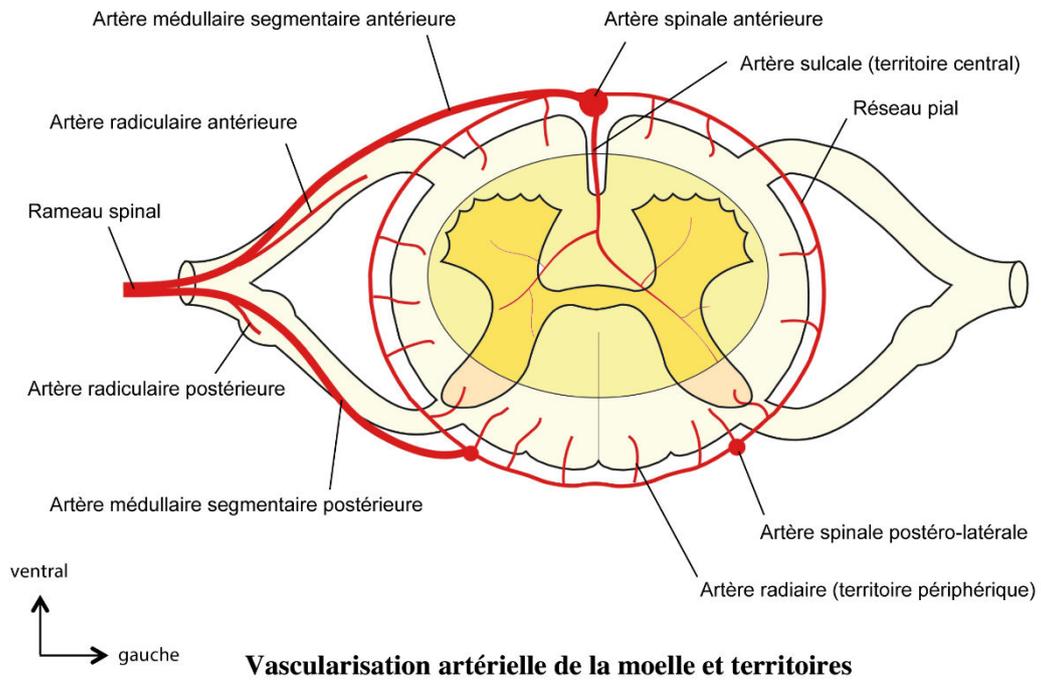
### V. La substance blanche

La substance blanche est principalement composée de faisceaux d'axones myélinisés et de cellules gliales. La substance grasseuse entourant les fibres nerveuses, appelée myéline, donne sa coloration blanchâtre à cette zone de la moelle spinale. Les cornes de la substance grise divisent la substance blanche en trois parties, appelées cordons médullaires ou *funiculi* (ventraux, latéraux et dorsaux). Ces cordons contiennent les différents faisceaux nerveux longitudinaux moteurs et sensoriels. Les cordons ventraux sont reliés entre eux par la commissure blanche antérieure au niveau de la fissure médiane ventrale (Sheerin, 2004) (**Figure 10**).

### VI. Le canal épendymaire

Le canal épendymaire ou canal central, est un long conduit s'étendant sur l'ensemble de la moelle spinale, depuis le quatrième ventricule du rhombencéphale jusqu'au cône terminal de la moelle spinale. Le canal central fait partie du système ventriculaire composé par les ventricules cérébraux, l'aqueduc de Sylvius et le quatrième ventricule dans lequel est produit et circule le liquide céphalo-rachidien (Yasui et al., 1999). Il est issu de la prolifération et la différenciation des cellules neuro-épithéliales du tube neural. Durant le développement embryonnaire, la prolifération des cellules neuro-épithéliales entraîne un épaississement des parois latérales du tube neural conduisant à une diminution de la lumière du canal neural et ainsi qu'à la formation du canal épendymaire en fin de gestation (Saker et al., 2016).

Le canal épendymaire se situe au centre de la substance grise de la moelle spinale, au niveau de la commissure grise. Sa position sur la moelle spinale peut varier légèrement en fonction du segment médullaire. En effet, pour les parties cervicale et thoracique, le canal épendymaire se localise en partie ventrale de la moelle, en partie centrale au niveau lombaire et dorsale, à l'approche du cône terminal. En coupe transversale, le canal épendymaire est de forme circulaire et il est entouré par la substance gélatineuse centrale de Stilling qui contient principalement des neurones, de la névroglie et des fibres nerveuses. Ce canal est tapissé d'un revêtement de cellules épithéliales de forme cuboïde ou cylindrique appelées cellules épendymaires. Ces cellules permettent grâce à leurs cils motiles, la circulation du LCS et garantissent ainsi l'homéostasie cérébrale (Jimenez et al., 2014). Récemment le canal épendymaire a été décrit comme constituant une nouvelle niche pour des cellules souches neurales (Barnabe-Heider and Frisen, 2008; Barnabe-Heider et al., 2010; Meletis et al., 2008).



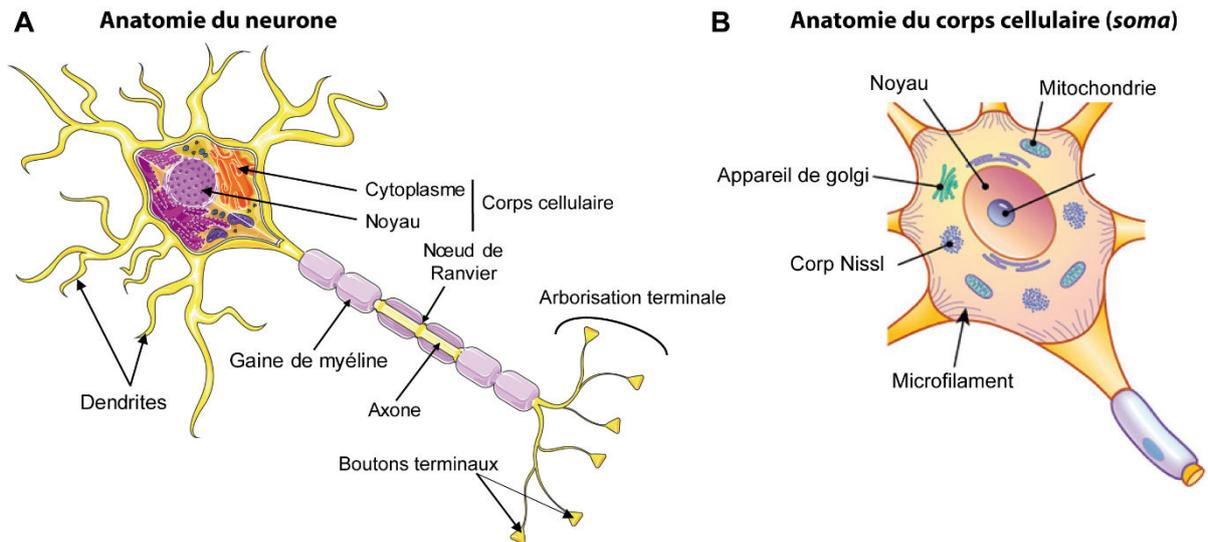
**Figure 11 : Représentation de la vascularisation artérielle irriguant la moelle spinale humaine adulte en coupe transversale.** Les différentes artères constituant le système artériel sont représentées en rouge. Laboratoire d'Anatomie - Faculté de Médecine Toulouse-Purpan.

### VII. Vascularisation

La moelle spinale est un tissu richement vascularisé par un système circulatoire complexe. La moelle est alimentée en sang par trois artères principales courant verticalement au travers des cordons médullaires (**Figure 11**). La première de ces artères s'appelle, l'artère spinale antérieure. Elle est issue des branches des artères vertébrales provenant des artères sous-clavières ou de l'aorte. Elle descend verticalement le long de la moelle spinale au niveau de la fissure médiane ventrale. Elle donne ensuite naissance aux artères sulcales qui vont pénétrer dans la moelle spinale par la fissure médiane antérieure. Ces artères sulcales se distribuent approximativement sur les deux tiers de la surface d'une coupe transversale de la moelle spinale. Elles alimentent la substance blanche et la substance grise de la moelle spinale en sang (Sheerin, 2004). Les seconde et troisième artères correspondent aux artères spinales postérieures. Elles sont également issues des artères vertébrales. Ces deux artères sont disposées de part et d'autre du sillon médian postérieur et des racines dorsales. Elles permettent l'approvisionnement en sang du reste de la partie postérieure de la moelle spinale (Sheerin, 2004).



## **CHAPITRE II: Composition cellulaire de la moelle spinale**



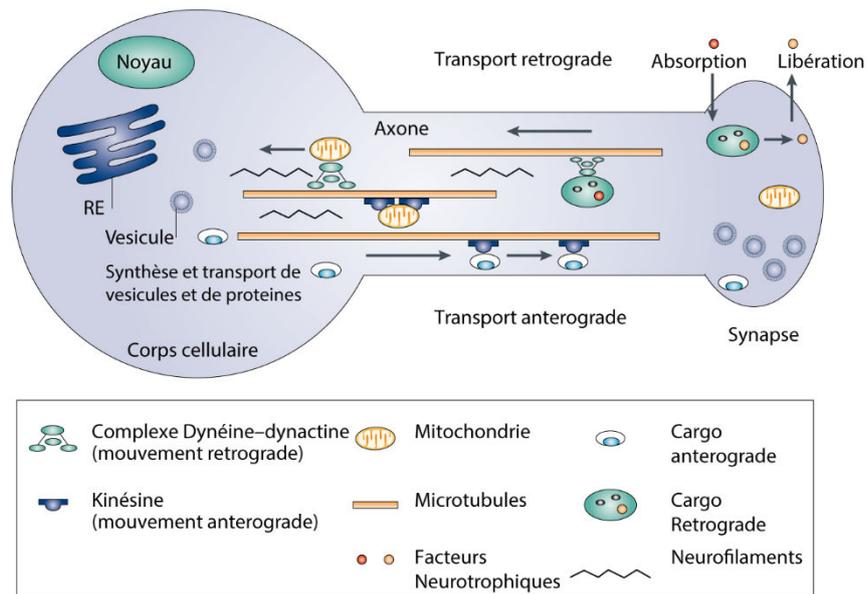
**Figure 12 : Structure d'un neurone.** (A) Description anatomique d'un neurone myélinisé communément observé au sein du SNC. Un neurone est toujours constitué d'un corps cellulaire ou *soma* et de neurites (excroissances partant du corps cellulaire). On distingue deux types de neurites, les dendrites et les axones. D'après banque de données du site internet de Servier. (B) Description anatomique détaillée du *soma* des neurones du SNC. Le corps cellulaire du neurone est caractérisé par une accumulation importante de ribosomes (appelée corps de Nissl) sur le réticulum endoplasmique granuleux. D'après *F.A. Davis Company All Rights Reserved, 2017*.

### I. Les neurones

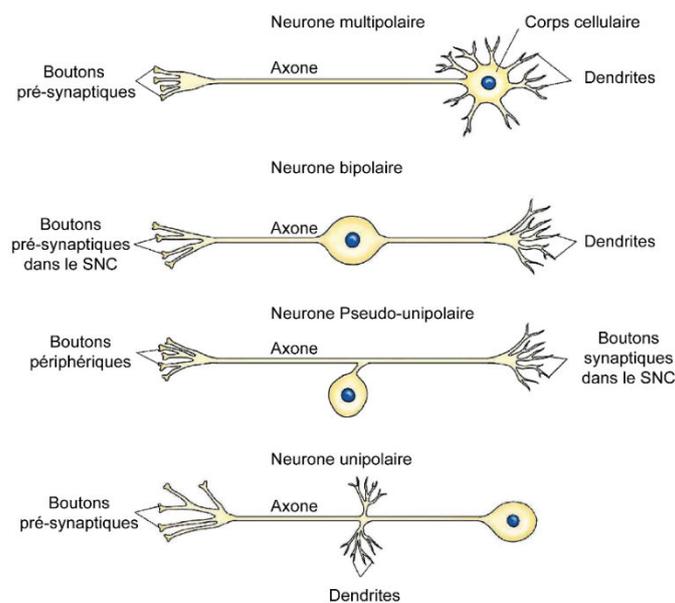
La moelle spinale, tout comme le cerveau, est composée par de nombreux neurones. Ce sont des cellules spécialisées qui conduisent l'ensemble des informations nerveuses sous forme de signaux électriques. Bien que la population neuronale au sein du système nerveux soit très variée, anatomiquement, un neurone est toujours constitué d'un corps cellulaire ou *soma* et de neurites (dendrites et axones) (**Figure 12A, B**). Le *soma* est la partie principale du neurone. Sa taille peut varier entre 5 et 135  $\mu\text{m}$  en fonction du type de neurone. C'est dans le noyau que se trouve l'ensemble du matériel génétique, ainsi que toute la machinerie cellulaire permettant la conception des protéines, des lipides et des sucres qui vont constituer les éléments du cytoplasme et de la membrane cytoplasmique du neurone. Le corps cellulaire du neurone est similaire à celui des autres cellules, à l'exception d'une importante accumulation de ribosomes sur le réticulum endoplasmique granuleux. Cette accumulation, appelée corps de Nissl, témoigne de la présence d'une très forte activité anabolique chez les neurones (**Figure 12B**). En effet, afin de communiquer avec d'autres neurones ou d'autres cellules, les neurones ont besoin de synthétiser en permanence des messagers chimiques, appelés neurotransmetteurs (Lodish, 2008).

Les différentes morphologies cellulaires constituant la population neuronale sont caractérisées par les neurites (excroissances partant du corps cellulaire). On distingue deux types de neurites, les dendrites et les axones. Les dendrites sont des extensions très ramifiées du corps cellulaire des neurones. Elles atteignent jusqu'à 1 mm de long et leur surface peut représenter jusqu'à 90 % de la surface totale du neurone (**Figure 12A**). Une dendrite est elle-même composée de plusieurs fines extensions (pouvant atteindre une centaine) où s'établissent des connexions synaptiques, ce sont les épines dendritiques. On peut également observer la présence de plusieurs dendrites sur un même neurone, elles forment ainsi ce que l'on appelle un arbre dendritique. C'est au niveau de ces dendrites que la majorité des signaux nerveux entrant sont réceptionnés par la cellule nerveuse.

Généralement, les neurones ne comportent qu'un seul axone. Il prend naissance au niveau du cône d'émergence, puis celui-ci s'étire en une fibre nerveuse pouvant être très courte (quelques millimètres) ou très longue (un mètre). Quant au diamètre des axones, il varie entre 0,2-20  $\mu\text{m}$  chez l'homme, ceci en fonction du type de neurone et de sa fonction. L'axone se termine par une extrémité très ramifiée, appelée arborisation terminale (**Figure 12A**). Cette extrémité comporte les boutons synaptiques, qui sont responsables de la communication entre différents neurones via la libération de neurotransmetteurs au niveau des synapses. L'axone est



**Figure 13 : Mécanismes de transport antérograde et rétrograde s’opérant le long de l’axone.** L’axone est constitué d’un réseau de microtubules sur lesquels se déplacent des vésicules cargos grâce à la kinésine ou la dynéine. Le transport antérograde permet le transport de molécules ou d’organelles depuis le corps cellulaire vers les synapses ou la membrane axonale. Le transport rétrograde sert au nettoyage de l’axone par l’envoi au recyclage des organelles, telles que les mitochondries ou les éléments du cytosquelette (Pasinelli and Brown, 2006).



**Figure 14 : Les différents types de neurones composant le tissu nerveux de la moelle spinale adulte.** Les neurones se distinguent en fonction de la taille de leur corps cellulaire, du nombre de dendrites qu’ils arborent et de la répartition de leurs arbres dendritiques, ainsi que de la longueur des axones et de la nature des connections qu’ils établissent. Un neurone ne comportant qu’un seul neurite est dit unipolaire, ceux qui en possèdent deux sont dits bipolaires et ceux qui en possèdent plusieurs sont dits multipolaires.

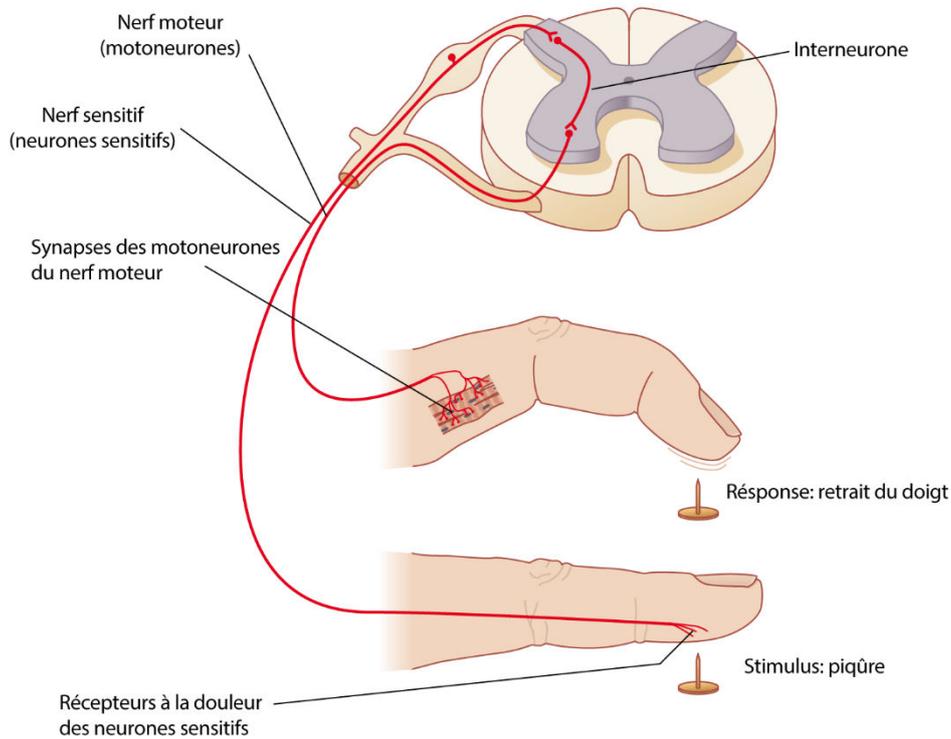
considéré comme la partie émettrice du neurone. En effet, c'est par l'axone que transite l'influx nerveux, avant d'être transmis à une ou plusieurs cellules par l'intermédiaire d'une synapse.

L'axone étant dépourvu de ribosomes, l'ensemble des molécules qu'il contient est exclusivement produit au niveau du corps cellulaire du neurone (Lodish, 2008). Le transport des différents éléments indispensables au bon fonctionnement de l'axone transite donc par deux différents types de processus, le transport antérograde ou rétrograde (Pasinelli and Brown, 2006) (**Figure 13A, B**). L'axone est constitué d'un réseau complexe de microtubules sur lesquels se déplacent des vésicules cargos grâce à la kinésine ou la dynéine. Le transport antérograde permet le transport de molécules ou d'organelles depuis le corps cellulaire vers les synapses ou la membrane axonale. Quant au transport rétrograde, il sert au nettoyage de l'axone par l'envoi au recyclage des organelles, telles que les mitochondries ou les éléments du cytosquelette. Il joue également un rôle informatif pour le neurone, car il rend compte en permanence au noyau des conditions qui prévalent en région distale de l'axone.

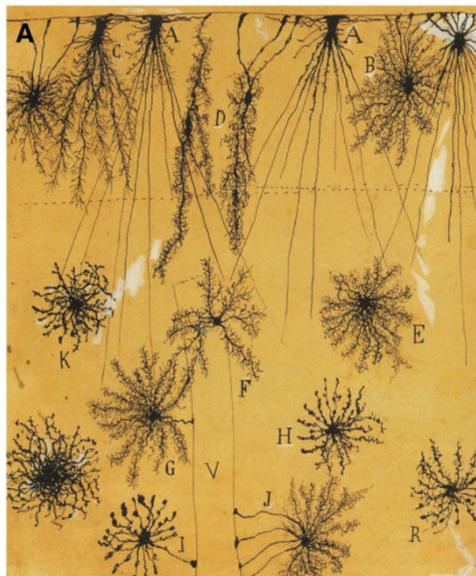
L'axone a pour particularité de pouvoir être enveloppé d'une gaine conductrice, appelée gaine de myéline. Cette gaine isolante permet d'accroître la vitesse de propagation des impulsions électriques depuis le corps cellulaire jusqu'aux synapses, c'est ce que l'on appelle le potentiel d'action (PA). Un PA se caractérise par une inversion brusque et transitoire du potentiel électrique de la membrane plasmique du neurone. Ainsi par un phénomène de conduction saltatoire, le neurone myélinisé subit une dépolarisation de sa membrane plus véloce que celle du neurone non-myélinisé. Ce phénomène de myélinisation des axones au sein SNC est effectué par des cellules spécialisées, appelées oligodendrocytes (voir **chapitre 2-6**).

Les neurones peuvent être classifiés en fonction de leur morphologie, de leur fonction ou du type de neurotransmetteurs qu'ils sécrètent. Au niveau morphologique, on distingue les neurones en fonction de la taille de leur corps cellulaire, du nombre de dendrites qu'ils arborent et de la répartition de leurs arbres dendritiques, ainsi que de la longueur des axones et la nature des connections qu'ils établissent (**Figure 14**). Un neurone ne comportant qu'un seul neurite est dit unipolaire, ceux qui en possèdent deux sont dits bipolaires et ceux qui en possèdent plusieurs sont dits multipolaires. Un sous-groupe de neurone existe, ce sont les neurones pseudo-unipolaires. Ils sont appelés ainsi car leur morphologie résulte de la fusion des dendrites et de l'axone d'un neurone bipolaire en un seul axone à deux branches (Lodish, 2008). La majorité des neurones du système nerveux humain sont des neurones multipolaires.

## Principe de l'arc réflexe



**Figure 15 : Principe du circuit neuronal de l'arc réflexe.** Une information venant de l'environnement est captée par des récepteurs sensoriels, transcrivant l'information en message nerveux, adressée au système nerveux central. Celui-ci l'interprète et envoie une stimulation nerveuse afin d'engendrer une réponse par un organe effecteur (Sheerin, 2004).



**Figure 16 : Les cellules gliales dessinées par Santiago Ramón y Cajal.** Représentation des différents types de cellules gliales à partir d'une imprégnation de Golgi. Les cellules neurogliales de la couche corticale superficielle (A-D) et des couches profondes (E-R) sont représentées (Verkhatsky et al., 2012).

Une autre classification importante des neurones est celle au regard de leur fonction au sein du système nerveux. On distingue les neurones afférents (ou sensitifs) qui transmettent les informations sensorielles captées par leurs récepteurs en périphérie jusqu'au cerveau et les neurones efférents (ou moteurs) qui transmettent les influx nerveux émanant du cerveau vers les muscles afin de permettre leur motricité. C'est le cas des motoneurones et des interneurones qui établissent les communications entre des neurones afférents et des neurones efférents (ex : dans le système d'arc réflexe, un interneurone relie un neurone sensitif à un motoneurone) (Sheerin, 2004) (**Figure 15**).

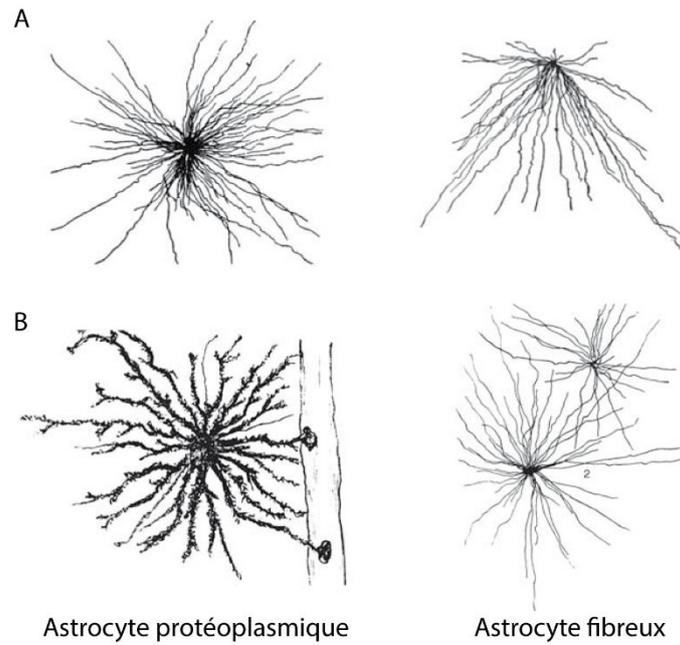
La substance grise est majoritairement composée par les corps cellulaires des neurones englués dans la névroglie. Au niveau des cornes antérieures se trouvent les motoneurones qui projettent leur axone vers leur cible (muscles, glandes) par les racines ventrales de la moelle spinale. Ils reçoivent les influx nerveux par leurs dendrites qui font synapse avec les axones des neurones supra-spinaux voyageant dans la substance blanche, mais résidant dans l'encéphale. Au niveau dorsal se trouve le *soma* et les dendrites des neurones sensitifs qui relayent les influx nerveux sensoriels émanant de leur axone arrivant par les racines dorsales par l'intermédiaire des interneurones présents en grande quantité dans la moelle spinale.

A l'inverse, la substance blanche ne contient que des faisceaux de fibres axonales ascendant ou descendant principalement myélinisés. Ces axones permettent de connecter la substance grise de l'encéphale avec les dendrites des neurones de la substance grise des différents segments médullaires. Celle-ci est également richement peuplée par la névroglie.

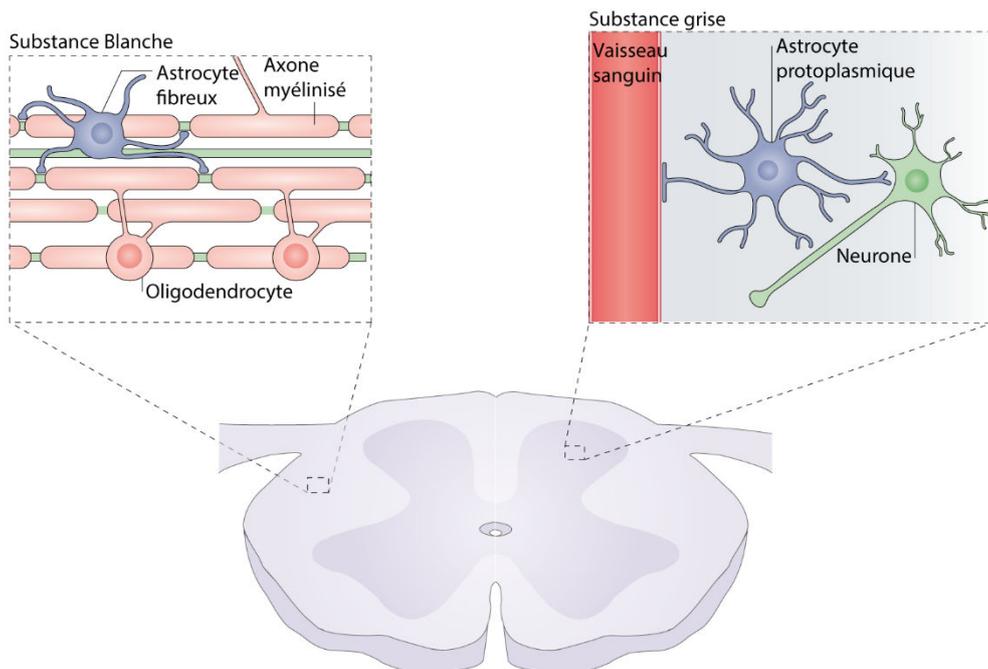
### II. La névroglie

La névroglie (ou cellules gliales ou neuroglie) est la population cellulaire la plus importante du système nerveux (90%), contre 10% de neurones chez l'Homme. C'est en 1893 que Rudolf Virchow décrit dans le cerveau, la présence d'un tissu conjonctif dépourvu de corps cellulaire, s'apparentant à une sorte de ciment ou de « glue » entourant les neurones (Virchow, 1858). Il fallut attendre les travaux de Camillo Golgi et Santiago Ramón y Cajal pour mettre en évidence l'existence de la diversité cellulaire constituant la névroglie (**Figure 16**) (Kettenmann and Verkhratsky, 2008; Verkhratsky et al., 2012).

Elle est composée d'oligodendrocytes, d'astrocytes, de microglie et de cellules épendymaires. A l'inverse des neurones, les cellules gliales sont incapables d'émettre un potentiel d'action. C'est pour cette raison qu'elles furent longtemps négligées par les



**Figure 17 : Illustration des différents types d'astrocytes du SNC.** (A) Astrocytes dessinés par Michael Von Lenhossek en 1895. (B) Astrocyte protoplasmique et fibreux illustré par William Adriezen en 1893 à partir d'une imprégnation de golgi.



**Figure 18 : Représentation schématique de la localisation des astrocytes fibreux et protoplasmiques au sein de la moelle épinière.** Les astrocytes fibreux prédominent dans la substance blanche. Ils présentent de longs et fins prolongements radiaires, riches en gliofilaments, orientés longitudinalement dans le plan des faisceaux d'axones. Les astrocytes protoplasmiques sont répartis uniformément au sein de la substance grise et arborent de nombreux prolongements courts (Ben Haim and Rowitch, 2017).

scientifiques et cantonnées au simple rôle de « glue nourricière » du SNC. Mais depuis 25 ans, cette vision de la cellule « passive » tend à changer, car il a été démontré que les cellules gliales, en particulier les astrocytes, sont douées d'une excitabilité non électrique.

### III. Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus abondantes et les plus diverses du SNC. Ils se distinguent des autres cellules gliales par leur morphologie en forme d'étoile. Le terme « astrocyte » fut employé pour la première fois en 1893, dans les travaux de l'anatomiste Michael Von Lenhossek (**Figure 17**). Il provient de la fusion des mots grecs *astron* (étoile) et *cyte* (cellule), « la cellule étoilée ». Comparable aux neurones, les astrocytes sont une population cellulaire très hétérogène par leur morphologie, leurs phénotypes et leur localisation. Ils exercent un rôle central dans la structuration et les processus physiologiques du SNC (Barres, 2008; Sofroniew and Vinters, 2010). Ils interviennent dans le maintien de l'homéostasie ionique et énergétique, la transmission neurale, la synaptogenèse et la plasticité synaptique (Verkhratsky and Butt, 2007).

Les astrocytes sont constitués d'un corps cellulaire arrondi et de nombreuses ramifications qui peuvent s'étendre sur de grandes surfaces en fonction du type d'astrocytes. Ces digitations astrocytaires peuvent atteindre jusqu'à 200 µm de long chez l'Homme, contre 30-60 µm chez le rongeur. Il a été constaté que la population astrocytaire humaine était morphologiquement plus large, structurellement plus complexe et nettement plus variée que celle présente chez les rongeurs (Oberheim et al., 2012; Oberheim et al., 2009). Vers la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, Kolliker et Andriezen divisèrent les astrocytes en deux grandes classes, basées sur leur morphologie et leur location dans le SNC. Ils distinguèrent les astrocytes fibreux et les astrocytes protoplasmiques (Kölliker and Ebner, 1889; Oberheim et al., 2012).

Les astrocytes fibreux prédominent dans la substance blanche. Ils présentent de longs et fins prolongements radiaires, riches en gliofilaments, orientés longitudinalement dans le plan des faisceaux d'axones. Quant aux astrocytes protoplasmiques, ils sont répartis uniformément au sein de la substance grise (Ben Haim and Rowitch, 2017) (**Figures 17B et 18**). Ils arborent de nombreux prolongements courts qui donnent naissance à de fines ramifications, qui leur confèrent une configuration globoïde uniforme (Sofroniew and Vinters, 2010). Ces deux sous-types d'astrocytes sont également en contact direct avec des vaisseaux sanguins par l'intermédiaire de leurs pieds astrocytaires (ou prolongements périvasculaires). Cet extraordinaire pléomorphisme permet aux astrocytes d'établir une multitude de contact avec les



éléments présents au sein du neuropile. Un astrocyte peut arborer jusqu'à une centaine de ramifications. On estime qu'un astrocyte peut simultanément être en contact avec huit corps cellulaires de neurones, cinq vaisseaux sanguins et plus de 100 000 synapses (Bushong et al., 2002). L'analyse par microscopie électronique a révélé que les astrocytes protoplasmiques étaient capables d'envelopper des synapses alors que les astrocytes fibreux établissent des contacts avec les axones au niveau des nœuds de Ranvier. De plus, ces deux types d'astrocytes sont à même de former des jonctions gap avec la partie distale de l'astrocyte voisin.

### 1. Marqueurs astrocytaires

Les différents astrocytes ne sont pas toujours associés à un marqueur moléculaire permettant de distinguer spécifiquement leurs phénotypes, leurs caractéristiques morphologiques ou leurs fonctions. Néanmoins, la protéine acide fibrillaire gliale (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP), une protéine du filament intermédiaire, est devenue le marqueur prototypique des astrocytes du SNC depuis plusieurs décennies (Sofroniew and Vinters, 2010). Cette protéine fut initialement mesurée en grande quantité dans les plaques démyélinisées des patients atteints de sclérose en plaques et est devenue par la suite le marqueur spécifique des astrocytes du SNC (Eng, 1985; Eng et al., 2000). Cependant, la GFAP n'est pas un marqueur absolu des astrocytes du SNC puisqu'elle est principalement exprimée par des astrocytes hyperactifs en réponse à une perte d'intégrité du SNC par le mécanisme de l'astroglie. Dans un tissu sain, beaucoup d'astrocytes matures n'expriment pas suffisamment de GFAP pour être détectés avec les techniques d'immunochimie actuelles. Dans un astrocyte, la GFAP est surtout observée au niveau des principales branches, mais est absente du corps cellulaire et des fines ramifications terminales. Chez le rongeur, on estime à 15% le volume total astrocytaire positif à la GFAP (Bushong et al., 2002; Oberheim et al., 2012). Par conséquent, l'estimation de la population astrocytaire et de son réseau est souvent sous-estimée ou ignorée. De plus, au sein du SNC, la GFAP peut être exprimée par de nombreux autres types de cellules, tels que : les cellules progénitrices de la glie radiaire (durant le développement), les cellules épendymaires ou les cellules gliales olfactives (au niveau des bulbes olfactifs) (Barber and Lindsay, 1982; Middeldorp and Hol, 2011; Roessmann et al., 1980). Ainsi, la détection de la GFAP n'est, à elle seule, pas suffisante pour l'identification des astrocytes dans un tissu nerveux sain. D'autres molécules produites par les astrocytes ont donc été identifiées comme pouvant servir de marqueurs. Parmi ces autres marqueurs astrocytaires se trouvent la protéine de liaison au calcium  $Ca^{2+}$  S100 $\beta$  (Ogata and Kosaka, 2002), l'enzyme glutamine synthétase, les transporteurs du glutamate de type 1 (GLT-1) et GLAST (*glial high-affinity glutamate*

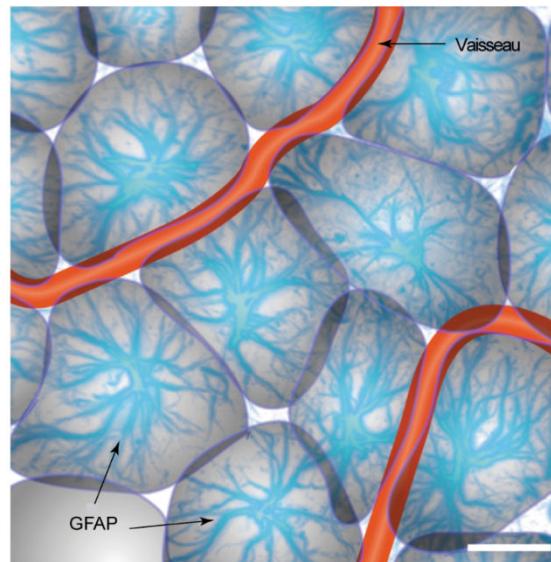


*transporter*) (Norenberg, 1979; Rothstein et al., 1994). Cependant, des études ont montré que ces molécules étaient également exprimées par d'autres cellules neurales, tels que des neurones ou des oligodendrocytes (Sofroniew and Vinters, 2010). L'analyse comparative de l'expression génique de cultures primaires de neurones, d'astrocytes et d'oligodendrocytes du SNC, a permis d'identifier un nouveau marqueur des astrocytes, l'enzyme L1 de la famille 1 des aldéhydes déshydrogénase (Aldh1L1) (Cahoy et al., 2008; Lovatt et al., 2007). L'Aldh1L1 est exprimée spécifiquement par l'ensemble des astrocytes du SNC et non par les neurones ou les oligodendrocytes. De plus, contrairement à la GFAP, l'Aldh1L1 est détectée par immunohistochimie au niveau du corps cellulaire et également dans l'ensemble des ramifications astrocytaires. Au sein du SNC, les astrocytes forment également de nombreuses jonctions communicantes avec les cellules environnantes. Il a été démontré que les astrocytes expriment spécifiquement certaines protéines transmembranaires participant à la formation de ces jonctions communicantes. Ainsi, les astrocytes peuvent aussi être caractérisés par leur expression de protéines connexines 43 (Cx43) et 30 (Cx30) (Kunzelmann et al., 1999; Slezak et al., 2007).

L'hétérogénéité de la population astrocytaire permet d'assurer des fonctions extrêmement diverses au sein du SNC.

### 2. Rôle de structure

Leur forte densité, leur morphologie variée et leur capacité d'interactions permettent aux astrocytes, l'élaboration d'un réseau tridimensionnel dans lequel ils assurent un rôle de maintien structurel et d'organisation du tissu nerveux. Typiquement, chez le rongeur, les astrocytes sont constitués de 4 à 8 ramifications principales se subdivisant en une multitude de fines ramifications, rappelant la couronne d'un arbre avec ses branches et ses rameaux qui se terminent avec de fines folioles. Les astrocytes ont une forme d'étoile, surtout quand ils sont observés avec un marquage anti-GFAP (Sofroniew and Vinters, 2010). Mais en réalité leur configuration dans l'espace s'apparente plus à la forme d'un polyèdre. Cette configuration tridimensionnelle n'est pas le fruit du hasard puisqu'elle est la forme naturelle parfaite pour occuper le maximum de volume dans un espace donné. Il a été estimé que le territoire d'un seul astrocyte représente chez le rat un volume de  $66\ 000\ \mu\text{m}^3$  (Bushong et al., 2002). Ainsi, un astrocyte peut établir des connections avec le plus grand nombre de vaisseaux sanguins, de neurones et de synapses présents dans son domaine anatomique (**Figure 19**). Chez le rat, la densité synaptique au sein du cortex est d'environ 1 397 millions de synapses aux  $\text{mm}^3$



**Figure 19 : Illustration d'un syncytium astrocytaire.** Les astrocytes sont organisés en rangées le long des vaisseaux, qui sont généralement positionnés dans l'interface étroite entre les astrocytes. Ce schéma est basé sur une section corticale de rat immunomarcuée pour la GFAP (bleu). Les territoires astrocytaires sont arbitrairement délimités, démontrant que les processus positifs à la GFAP ne remplissent que le centre de chaque territoire. Les vaisseaux sanguins sont représentés en rouge (Nedergaard et al., 2003).

(DeFelipe et al., 2002). Par conséquent, un unique astrocyte peut établir sur son domaine, des interactions avec plus 100-140 000 synapses.

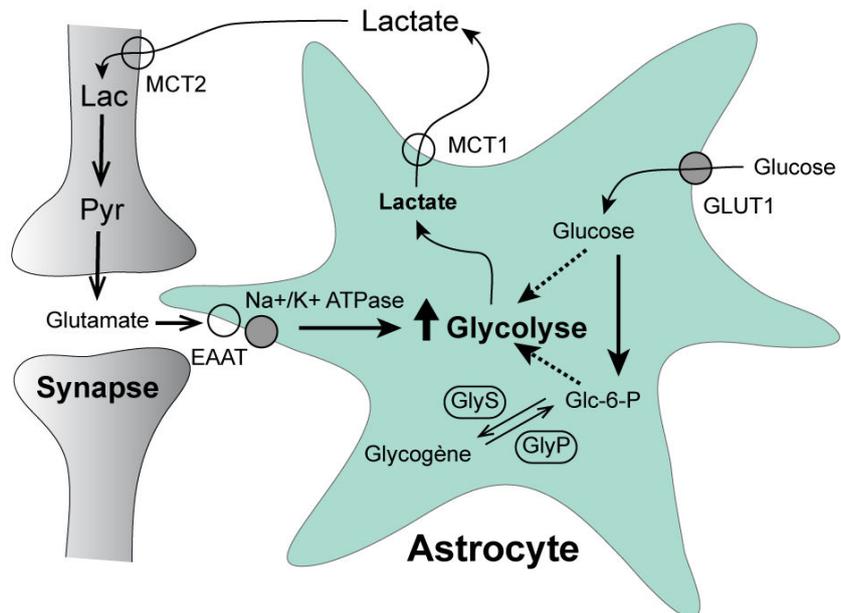
Ce territoire astrocytaire est décrit comme étant exclusif et non chevauchant. En effet, chaque astrocyte est défini grâce son architecture, son domaine propre d'action au sein du neuropile, n'envahissant que très peu celui des astrocytes attenants. La partie du territoire chevauchant celui de l'astrocyte voisin, n'excède pas les 5% de la surface totale du domaine astrocytaire. Dans cette surface, les parties distales de l'astrocyte s'interdigitent avec celles des astrocytes voisins, consolidant la structure tissulaire nerveuse (Nedergaard et al., 2003) (**Figure 19**).

Le couplage des astrocytes entre eux permet la formation d'un réseau astrocytaire, appelé syncytium. Ce couplage est réalisé par la formation de jonctions communicantes de type gap avec la partie membranaire des extrémités distales des astrocytes composant le syncytium. Une jonction gap est formée par l'apposition de deux hexamères de molécules de connexines (formant ce que l'on appelle un connexon) insérées dans la membrane plasmique de la cellule voisine. Ces jonctions intercellulaires présentes dans tous les tissus de vertébrés constituent une voie de communication directe entre les cytoplasmes de deux astrocytes adjacents. Elles permettent la diffusion de petites molécules (inférieures à 1-1,2 kDa), tel que des acides aminés, des métabolites, des messagers secondaires mais également des ions  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  ou  $Na^+$  (Giaume, 2010; Giaume and Naus, 2013). Dans le SNC, la plus forte expression de connexine se trouve dans les cellules gliales, en particulier chez les astrocytes. Une expression continue de ces protéines est observée depuis le stade embryonnaire jusqu'à l'âge adulte. Il a été estimé qu'en moyenne un seul astrocyte pouvait arborer le long de sa membrane plasmique plus de 30 000 jonctions de type gap (Nagy and Rash, 2003; Wolburg and Rohlmann, 1995). Les connexines surexprimées par les astrocytes sont majoritairement les Cx43 et Cx30 (Giaume, 2010).

Mais le concept de syncytium est beaucoup plus large que le seul fait d'un réseau d'astrocytes reliés entre eux. En effet, de récentes études montrent plutôt l'existence d'un réseau « pan-glial » syncytium dans lequel sont intégrés les oligodendrocytes et les épendymocytes (Verkhatsky and Butt, 2013).

### 3. Métabolisme énergétique

Bien que représentant seulement 2% du poids total du corps humain, le SNC consomme plus de 25% du glucose circulant dans le sang et pratiquement 20% de l'oxygène disponible dans le corps à l'état normal (Pellerin, 2010). Ces chiffres permettent de mesurer l'importance

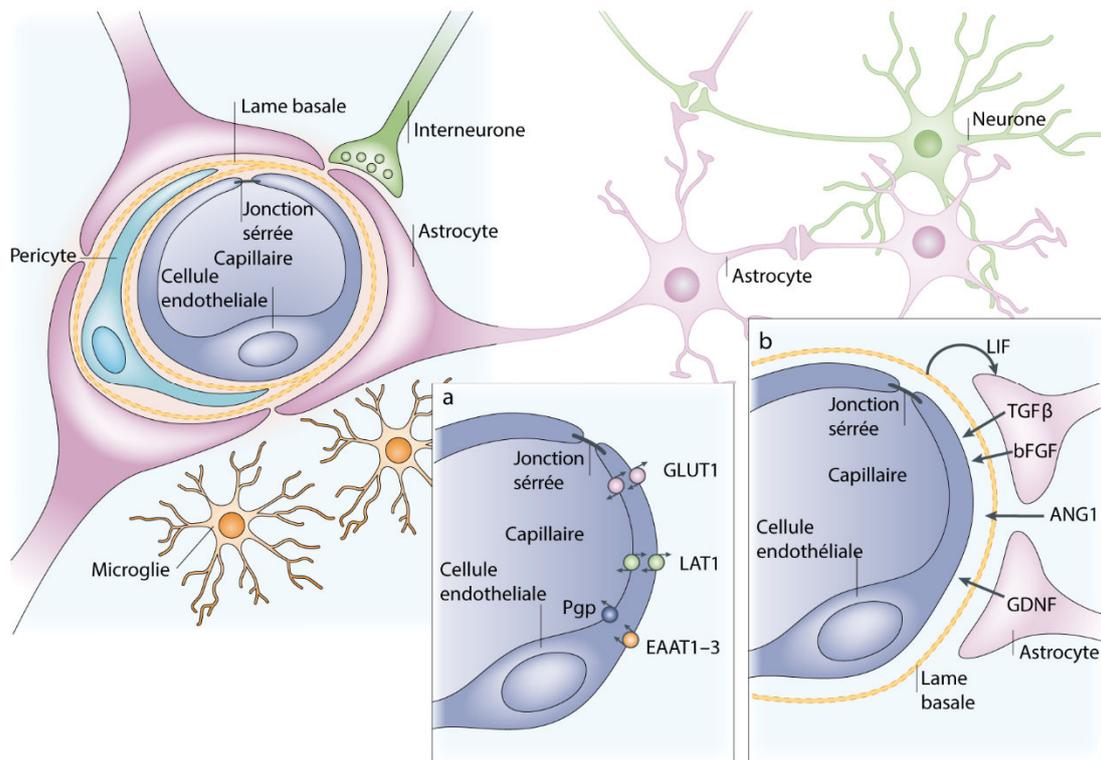


**Figure 20 : Mécanisme de transformation du glucose par les astrocytes.** Le glucose libre est absorbé par les astrocytes via leurs transporteurs GLUT1 où il est converti en glucose-6-phosphate (Glc-6-P). Le Glc-6-P est ensuite transformé en glycogène par la glycogène synthase (GlyS), puis stocké par les astrocytes. Lors d'une plus grande demande énergétique, le mécanisme de glycogénolyse permet la production de Glc-6-P par l'intermédiaire du glycogène phosphorylase (GlyP) pour la glycolyse. La transmission synaptique induit la glycolyse astrocytaire et donc la production de lactate par absorption du glutamate présent dans la fente synaptique par les récepteurs EAAT. Ceci augmente la consommation de glucose et/ou la dégradation du glycogène dans les astrocytes. Le lactate produit par les astrocytes est transporté dans l'espace extracellulaire par le MCT1 (transporteur au monocarboxylate) et absorbé par les neurones par le MCT2. Les neurones peuvent convertir le lactate (Lac) en pyruvate (Pyr) par phosphorylation oxydative (Stobart and Anderson, 2013).

de l'approvisionnement énergétique du SNC pour maintenir ses fonctions. Il est maintenant bien établi que les astrocytes transforment le glucose circulant contenu dans la circulation sanguine et alimentent ainsi le SNC en énergie (Stobart and Anderson, 2013). En effet, les astrocytes se trouvent à l'interface entre les vaisseaux sanguins parcourant le système nerveux et les neurones. Le glucose circulant traverse la barrière hématoencéphalique par le biais de transporteurs de glucose (GLUT) exprimés par les cellules endothéliales constituant les vaisseaux sanguins (Stobart and Anderson, 2013) (**Figure 20**). Ainsi les pieds astrocytaires, qui recouvrent environ 99% de la surface des vaisseaux sanguins nerveux, recapturent le glucose présent dans l'espace extracellulaire via ces transporteurs GLUT, plus précisément avec l'isoforme de GLUT1 (45KDa) (Morgello et al., 1995). Les astrocytes transforment ensuite le glucose en pyruvate, puis en lactate par le phénomène de glycosylation avant de le libérer dans l'espace extracellulaire entourant les neurones par le biais de son transporteur du lactate MCT1 (*monocarboxylate transporter 1*). Ce même lactate est ensuite capturé par les neurones grâce à leurs transporteurs du lactate MCT2 (*monocarboxylate transporter 2*). Ce mécanisme de transport par navette du lactate s'appelle l'ANLS, pour « *Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle* » (Pellerin and Magistretti, 1994). Le pyruvate va ensuite être transformé en adénosine triphosphate (ATP) par les différentes réactions du cycle de Krebs afin de fournir un substrat énergétique pour toutes les fonctions neuronales (Pellerin, 2010; Tsacopoulos and Magistretti, 1996). Bien que les neurones aient la capacité de glycosyler eux-mêmes le glucose, il a été démontré que les neurones utilisent préférentiellement le lactate comme principal substrat énergétique et ce, malgré la présence de glucose (Bouzier-Sore et al., 2006; Bouzier-Sore et al., 2003). Ceci fut un grand changement dans la vision du métabolisme énergétique cérébral. En effet, pendant longtemps ce métabolisme a été considéré comme étant essentiellement aérobie, ayant le glucose comme principal substrat et le lactate comme principal déchet métabolique. Il s'avère être en réalité un système anaérobie reposant sur une communication étroite entre les astrocytes et les neurones. Ce mécanisme est fortement dépendant de l'activité synaptique. En effet, lors d'une activité synaptique importante, les astrocytes absorbent le glutamate (Glu) qui s'accumule dans la fente synaptique par le biais de leurs récepteurs au glutamate EAAT (*Excitatory Amino Acid Transporter*). Ceci a pour conséquence de déclencher la glycolyse chez les astrocytes et donc en retour, l'approvisionnement en lactate pour les neurones (**Figure 20**).

#### 4. Formation de la barrière hémato-encéphalique

Le SNC est séparé du reste du corps par un système de barrières jouant un rôle important dans l'homéostasie nerveuse centrale par l'acceptation et la régulation de certains échanges

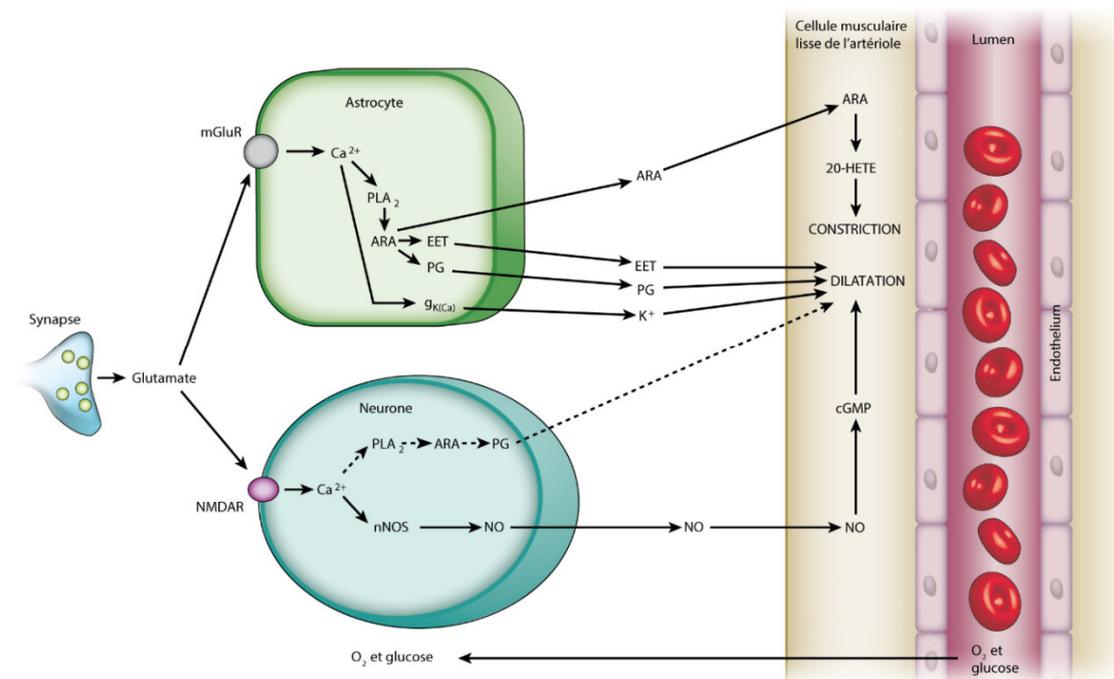


**Figure 21 : Formation de la barrière hémato-médullaire par les astrocytes.** Cette barrière est formée par les cellules endothéliales des capillaires sanguins, entourées par la lame basale, les péricytes et par les pieds astrocytaires. (A) Illustration des différents récepteurs et transporteurs exprimés par les cellules endothéliales participant à la barrière hémato-médullaire. (B) Illustration des différents facteurs gliaux sécrétés par les astrocytes agissant sur le phénotype de la barrière hémato-médullaire (Ben Haim and Rowitch, 2017).

moléculaires entre le sang et le tissu nerveux. L'une de ces barrières dans laquelle les astrocytes interviennent est appelée la barrière hémato-encéphalique (BBB pour *blood-brain barrier*). La BBB permet la séparation des vaisseaux du système vasculaire et du parenchyme nerveux au niveau du cerveau et de la moelle spinale. Les nutriments indispensables tels que le glucose ou les acides aminés, passent dans le SNC à travers cette barrière. C'est également par cette voie que sont évacués dans la circulation sanguine l'ensemble des composés toxiques ainsi que tous les déchets métaboliques produits, afin d'être décomposés.

Au niveau des vaisseaux intracérébraux, le sang circule dans un conduit formé par la juxtaposition de cellules endothéliales maintenues ensemble par un système complexe de jonctions serrées. Le but de cette barrière physique est de forcer le passage de la majorité des molécules par une voie transcellulaire plutôt que paracellulaire. Le système de jonctions serrées est une structure moléculaire complexe faisant appel à plusieurs types de protéines telles que : les molécules d'adhésion JAM (*Junctional Adhesion Molecule*) qui participent à la formation et à la maintenance des jonctions serrées, les occludines et les claudines qui permettent la régulation des jonctions au niveau de l'espace intercellulaire (Abbott et al., 2006; Bartanusz et al., 2011). Les cellules endothéliales sont entourées par les longs prolongements circonférentiels et cytoplasmiques de type péricytes. Ces cellules sont en étroite relation avec les cellules endothéliales avec lesquelles elles communiquent par le biais de jonctions communicantes et des facteurs solubles. Le rôle des péricytes constituant les capillaires médullaires, est de réguler de manière significative la prolifération, la différenciation et la migration des cellules endothéliales. En harmonie avec les astrocytes, ils contribuent au phénotype non fenestré spécifique des capillaires cérébraux et médullaires (**Figure 21**) (Abbott et al., 2010; Abbott et al., 2006; Bartanusz et al., 2011).

En effet, les astrocytes, avec leurs pieds recouvrant en grande partie la totalité de la surface des vaisseaux sanguins intracérébraux, participent à la formation de la BBB. La principale fonction des astrocytes, en plus de participer à la structuration de la BBB, est de maintenir son phénotype. Il a été démontré que l'induction et la maintenance des nombreuses fonctions de la BBB, tel que la formation des jonctions serrées, la polarisation des transporteurs membranaires chez les cellules endothéliales, étaient dépendantes d'une association étroite avec les astrocytes. *In vitro*, des études montrent que le milieu conditionné d'astrocytes induit la formation de jonctions serrées chez des cellules endothéliales cérébrales et que les astrocytes sont indispensables au bon assemblage tubulaire des cellules endothéliales et des péricytes (Ramsauer et al., 2002; Wolburg et al., 2009). Les astrocytes sont capables de sécréter une



**Figure 22 : Mécanismes moléculaires de régulation du flux sanguin par le glutamate.** Le glutamate relargué dans la fente synaptique permet la régulation du flux sanguin par les messagers produits par les astrocytes et les neurones aux cellules musculaires lisses composant les artérioles. NMDAR (récepteur à l'acide N-méthyl-D-aspartique), mGluR (récepteur métabotrope au glutamate), PLA<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub>), ARA (acide arachidonique), EET (acide epoxyeicosatriénoïque), PG (prostaglandine), NO (oxyde nitrique), nNOS (oxyde nitrique synthase), 20-HETE (acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque), cGMP (guanosine monophosphate cyclique) (Attwell et al., 2010).

gamme de facteurs gliaux qui vont agir sur le phénotype (angiogenèse ou formation de jonctions serrées) de la BBB, tel que : le facteur de croissance transformant  $\beta$ , TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor*  $\beta$ ) ; le facteur neurotrophe dérivé de la glie, GDNF (*glial-derived neurotrophic factor*) ; le facteur de croissance des fibroblastes 2, bFGF (*basic fibroblastic growth factor*) et l'angiopoïétine 1 (ANG1) (Lee et al., 2003). Inversement, les cellules endothéliales promeuvent la différenciation des astrocytes par la sécrétion du facteur d'inhibition de la leucémie LIF (*Leukemia inhibitory factor*) (Mi et al., 2001).

### 5. Régulation du flux sanguin

Une augmentation de l'activité nerveuse est généralement liée à une augmentation du flux sanguin, tout comme une stimulation localisée des neurones entraîne une augmentation du diamètre des vaisseaux locaux. Ce phénomène appelé *hyperhémie* fut décrit par Sherrington en 1890 (Roy and Sherrington, 1890). Les astrocytes ont la particularité d'être en contact avec les vaisseaux sanguins présents dans leur domaine par le biais de leur pied astrocytaire. Les astrocytes réguleraient ainsi le flux sanguin afin d'augmenter l'apport en oxygène et en glucose selon l'activité neurale (Verkhatsky et al., 2012). Des études ont également mis en évidence que les astrocytes, tout comme les neurones, produisaient et sécrétaient différents types de substances vasoactives. Ainsi au sein du SNC, le flux sanguin est régulé par l'activité synaptique qui entraîne une augmentation de la concentration interne en  $\text{Ca}^{2+}$  chez les astrocytes et les neurones interconnectés. Ces influx calciques se propageraient jusqu'au niveau des pieds astrocytaires en contact avec les vaisseaux, mais également parmi les autres astrocytes du syncytium, pour déclencher la synthèse de médiateur pro-vasodilatateur ou pro-vasoconstricteur (**Figure 22**) (Attwell et al., 2010). En effet, l'équipe Attwell *et al* montre que le glutamate relargué dans la fente synaptique déclenche un signal calcique intracellulaire en se fixant sur les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR, *metabotropic glutamate receptors*). Ceci a pour conséquence d'activer la production d'acide arachidonique (ARA) et de ses différents métabolites via la phospholipase A2 (PLA2). Les prostaglandines (PGs) et l'acide epoxyeicosatriénoïque (EET, *epoxyeicosatrienoic acid*) produits par les astrocytes, permettent une vasodilatation des vaisseaux. L'acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque (20-HETE, *20-hydroxy-eicosatetraenoic acid*) produit à partir de l'ARA par les cellules musculaires lisses entourant les vaisseaux, provoque une vasoconstriction. Ces travaux suggèrent également que le signal calcique déclenche, aux niveaux des pieds astrocytaires, une libération d'ions potassium  $\text{K}^+$ , connus pour leur effet vasodilatateur. Au niveau de neurones, le glutamate entraîne également un signal calcique, mais en se fixant aux récepteurs NMDAs (acide N-méthyl-D-aspartique).

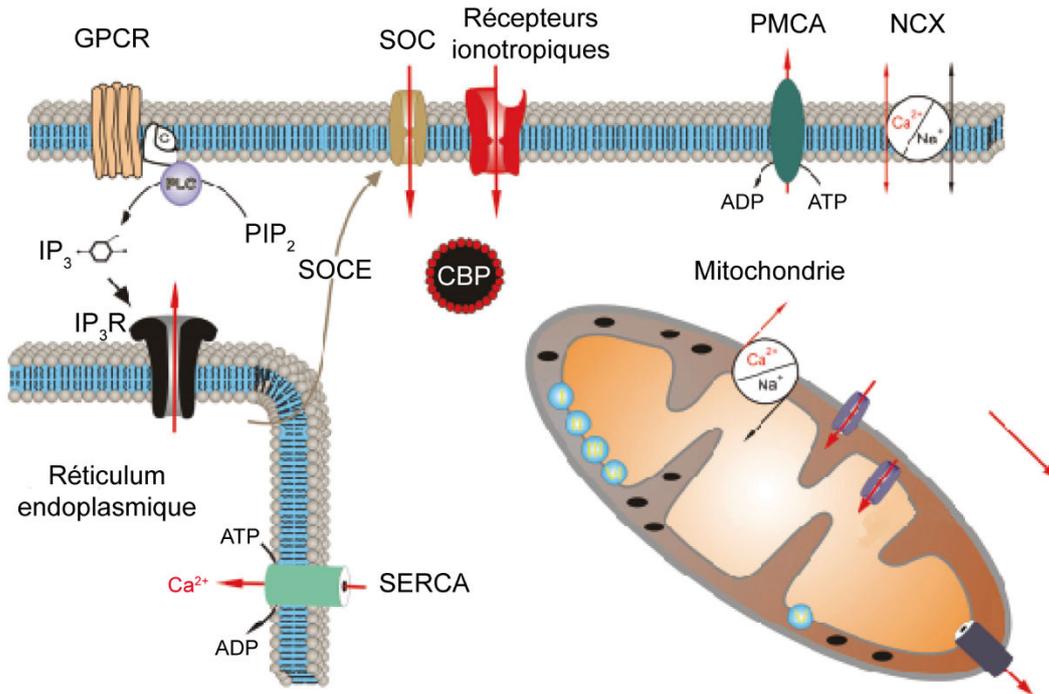


Ce signal calcique a pour effet de déclencher la production de monoxyde d'azote (NO, *Nitric oxide*) par l'oxyde nitrique synthase (nNOS) ainsi que de l'ARA. Le NO va ensuite entraîner la production de guanosine monophosphate cyclique (cGMP, *cyclic guanosine monophosphate*) par les guanylates cyclases chez les cellules musculaires lisses, qui va agir comme vasodilatateur (Attwell et al., 2010). Ces phénomènes ont été confirmés chez l'Homme par l'imagerie à résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) au niveau du cortex visuel (Schummers et al., 2008; Sofroniew and Vinters, 2010).

### 6. Signalisation calcique et synapse tripartite

Bien qu'ils arborent de nombreux canaux ioniques potassium  $K^+$  et sodium  $Na^+$ , les astrocytes sont incapables de générer un potentiel d'action similaire à celui observé chez les neurones. C'est pour cette raison que depuis de nombreuses années, les astrocytes étaient considérés comme des cellules passives. De nombreuses études tentèrent en vain, de prouver une quelconque excitabilité électrique chez les astrocytes.

Cependant, les nombreuses jonctions communicantes reliant les astrocytes semblent créer un syncytium électrique qui permet aux charges électriques de se répartir de façon stable. La forte présence de canaux potassium  $K^+$  est également responsable de la non-exigibilité électrique des astrocytes (Ransom and Sontheimer, 1992). Depuis une trentaine d'années, cette vision est devenue peu à peu obsolète. En effet, il a été démontré que les astrocytes, à défaut d'être électriquement stimulables, le sont chimiquement (Koizumi et al., 2005). Par conséquent, les astrocytes sont doués d'un système de communication différent, basé sur les variations intracellulaires de la concentration en ions  $Ca^{2+}$ . Le calcium intracellulaire est impliqué dans une variété de rôles physiologiques chez le neurone, comme le contrôle de l'excitabilité neurale (émission et régulation du potentiel d'action), la libération de neurotransmetteurs ou dans les phénomènes de plasticités synaptiques. En 1990, Cornell-Bell et ses collègues constatèrent un effet du glutamate sur des astrocytes en culture qui se manifestait par une élévation de la concentration cytosolique en ion  $Ca^{2+}$ . Ce phénomène, décrit comme une signalisation calcique, peut également se propager aux astrocytes voisins comme une vague (Cornell-Bell et al., 1990). Des analyses complémentaires révélèrent que cette signalisation calcique pouvait se présenter sous deux formes ; une oscillation, qui est une augmentation répétitive de la concentration en  $Ca^{2+}$  et une vague, qui est une propagation radiale de l'élévation de la concentration en  $Ca^{2+}$  d'une cellule donnée à ses cellules voisines (Berridge et al., 1998). Ce mécanisme de



**Figure 23 : Principales sources calciques au sein des astrocytes.** Les astrocytes ont accès à deux sources de calcium, une source extracellulaire et une source intracellulaire. Le flux de calcium est symbolisé par des flèches rouge. SERCA (*Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPases*), GPCR (*G-protein coupled receptor*), SOC (*stored-operated channels*), NCX (*sodium-calcium exchanger*), CBP (*Ca<sup>2+</sup>-binding protein*), SOCE (*store-operated Ca<sup>2+</sup> entry*), IP<sub>3</sub> (inositol triphosphate), PIP<sub>2</sub> (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) (Verkhatsky et al., 2012).

communication cellulaire est rendu possible par la capacité des astrocytes à stocker et mobiliser les ions calcium.

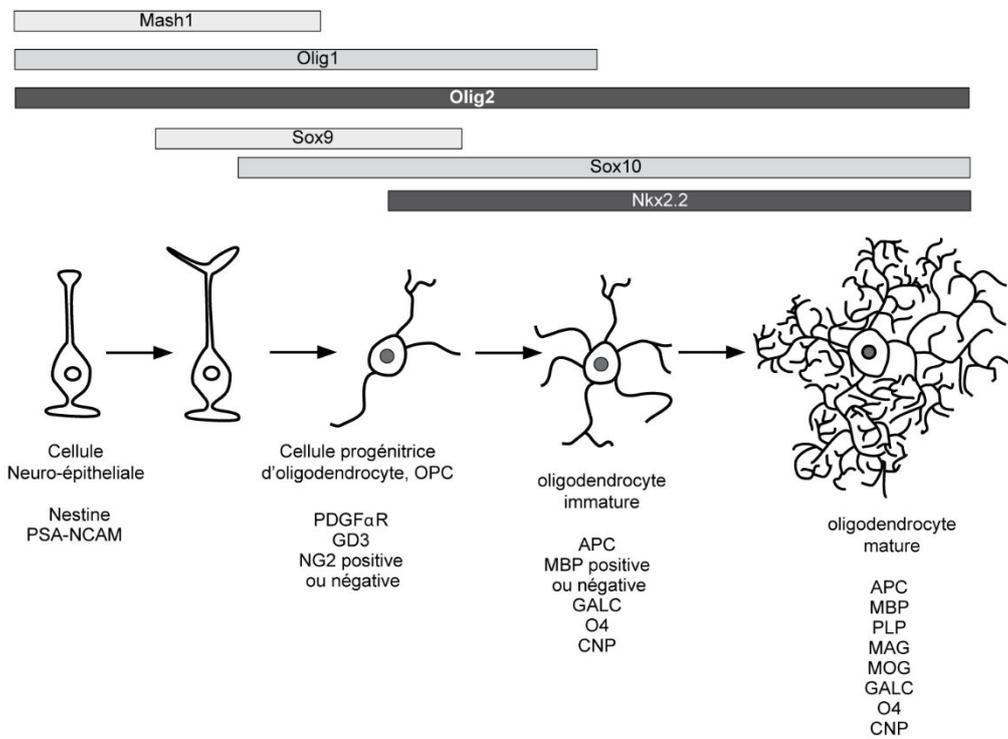
De manière générale, les astrocytes ont accès à deux sources de calcium (**Figure 23**). La première est une source extracellulaire, où le  $\text{Ca}^{2+}$  rentre dans la cellule par l'intermédiaire des récepteurs ionotropiques (tels que le récepteur au glutamate NMDA, *N-methyl-D-aspartate*; l'AMPA,  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* ou les récepteurs purinergiques P2X), et des canaux calciques de type SOC (*store-operated channels*) (Leybaert and Sanderson, 2012; Verkhratsky et al., 2012). De plus, sous certaines conditions, le système d'échangeur sodium/calcium NCX (*sodium-calcium exchanger*) peut faire entrer des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme (Rusakov, 2015). La seconde source est au niveau intracellulaire et est contenue au niveau des réticulums endoplasmiques (RE). La mitochondrie est également une source de calcium (Verkhratsky et al., 2012). Cette élévation de la concentration peut être une oscillation intrinsèque spontanée en l'absence d'activité synaptique ou peut être déclenchée par le biais de neurotransmetteurs durant une activité synaptique. Le contrôle de la voie calcique astrocytaire par une activité synaptique est dû à l'expression par les astrocytes, d'une grande variété de neurorécepteurs fonctionnels couplés à une protéine G (récepteurs GPCR, *G protein-coupled Receptor*), qui sont pour la grande majorité des récepteurs de types métabotropiques. L'activation de ces récepteurs déclenche l'hydrolyse de phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) en inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) par l'enzyme phospholipase C beta ( $\text{PLC}\beta$ ). L' $\text{IP}_3$  va alors se fixer sur les récepteurs à l'inositol triphosphate ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) présents à la surface du RE. Ceci va entraîner la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme et ainsi augmenter sa concentration. La première libération de  $\text{Ca}^{2+}$  va déclencher localement un mécanisme de rétrocontrôle positif appelé *Calcium Induced Calcium Release* (CICR, libération du calcium induite par le calcium) qui va pleinement activer l'ensemble des canaux des  $\text{IP}_3\text{Rs}$  et ainsi augmenter la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Leybaert and Sanderson, 2012). Cependant, lorsque la concentration interne en calcium atteint un certain seuil, l'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  devient négatif et entraîne l'inhibition des  $\text{IP}_3\text{Rs}$  conduisant à la fermeture de leurs canaux et à l'arrêt du passage des ions calcium dans le cytoplasme. En fin de réaction, la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire retrouve son niveau basal par sa réintégration au sein du RE par l'intermédiaire des pompes de type SERCA (*Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases*). Ce même mécanisme s'opère également au niveau membranaire avec les actions de l'échangeur NCX, mais aussi avec la pompe à calcium PMCA (*plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase*) qui vont extruder le  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique au niveau de l'espace extracellulaire (Verkhratsky et al., 2012).



Dès le début, Cornell-Bell et ses collègues constatèrent également qu'une stimulation locale de la concentration en calcium par le glutamate était capable de se propager à l'ensemble de la culture d'astrocytes (Cornell-Bell et al., 1990). De nombreuses études vinrent confirmer ces effets de propagation du  $\text{Ca}^{2+}$  sous forme de vague calcique au sein d'un syncytium astrocytaire (Charles, 1998; Kuga et al., 2011). A l'heure actuelle, deux théories sur l'explication de la propagation des vagues calciques dans un réseau astrocytaire s'affrontent. La première théorie est celle d'une propagation de la vague calcique médiée par les jonctions communicantes de type gap. En effet, l' $\text{IP}_3$  se diffuserait de cytosol à cytosol aux travers de jonctions gap et déclencherait ainsi une élévation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire en se fixant à son récepteur sur le RE. Cette hypothèse tient au fait qu'une inhibition des jonctions gap *in vitro* chez les astrocytes entrave toute propagation d'une vague calcique (Venance et al., 1997) et que la transfection de cellules tumorales gliales C6, dépourvues de jonctions gap par un ADNc codant pour la Cx46 ou Cx32, restaure la propagation des vagues calciques au sein d'une même colonie (Charles et al., 1992). Cette théorie fut renforcée par le fait que l'injection d' $\text{IP}_3$  dans le cytoplasme d'un astrocyte est suffisante pour déclencher une élévation de son calcium intracellulaire et également celui des astrocytes distants du premier par la présence des jonctions communicantes (Leybaert et al., 1998). Cependant, cette théorie fut plus tard contredite par l'observation de la propagation *in vitro* d'une vague calcique chez des astrocytes dépourvus de tout contact physique entre eux (Charles, 1998; Hassinger et al., 1996). Ceci suggère l'existence d'un composant extracellulaire qui permet la transmission de la signalisation calcique intracellulaire.

L'ATP fut par la suite identifié comme étant le messager secondaire de la voie calcique chez les astrocytes, tout comme il fut identifié chez les hépatocytes, les cardiomyocytes ou les ostéoblastes (Arcuino et al., 2002). C'est ainsi qu'une seconde théorie fut établie selon laquelle, un second messager (l'ATP) est relargué dans le milieu extracellulaire par un astrocyte subissant une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire par l' $\text{IP}_3$ . Ce messager ATP active ensuite les autres astrocytes en fixant sur les récepteurs GPCRs (de la famille des purinorecepteurs P2Y) et déclenchant ainsi une augmentation d' $\text{IP}_3$  cytoplasmique. Sous certaines conditions, ces deux mécanismes peuvent se combiner, augmentant la distance de propagation de la vague calcique au sein du réseau astrocytaire.

Au sein d'un syncytium, les astrocytes sont en contact étroit avec la membrane des neurones, plus précisément avec leurs régions synaptiques. Dans certain cas, la membrane astrocytaire enveloppe partiellement ou complètement certaines synapses. A titre d'exemple,



**Figure 24 : Schématisation des différents stades de maturation des oligodendrocytes.** Pour chaque étape de maturation, les oligodendrocytes sont identifiables par les marqueurs spécifiques mentionnés en dessous. Pour chaque étape de maturation, les oligodendrocytes sont sous la dépendance des facteurs de transcription décrits au dessus (Verkhatsky and Butt, 2013).

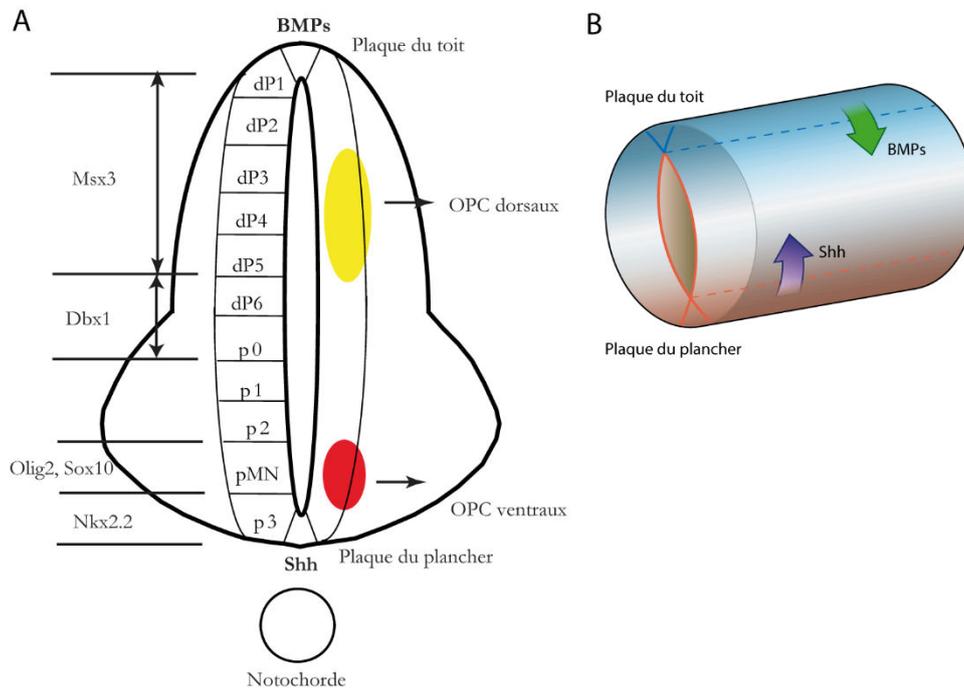
dans l'hypothalamus, environ 60% des éléments pré- et post-synaptiques sont enveloppés par des astrocytes.

### IV. Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont une autre catégorie de cellules gliales du SNC. Tout comme les cellules de Schwann (CS) dans le système nerveux périphérique, les oligodendrocytes ont pour principale fonction de fournir un support et une isolation électrique aux neurones du SNC. Ces cellules furent décrites en 1921 par le neuroscientifique Pío del Río-Hortega grâce à sa méthode de coloration des tissus nerveux au carbonate d'argent (Boullerne, 2016; Iglesias-Rozas and Garrosa, 2012). Leur nom provient de l'association des mots grecques *oligo* (peu), *dendros* (branche, arbre) et *cytos* (cellule), que l'on pourrait traduire littéralement par « la cellule avec peu de branche ». En effet, les oligodendrocytes, contrairement aux astrocytes, arborent peu de ramifications. Leur corps cellulaire est de plus petite taille et leur cytoplasme ainsi que leur noyau présentent une grande densité (chromatine très dense). Bien qu'ils soient dépourvus de filaments intermédiaires et de glycogène, les oligodendrocytes ont la particularité de présenter de nombreux microtubules au niveau de leurs ramifications qui vont participer à leur organisation et à leur stabilité (Lunn et al., 1997).

#### 1. Oligodendrogenèse

Avant d'être pleinement fonctionnels, les oligodendrocytes doivent passer par différents stades de maturation : les cellules progénitrices d'oligodendrocytes (OPC, pour *Oligodendrocyte Precursor Cells*), les oligodendrocytes immatures ou non-myélinisants et les oligodendrocytes matures myélinisants (**Figure 24**). Ces différentes étapes dans la formation des oligodendrocytes sont contrôlées par une série de facteurs intrinsèques et extrinsèques. La production d'OPC commence dans la moelle spinale au niveau du neuroépithélium. En effet, comme pour la majorité des cellules du SNC (à l'exception de la microglie), les oligodendrocytes proviennent de domaines progéniteurs situés au niveau du neuroépithélium. Suite à la gastrulation et la spécification ectodermale, les cellules neuroépithéliales prolifèrent rapidement le long de l'axe antéro-postérieur et restent pour former la paroi des futurs ventricules du SNC. C'est dans cet épithélium que les cellules souches neurales (NSC, pour *neural stem cell*) vont pouvoir proliférer et se différencier séquentiellement en neurones et en cellules gliales radiaires. Ces dernières donneront naissance aux astrocytes, aux cellules



**Figure 25 : Représentation schématique des zones d'émergence des cellules progénitrices d'oligodendrocytes (OPC) durant le développement.** (A) Les facteurs Shh et BMP entraînent la division du tube neural en plusieurs domaines progéniteurs autour du canal central. Cette paternisation du tube neural entraîne l'expression spécifique de facteurs de transcription dans chaque domaine. En fonction de ces facteurs, deux zones représentées en rouge et en jaune donnent naissance aux deux vagues d'OPC au cours du développement (Kettenmann and Ransom, 2013). (B) Au cours du développement embryonnaire, le tube neural se divise en plusieurs domaines progéniteurs sous l'effet des gradients de concentration en facteurs solubles Shh et BMPs sécrétés depuis les deux plaques neurales (Rowitch and Kriegstein, 2010).

épendymaires ainsi qu'aux OPC, qui pourront générer, par la suite, des oligodendrocytes et des astrocytes (Goldman and Kuypers, 2015; Rowitch and Kriegstein, 2010).

La production d'OPC, qui se déroule sous forme de vagues, prend place au niveau de différentes zones spécifiques du SNC (Rowitch and Kriegstein, 2010) (Kettenmann and Ransom, 2013) (**Figure 25A**). Au 12,5<sup>ème</sup> jour (E12,5) du développement embryonnaire, une première vague d'OPC émerge depuis le neuroépithélium au niveau de la partie ventrale de la zone ventriculaire proche de la plaque neurale de la moelle spinale chez la souris. Cette région est également appelée le domaine ventral des progéniteurs des motoneurones, pMN (*motor neuron progenitor domain*). Chez l'Homme, cette première vague se déroule au même endroit au moment de la 6,5<sup>ème</sup> semaine de gestation. C'est dans cette zone qu'est formée la majorité des OPC de la moelle spinale (environ 80-85%). Cependant, une seconde zone d'émergence d'OPC a été identifiée. En effet à E15, des OPC émergent au niveau de la partie dorsale de la zone ventriculaire entre les domaines progéniteurs dP3 et dP5 (Fogarty et al., 2005; Guerout et al., 2014a; Richardson et al., 2006). Une troisième vague de production d'OPC se déclenche au moment de la naissance.

Dans le cerveau, l'oligodendrogenèse se produit de façon similaire dans trois régions distinctes : la première, au niveau de la partie ventrale de l'éminence ganglionnaire médiane à E12,5, puis une seconde vague d'OPC apparaît dans la partie latérale de l'éminence ganglionnaire à E15,5 et enfin une dernière vague survient au moment de la naissance dans la zone sous-ventriculaire (SVZ, *subventricular zone*). Durant cette phase relativement courte, les OPC sont identifiables grâce à l'expression de certains marqueurs ou gènes spécifiques, caractérisés au cours du temps. Ainsi les OPC peuvent être définis par l'expression du récepteur PDGF $\alpha$  (récepteur du PDGF), de la NG2 (*neural glial antigen 2*) et du facteur de transcription Sox10 (SRY, *Sex determining region Y-box 10*). Certains jeunes OPC expriment de manière moins spécifique l'épitope du ganglioside A2B5 (Verkhatsky and Butt, 2013).

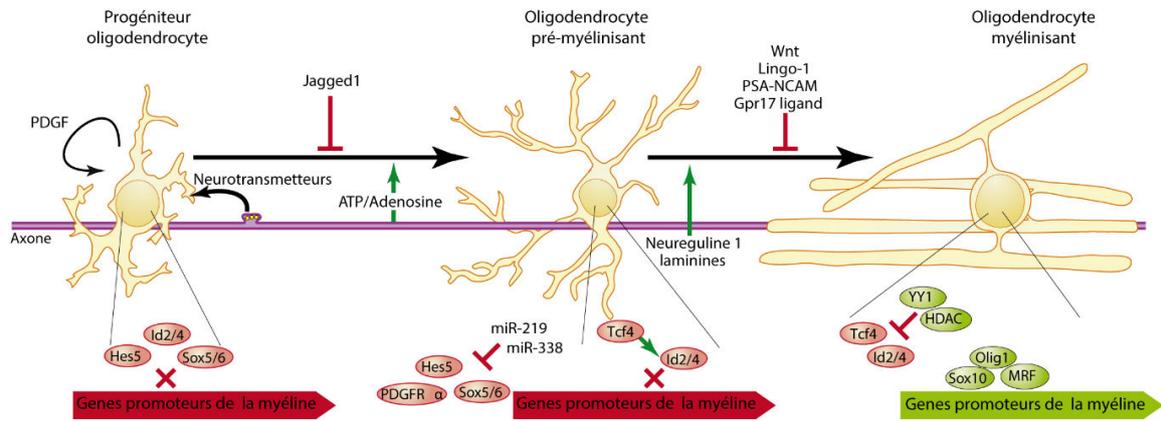
L'initiation du déclenchement des vagues de production d'OPC est étroitement liée à la présence de divers facteurs solubles produits au cours du développement dans le SNC. La protéine *Sonic hedgehog* (Shh) produite par la notochorde et la *floor-plate* (ou plaque du plancher) et les facteurs Wnt et BMP (*Bone morphogenetic protein*) provenant du *floor-plate* (plaque du toit), interviennent dans la spécification des OPC du domaine pMN. En effet, la Shh agit sous forme de gradient depuis la *floor-plate* sur la transcription de groupes de gènes spécifique d'un lignage donné par l'intermédiaire de ses médiateurs Gli (**Figure 25B**) (Briscoe and Ericson, 2001). Ceci déclenche l'expression des facteurs de transcription *Olig1* et *Olig2*



(*oligodendrocyte transcription factor*) par les progéniteurs cellulaires du domaine pMN. L'expression de ces facteurs par les NSC du domaine pMN est primordiale pour la production d'OPC (Vallstedt et al., 2005). Quant aux OPC de la seconde vague émergeant au niveau dorsal, les éléments inducteurs de leur production restent contradictoires. Il semblerait que le FGF (*fibroblast growth factor*) et la protéine BMP soient responsables de la production des OPC dorsaux, indépendamment de la Shh (Fogarty et al., 2005; Vallstedt et al., 2005; Zhu et al., 2011).

Par un mécanisme d'attraction-répulsion, les OPC nouvellement formés vont pouvoir migrer sur de grandes surfaces le long des cellules gliales radiaires et des faisceaux d'axones pour atteindre leur destination finale. Cette migration est orchestrée par l'intermédiaire de différents facteurs solubles produits par les cellules environnantes (neurones et astrocytes). A l'heure actuelle, on distingue trois grandes classes de facteurs solubles : les facteurs de croissance avec le *Platelet-derived growth factor* (PDGF), le FGF et l' *Hepatocyte growth factor* (HGF); les facteurs chimiotropes avec les nétrines et les sémaphorines et les chimiokines, tels que CXCL (*C-X-C motif ligand*) 1 ou CXCL12 (Verkhatsky and Butt, 2013). La migration des OPC n'est pas exclusivement contrôlée par ces facteurs solubles, mais aussi par des contacts avec les éléments de la matrice extracellulaire (MEC), des molécules membranaires ou par des contacts avec les extensions axonales ou astrocytaires (Bradl and Lassmann, 2010). Durant leur phase de migration, les OPC continuent de proliférer extensivement sous l'influence de facteurs solubles PDGF-A, de bFGF et des neurégulines afin d'obtenir une quantité suffisante d'oligodendrocytes pour pouvoir peupler des régions spécifiques du SNC (Miller, 2002). La prolifération locale des OPC peut être également dépendante de l'activité électrique des axones environnants par le biais de leurs neurotransmetteurs et de certains ions (Barres and Raff, 1993; Butt, 2006).

Une fois arrivée à leur destination finale, les OPC vont s'installer le long des fibres axonales et vont subir un arrêt de leur cycle cellulaire afin de déclencher le processus de différenciation vers un profil d'oligodendrocyte. Ce sont les facteurs de transcription *Yin Yang 1* (YY1) et *Sox17* qui vont réguler la transition des OPC prolifératives en pré-oligodendrocytes. Le YY1 agit directement sur les inhibiteurs spécifiques de la transcription des gènes d'expression de la myéline, à savoir le facteur de transcription 4 (TCF4) et la protéine inhibitrice de liaison à l'ADN 4 (ID4) via le recrutement de l'histone désacétylase (HDAC, *Histone deacetylase*) 1 (He et al., 2007). Au moment de la transition des OPC, l'expression du facteur de transcription *Sox17* entraîne l'inhibition de l'activité de la cycline D1 (induite par le PDGF)



**Figure 26 : Représentation schématique des étapes de maturation des oligodendrocytes et de myélinisation des axones.** Différents facteurs intrasèques et extrasèques influencent la voie de maturation des oligodendrocytes et régulent également la myélination axonale. Ces principaux facteurs inhibiteurs ou promoteurs sont représentés sur ce schéma (Emery, 2010).

et la voie de signalisation Wnt (inhibiteur de la différenciation oligodendrocytaire), par la neutralisation de la protéine *bêta*-caténine ( $\beta$ -catenin) en amont (Chew et al., 2011).

Après un arrêt de leur cycle cellulaire, ces OPC vont subir des changements morphologiques et géniques importants dans le but de myéliniser les axones environnants. Les OPC perdent leur forme bipolaire et commencent à développer de très nombreuses ramifications courtes qui leurs serviront plus tard à détecter les axones nécessitant d'être myéliniser. Durant cette transition, ces cellules commencent à exprimer de la sulfatide, (marquée spécifiquement par l'anticorps O4), le récepteur GPR17 (*Uracil nucleotide/cysteinyll leukotriene receptor*) et l'enzyme galactosylcéramidase (GalC) au détriment de l'expression du PDGFra et de NG2 (Barateiro and Fernandes, 2014; Baumann and Pham-Dinh, 2001).

La promotion de la différenciation des OPC en pré-oligodendrocytes est stimulée par différents facteurs extracellulaires et axonaux. Le facteur à *homeobox* Nkx2.2 et la protéine Mash1/Ascl1 (*Achaete-scute homologue 1*), en collaboration avec les facteurs de transcription Sox10 et Olig permettent une initiation de la phase terminale de différenciation (Kuspert et al., 2011; Wegner, 2008). Un remodelage de la chromatine par des HDAC permet également de réguler cette étape de différenciation des OPC. Une inhibition chimique des HDAC chez le rat nouveau-né a montré que cela engendrait un retard dans le processus de différenciation et de myélinisation des oligodendrocytes. De plus, la suppression génétique des HDAC1 et 2 dans la lignée oligodendrocytaire murine entraîne la disparition des OPC ainsi que des oligodendrocytes, ce qui prouve l'importance de l'activité HDAC dans le mécanisme de lignage oligodendrocytaire (Emery, 2010; Shen et al., 2005). Ces HDAC permettent la différenciation des OPC par leur action inhibitrice sur les voies de signalements et des gènes qui, inversement, empêchent cette différenciation. Ceci comprend une inhibition de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine par une action conjointe avec le facteur YY1 dans l'inhibition de l'expression des facteurs Id4 et TCF4 (**Figure 26**) (Emery, 2010; He et al., 2007).

Plus récemment, l'émergence d'études sur les micro-ARN (mi-ARN) et l'effet de l'inhibition de la protéine Dicer, ont montré que certains de ces ARN simple brin jouaient également un rôle dans la différenciation et la myélinisation des oligodendrocytes. En effet, miR-219 et miR-338 ainsi que Dicer1 furent identifiés comme étant surexprimés par les oligodendrocytes au moment de leur différenciation (**Figure 26**). Ces mi-RNA ont principalement pour cible les gènes servant à maintenir les OPC dans un état indifférencié, tel que PDGFra, Sox6 ou Hes5 (Dugas et al., 2010; Zhao et al., 2010). Ces pré-oligodendrocytes



nouvellement formés vont pouvoir ensuite devenir des oligodendrocytes matures myélinisant différents axones.

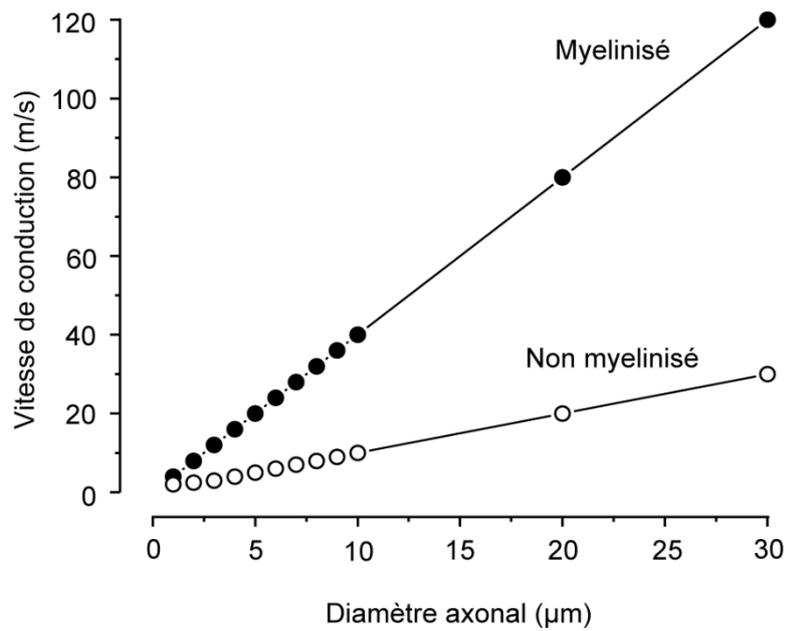
Le processus de myélinisation débute dès la naissance et s'étale sur les deux premières décennies chez l'Homme ou les deux premiers mois chez le rongeur. Il est maintenant bien établi que ce processus perdure au-delà de l'adolescence, à savoir tout au long de la vie de l'individu afin de remplacer les oligodendrocytes perdus ou de myéliniser les axones non-myélinisés (Bartzokis et al., 2012; Young et al., 2013). De plus, une petite portion d'OPC générée durant le développement reste quiescente à l'état indifférencié tout en conservant leur capacité de prolifération et de migration. Ces OPC adultes PDGFr $\alpha^+$ , NG2 qui représentent environ 5% des cellules du SNC, se répartissent dans l'ensemble de la substance grise et blanche et constituent la principale population cellulaire en constante prolifération dans le SNC sain. Ces OPC adultes participent tout au long de la vie, à l'entretien et la réparation des faisceaux d'axones et de leur gaine de myéline (Dawson et al., 2003). Des études suggèrent également que certains de ces OPC présentent des propriétés de multipotence. En effet, ces progéniteurs auraient la capacité de générer à la fois des oligodendrocytes ainsi que des neurones et des astrocytes *in vivo* et *in vitro* (Rivers et al., 2008; Zhu et al., 2008a; Zhu et al., 2008b). Cependant, ces observations restent encore controversées (Richardson et al., 2011).

La dernière étape du développement des oligodendrocytes correspond à la phase de myélinisation des axones. Cette première phase dans le processus de myélinisation consiste en la continuation du mécanisme de diminution des gènes inhibiteurs et de l'augmentation de l'expression de gènes pro-myélinisants, tel que le gène *MRF* (*myelin gene regulatory factor*) (Emery, 2010; Emery et al., 2009). Le *MRF* est exprimé par les oligodendrocytes post-mitotiques pré-myélinisants au moment de leur phase de transition. Tout comme le gène *Krox-20* dans le SNP, il contrôle la transition des oligodendrocytes non-myélinisants vers un état myélinisant par l'activation d'une cohorte de gènes spécifiques de la myéline. Son inhibition chez la souris entraîne un déficit dans la différenciation et augmente significativement le nombre d'oligodendrocytes immatures en apoptose (Emery et al., 2009; Koenning et al., 2012). Sa coopération avec Sox10 et Olig1/2 permet le déclenchement du processus de myélinisation par les oligodendrocytes immatures ainsi que son maintien.

Simultanément, les oligodendrocytes immatures nouvellement formés, utilisent leurs nombreuses ramifications riches en microfilaments pour identifier les axones environnants, nécessitant d'être myélinisés. Une fois au contact de l'axone, ces protrusions cytoplasmiques se convertissent en lamellipodes après être envahies par des microtubules (Mitew et al., 2014).



Seuls les axones d'un diamètre supérieur à 400 nm sont myélinisés par les oligodendrocytes. Le diamètre axonal est l'un des facteurs déterminant dans le choix de l'axone et dans l'initiation du processus de myélinisation. Ce mécanisme de sélection axonale demeure cependant flou. Il semble que l'activité électrique axonale, la libération de glutamate et d'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) par les neurones jouent un rôle de signal initiateur dans la myélinisation et permettraient ainsi d'expliquer le choix des oligodendrocytes pour les axones de petits calibres (Ziskin et al., 2007). De plus, la libération d'ATP consécutive à la transmission d'un potentiel d'action, déclencherait une sécrétion de LIF de la part des astrocytes, ce qui favoriserait la myélinisation (Ishibashi et al., 2006). Certaines molécules, tel que PSA-NCAM (pour *polysialyted-neural cell adhesion molecule*) ou LINGO-1 (*leucine riche repeat and immunoglobulin-like domain-containing protein 1*) présentes à la surface des axones, sont décrites comme étant des inhibiteurs de la maturation et de la myélinisation des oligodendrocytes (Bradl and Lassmann, 2010; Kiss et al., 1994; Landmesser et al., 1990; Mi et al., 2005). Au cours du développement, l'accroissement progressif de l'activité électrique au sein des faisceaux d'axones entraîne une diminution de l'expression membranaire de ces molécules qui coïncide avec le début de la myélinisation. Mis à part le diamètre et l'activité électrique de l'axone, d'autres molécules participent à l'initiation de cette myélinisation. La laminine  $\alpha 2$  produite par les axones se fixe avec le récepteur de la  $\beta 1$  intégrine exprimée à la surface des oligodendrocytes. La voie de signalisation du récepteur de  $\beta 1$  intégrine est un élément important dans le mécanisme d'extension des protrusions cytoplasmiques et dans l'établissement du contact axonal. Celle-ci permet également l'activation de la tyrosine kinase Fyn et de la FAK (*Focal Adhesion Kinase*), décrites comme participant au mécanisme de modulation des éléments du cytosquelette chez l'oligodendrocyte ainsi qu'à la régulation des voies de réponses induites par les interactions cytosquelette/MEC (Lafrenaye and Fuss, 2010; Liang et al., 2004; Mitew et al., 2014). Leur inhibition se traduit donc par différents phénotypes, tels qu'une faible proportion d'oligodendrocytes matures, une épaisseur des gaines de myéline mince et une hypomyélinisation du SNC (Camara et al., 2009; Goto et al., 2008; Hoshina et al., 2007). A ce stade de maturation, les oligodendrocytes commencent à produire de grandes quantités de protéines myéliniques, tel que la MBP (*Myelin Binding Protein*), la protéine protéolipidique de myéline (PLP, *Myelin proteolipid protein*), la glycoprotéine associée à la myéline (MAG, *Myelin-associated glycoprotein*) et l'enzyme CNP (*2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase*). Ces éléments servent également de marqueurs spécifiques des oligodendrocytes matures. Ces protéines sont des constituants essentiels de la gaine de myéline. L'ensemble des ARNm, protéines et lipides myéliniques produits pour la plupart au niveau du

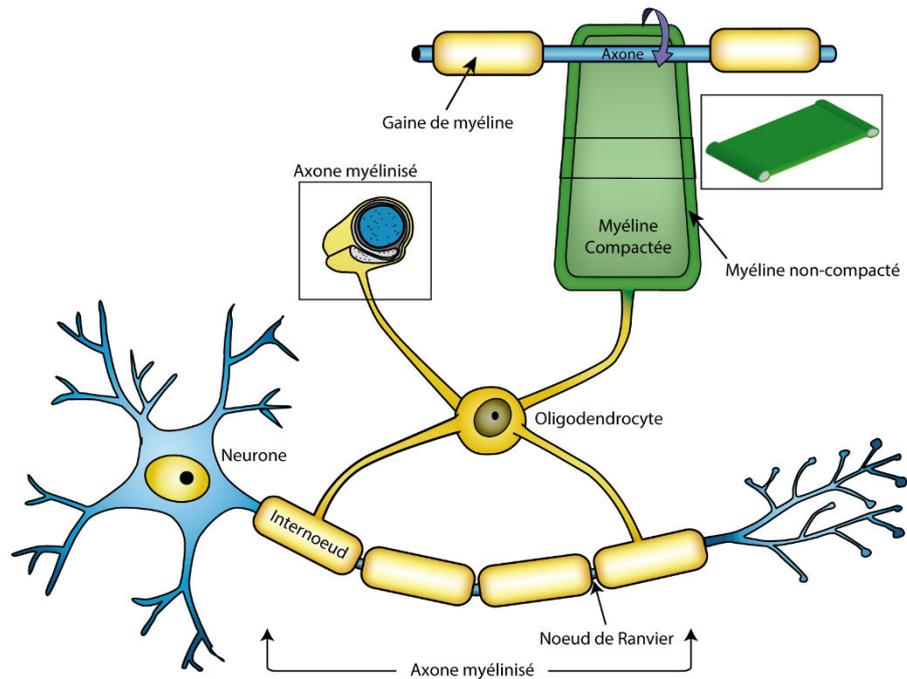


**Figure 27 : Diagramme de corrélation entre le diamètre axonal et la vitesse de conduction.** Ce diagramme compare la vitesse de conduction du signal électrique chez un neurone myélinisé et un neurone non-myélinisé (Verkhatsky and Butt, 2013).

corps cellulaire, vont ensuite migrer par un système de transport vésiculaire le long des microtubules composant les extensions cytoplasmiques pour arriver au cône de croissance où s'est établie la connexion avec l'axone et l'oligodendrocyte. Une fois au contact de l'axone, le cône de croissance va s'étendre latéralement le long de celui-ci et commencer à s'enrouler autour tout en assemblant les éléments protéiques et lipidiques de la gaine de myéline. Cela aboutit à la formation d'un internoeud (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Bradl and Lassmann, 2010; Laule et al., 2007). Les oligodendrocytes deviennent pleinement matures et commencent à exprimer un autre marqueur spécifique, la protéine MOG (*Myelin oligodendrocyte glycoprotein*), qui participe à la stabilisation de la gaine de myéline. Chaque oligodendrocyte, grâce à ses ramifications, est capable de créer jusqu'à 40 internodes différents et peut myéliniser plusieurs axones simultanément.

### 2. Myéline

Le système nerveux des vertébrés contrôle et coordonne les activités du corps depuis le cerveau par l'envoi de signaux électriques au travers de réseaux neuronaux interconnectés. La vitesse de propagation de l'influx électrique à travers ce réseau peut s'avérer être un élément déterminant dans la transmission de l'information. Par conséquent, la majorité des axones composant les fibres nerveuses du système nerveux des vertébrés sont recouvertes d'un revêtement radial grasseux intermittent, appelé myéline. Cette structure unique permet d'augmenter significativement la vitesse de propagation du potentiel d'action le long de l'axone. Ainsi, une impulsion nerveuse est capable de voyager au travers d'une fibre myélinisée à une vitesse pouvant atteindre les 100 m/s, soit 100 fois plus rapide qu'au travers d'une fibre non-myélinisée (entre 0,5-2 m/s pour certaines fibres reliant les récepteurs sensoriels de la peau ou des viscères). En plus d'une augmentation de la conduction, la gaine de myéline garantit une fidélité du signal électrique transmis sur de grande distance et également une économie d'espace par une amélioration de l'isolation. En effet, l'isolation qu'elle apporte permet la diminution des diamètres axonaux. Un axone non-myélinisé d'un diamètre de 0,2-2  $\mu\text{m}$  atteint des vitesses de conduction de l'ordre de 20 m/s, alors qu'un axone myélinisé de diamètre identique attendra les 80-120 m/s (**Figure 27**) (Verkhatsky and Butt, 2013). Ainsi, la diminution du diamètre axonal permet la compaction d'un plus grand nombre de neurones au sein d'un même faisceau nerveux.

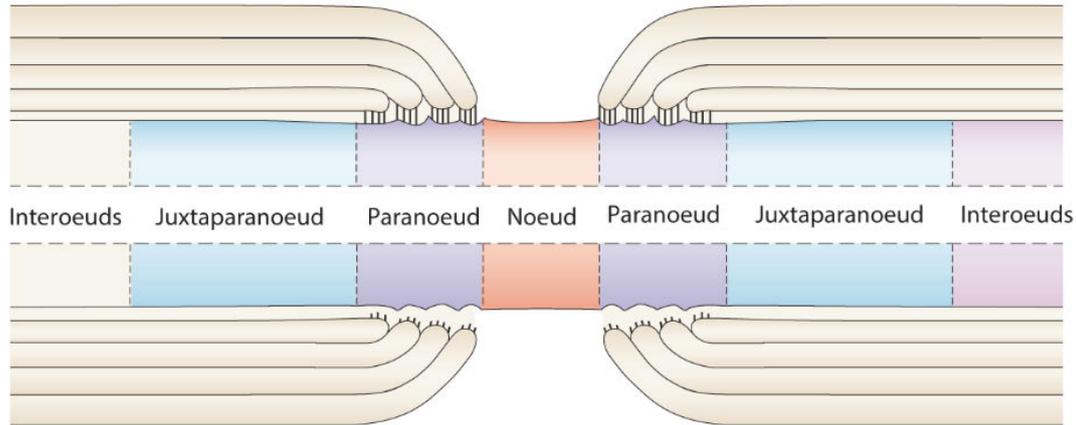


**Figure 28 : Illustration de la formation de la gaine de myéline par les oligodendrocytes.** Un axone n'est pas continuellement entouré par la gaine de myéline. Cette gaine est en fait découpée longitudinalement, en plusieurs segments myéliniques continus séparés par un espace où la surface axonale est exposée (Edgar and Griffiths, 2014).

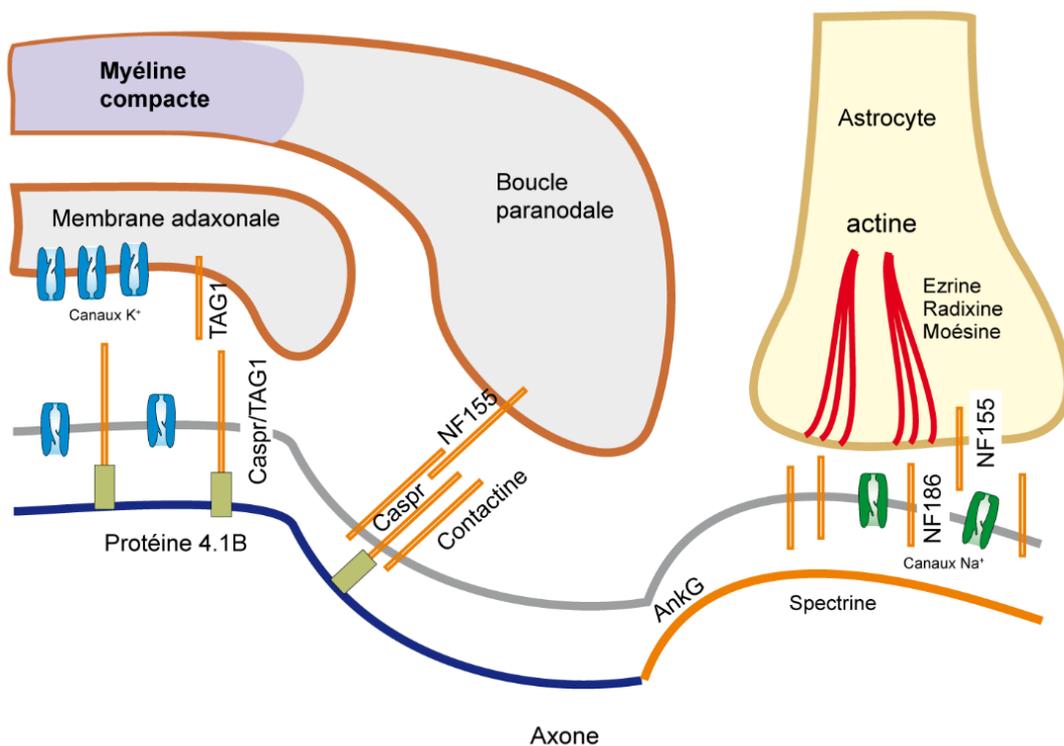
### 3. Structure myélinique

La fonction principale des oligodendrocytes, au sein du SNC, est de former une gaine isolante autour des axones comme le font les SC dans le SNP. Un oligodendrocyte est capable, sur une distance relativement courte, de myéliniser simultanément jusqu'à 30 axones différents. De plus, les oligodendrocytes peuvent également myéliniser plusieurs fois un même axone. Durant les phases intenses de myélinisation, un oligodendrocyte est capable de produire entre 5 000 mm<sup>2</sup> et 50 000 mm<sup>2</sup> de surface de gaine de myéline par jour. Un axone n'est pas continuellement entouré par la gaine de myéline. Cette gaine est en fait découpée longitudinalement, en plusieurs segments myéliniques continus séparés par un espace où la surface axonale est exposée. Cette partie non-myélinisée constitue ce que l'on appelle le nœud de Ranvier (Edgar and Griffiths, 2014) (**Figure 28**). Cette région hautement spécialisée des axones myélinisés permet de générer des potentiels d'action. Chaque segment séparant les nœuds de Ranvier sont appelés des internœuds. Un internœud est formé par une seule dendrite émanant d'un oligodendrocyte. Leur dimension peut varier de 100 à 1700 µm de long. Ces internœuds sont des enroulements successifs de la dendrite autour de l'axone, dus à un accroissement de la partie distale de sa membrane (partie la plus éloignée du corps cellulaire). Cette structure complexe se divise en plusieurs domaines spécifiques le long de l'axone. Si la gaine de myéline pouvait être déroulée, elle formerait une sorte de « feuille » ou de « langue ». La partie la plus éloignée du corps cellulaire correspond à la partie interne de la langue et constitue la partie plus proche de l'axone. La plus proche du corps cellulaire constitue la partie externe de la langue. Le cytoplasme de cette langue se divise en deux zones : une partie centrale, où la myéline est compactée et une partie extérieure, où celle-ci n'est pas compactée. Une fois enroulée, l'analyse microscopique des coupes transversales de la gaine révèle une superposition de lignes claires et de lignes foncées spécifiques. Ces lignes foncées, appelées lignes majeures denses ou périodiques correspondent à l'accolement des faces cytoplasmiques de la membrane plasmique des oligodendrocytes. Cette coloration foncée est due à l'extrusion du cytoplasme conduisant à une condensation de la myéline. Les lignes claires, appelées lignes denses mineures ou espaces intra-périodiques, situées entre les lignes denses majeures, correspondent à l'apposition des faces extracellulaires de la membrane plasmique. Elles forment un espace extracellulaire dit intra-périodique où se concentre l'eau. La périodicité de ces lignes est estimée à environ 15 nm.

Une partie de l'internœud, appelée région juxtaparanodale, est caractérisée par la présence de nombreux canaux potassiques sensibles au voltage (K<sub>v</sub>1.1 et K<sub>v</sub>1.2) sur la



**Figure 29 : Représentation schématique des différentes régions composant la gaine de myéline d'un neurone.** Ce schéma est une coupe longitudinale d'une fibre nerveuse myélinisée au niveau d'un nœud de Ranvier. Elle permet d'observer les différentes régions entourant le nœud délimité par les boucles paranodales (Poliak et al., 2003).



**Figure 30 : Interactions axo-gliales au niveau des nœuds de Ranvier.** La formation des nœuds de Ranvier le long de l'axone résulte d'interactions protéiques entre les boucles paranodales de l'oligodendrocyte et la membrane axonale. Une partie de l'internœud, appelée région juxtaparanodale, est caractérisée par la présence de nombreux canaux potassiques sensibles au voltage. L'accumulation de canaux potassique ( $K^+$ ) participe au phénomène de repolarisation et de stabilisation du potentiel d'action. Sur l'axolemme, une protéine membranaire Caspr2 (*Contactin-associated protein-like 2*) est associée à un canal  $K^+$  et forme un complexe avec une molécule d'adhésion TAG-1 (*Transient axonal glycoprotein-1*). Ce complexe conduit à la *clusterisation* des canaux ( $K^+$ ) dans la région juxtaparanodale de l'internœud (Verkhatsky and Butt, 2013).

membrane axonale sous la gaine de myéline (**Figures 29 et 30**) (Poliak et al., 2003). Cette accumulation de canaux  $K^+$  participe au phénomène de repolarisation et de stabilisation du potentiel d'action. Il a été démontré que ce regroupement de canaux  $K^+$  était induit par leur association à un complexe protéique. En effet, sur l'axolemme, une protéine membranaire Caspr2 (*Contactin-associated protein-like 2*) est associée à un canal  $K^+$  par la fixation de leur domaine PDZ respectif. Cette même protéine Caspr2 forme un complexe en *cis* avec une molécule d'adhésion TAG-1 (*Transient axonal glycoprotein-1*) exprimée sur l'axolemme qui forme un hétérodimère avec une autre TAG-1 présente sur la membrane de l'oligodendrocyte (Poliak et al., 2003; Traka et al., 2002). Ce complexe conduit à la *clusterisation* des canaux potassiques dans la région juxtapanodale de l'internœud (**Figure 30**).

A la suite de la région juxtapanodale, chacune des lames de myéline empilée se termine par une poche cytoplasmique en contact étroit avec l'axolemme. Ce sont les boucles paranodales ou boucles latérales formant la région du même nom. Ces boucles sont des épanchements de liquide cytoplasmique des oligodendrocytes contenant de la myéline non compactée. Des jonctions axones-cellules gliales, appelées bandes transversales, sont créées par la formation d'un complexe entre la protéine Neurofascine 155 kDa (NF-155), exprimée sur la membrane cytoplasmique des oligodendrocytes et les protéines axonales Contactines et Caspr (*Contactin-associated protein-like 1*) (Jackman et al., 2009; Simons and Trajkovic, 2006). Ces bandes forment des cloisons ou *septa*, qui isolent les canaux potassiques  $Kv1.1$ ,  $Kv1.2$  et  $Kv1.4$  de la région juxta-paranodale, des canaux ioniques  $Na^+$  accumulés dans les nœuds de Ranvier. Ce domaine d'ancrage entre la gaine de myéline et l'axolemme est crucial pour la propagation du potentiel d'action et de la conduction saltatoire. Les boucles paranodales sont également reliées entre-elles par l'intermédiaire de jonctions serrées ou de type Gap (**Figure 30**) (Spiegel and Peles, 2002).

Le long des fibres myélinisées, les internœuds sont séparés par une région où l'axolemme est exposé au milieu extracellulaire, ce sont les nœuds de Ranvier. Ces régions nodales jouent un rôle important dans la conduction du signal nerveux. Le potentiel d'action se propage le long de l'axone myélinisé en « sautant » d'un nœud de Ranvier à un autre, ce qui accélère la vitesse de propagation. C'est le phénomène de conduction saltatoire qui est spécifique des axones myélinisés. La propagation de ce potentiel d'action est dépendante d'une rapide dépolarisation et repolarisation de la membrane axonale. Pour cela, les nœuds de Ranvier présentent une accumulation de canaux ioniques  $K^+$  et  $Na^+$  sur la surface de l'axolemme. La région nodale contient une grande densité de canaux sodiques voltage dépendants (plus de 1000



canaux/ $\mu\text{m}^2$ ) de différents types. Par exemple, on retrouve au sein des nœuds les canaux Nav1.1, Nav1.2, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8 et Nav1.9 (Rasband and Peles, 2015). La forme prédominante est Nav1.6 et génère la phase initiale du potentiel d'action (Li et al., 2016a; Rush et al., 2007). La promotion de leur expression de surface ainsi que leur propriété biophysique sont médiées par leurs liaisons covalentes établies avec des sous-unités  $\beta$  (Brackenbury WJ 2011). Les nœuds de Ranvier contiennent également de nombreux canaux potassiques dits « rectifiant ». Ces canaux  $\text{K}^+$  diffèrent de ceux accumulés au niveau des régions juxta-paranodales. En effet, les canaux  $\text{Kv}7.2$  et  $\text{Kv}7.3$  servent principalement à stabiliser le PA. Cette accumulation de canaux au sein des régions nodales est dépendante des interactions avec différentes protéines du cytosquelette, telle que l'ankyrine G (ankG) et la spectrine  $\beta$ -IV. Ces deux protéines assurent la stabilité et l'ancrage des nombreux canaux ioniques au niveau des nœuds de Ranvier (Rasband, 2010, 2016; Rasband and Peles, 2015; Verkhratsky and Butt, 2013). Une autre protéine, l'isoforme de 186 kDa de la neurofascine (NF-186), assure la formation des nœuds de Ranvier. Son ablation entraîne *in vivo* une désorganisation des régions nodales, accompagnée d'une perte des canaux sodiques.

Dans le système nerveux des vertébrés, la myéline est principalement produite par les oligodendrocytes du SNC et par les SC du SNP. Dans le SNC, elle est présente majoritairement en abondance dans la substance blanche, ce qui confère cette coloration blanchâtre si spécifique (Baumann and Pham-Dinh, 2001). La myéline est également présente, en quantité nettement inférieure au sein de la substance grise. Il est estimé que la myéline représente environ 50% du poids total sec de la substance blanche, ce qui en fait la structure membranaire la plus abondante du système nerveux vertébré.

La myéline est une structure membranaire unique au sein de l'organisme du fait de sa composition. La myéline est une structure faiblement hydratée qui ne contient que 40% d'eau, contre 80% au niveau de la substance grise. Sa structure hautement organisée, est constituée principalement de lipides (70-80%) et de protéines (20-30%) (Jackman et al., 2009). Ce ratio lipides/ protéines est à l'inverse de celui des autres membranes biologiques de l'organisme, où le pourcentage de lipides varie de 30-50% (Norton, 1984). Les propriétés d'isolation de la myéline qui favorise la rapidité de la conduction nerveuse, sont en grande partie dûes à sa structure, son épaisseur, sa faible proportion d'eau et sa richesse lipidique (Morell and Norton, 1980; Quarles, 1997, 2002). Les constituants spécifiques de la myéline, tel que les glycolipides et les protéines, sont produits par les oligodendrocytes myélinisants. Certains de ces constituants sont également utilisés comme marqueurs spécifiques des oligodendrocytes.

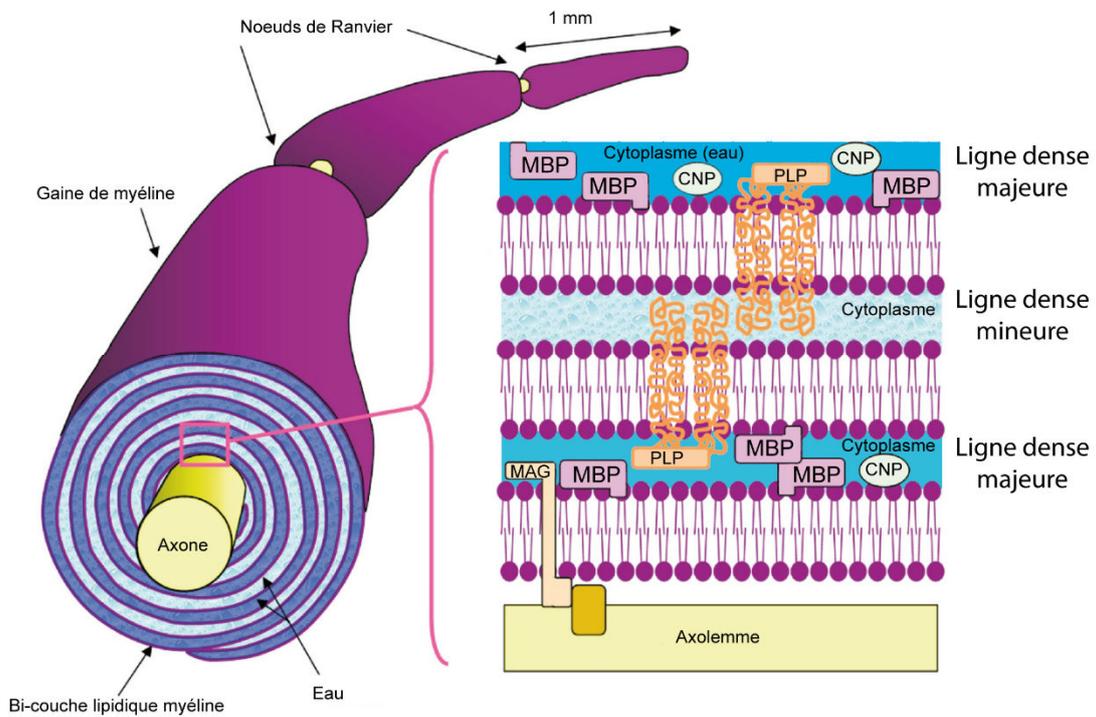


### 4. Les lipides

La plupart des lipides présents au sein du SNC sont également présents dans la myéline. A ce jour, plusieurs variétés de lipides ont été décrites comme entrant dans la composition de la structure myélinique. Sa structure est bien conservée et est semblable chez toutes les espèces de mammifères. On note seulement des différences de composition au niveau régional. En effet, chez un même individu, le ratio lipide/protéine est plus important au niveau de la moelle spinale qu'au niveau du cerveau. Mais de façon générale, la myéline est composée majoritairement de cholestérols, de phospholipides et de glycolipides.

Le cholestérol représente environ 30% des lipides composant la myéline. C'est un élément important dans l'assemblage et l'intégrité de la membrane myélinique (Ozgen et al., 2016). Par conséquent, la concentration en cholestérol (non estérifié) du SNC est la plus importante de tout l'organisme. Bien que le SNC ne représente que 2,1% du poids de corps, celui-ci contient 23% du stérol total présent dans l'organisme. Cette proportion en cholestérol synthétisé s'accroît au moment de la myélinisation. Le développement et la myélinisation des axones d'un cerveau humain entraînent un accroissement de la masse en cholestérol, passant de 400g au moment de la naissance pour atteindre les 1 400g à l'âge adulte (Dietschy and Turley, 2004). De grandes quantités en cholestérol sont essentielles pour l'accroissement de la myéline. L'absence de synthèse de cholestérol par l'oligodendrocyte entraîne d'importantes perturbations au niveau de la myélinisation, ce qui se traduit par différentes pathologies neuromusculaires (Saher et al., 2005; Saher and Simons, 2010).

La myéline contient environ 40% de phospholipides, qui rentrent principalement comme composant structurel membranaire. Ces lipides interagissent avec différentes protéines myéliniques par l'intermédiaire de leur charge négative, pour structurer la bicouche lipidique. Enfin, la myéline contient également des glycosphingolipides de la famille des glycolipides qui représentent au total 30% des lipides de la myéline. Bien qu'il n'existe pas de lipides myéline-spécifiques, les glycosphingolipides et particulièrement les galactocérobrosides ainsi que leurs dérivés sulfatés, les sulfatides, sont des éléments typiques de la myéline dans laquelle ils sont présents en quantité importante. Les galactocérobrosides, qui servent également de marqueurs des oligodendrocytes, sont spécifiques de la myéline. Leur expression est proportionnelle à la quantité de myéline présente. Ces lipides sont importants dans la formation de la jonction paranodale entre la cellule gliale et l'axone (Jackman et al., 2009). Il est estimé que le ratio molaire de ces trois variétés de lipides formant la gaine de myéline est compris dans une gamme de 4 :3 :2 à 4 :4 :2 (Jackman et al., 2009).



**Figure 31 : Représentation schématique des protéines et des lipides constituant la gaine de myéline.** La gaine de myéline entourant les axones du SNC est un enroulement d'une bi-couche lipidique composée de protéines. MBP (*Myelin binding Protein*), CNP (*2',3'-cyclic nucleotide-3-phosphodiesterase*), PLP (*Myelin protéolip protein*) (Laule et al., 2007).

### 5. Les protéines myéliniques

Contrairement aux lipides, les protéines myéliniques sont considérées comme étant plus spécifiques de la myéline et leur expression sert à l'identification spécifique des oligodendrocytes matures (Laule et al., 2007) (**Figure 31**). Une variété de protéine contribue à la formation de la gaine de myéline au sein du SNC. Ces protéines myéliniques représentent environ 30% du poids sec total de la myéline contenue dans le SNC (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Les deux principales protéines de la myéline sont la MBP et la PLP et représentent ensemble 80% des protéines myéliniques.

#### a. Myelin binding protein

La MBP constitue environ 30% des protéines myéliniques. Elle correspond à une famille de protéines formée par plusieurs isoformes qui sont exprimées spécifiquement par la lignée oligodendrocytaire au niveau du SNC. Celles-ci se localisent principalement sur la surface cytoplasmique de la myéline compactée, au niveau des lignes denses majeures, chez les oligodendrocytes (Bijlard et al., 2015). Des études chez la souris *shiverer*, dépourvue du gène codant pour la MBP, ont montré des anomalies dans les mécanismes de compaction de la myéline et dans la formation des lignes denses majeures par les oligodendrocytes. Ceci met en exergue le rôle important des protéines MBP dans le phénomène de compaction de la myéline durant la phase de maturation de la gaine (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Campagnoni et al., 1984). De plus, les MBP sont considérées comme des molécules adhésives jouant un rôle de structure. Elles se fixent aux lipides de la surface cytosolique des oligodendrocytes par une interaction électrostatique avec leurs charges négatives (Boggs, 2006). Les MBP agissent également comme un squelette protéique au sein de la myéline par leur fixation aux filaments d'actine contenus dans la bicouche lipidique (Boggs and Wang, 2004). Toutes ces interactions conduisent à la compaction de la myéline et par conséquent à la formation des lignes denses majeures par les MBP. A l'inverse des autres protéines myéliniques, les MBP ne sont pas synthétisées au niveau du corps cellulaire des oligodendrocytes. Les ARNm codant pour les MBP sont envoyés directement au niveau de la membrane myélinique pour y être directement traduit en protéine MBP. Cette synthèse locale de MBP permet un contrôle du processus de fusion membranaire impliqué dans le phénomène de compaction de la myéline chez les oligodendrocytes (Laursen et al., 2011).



### **b. Myelin proteolipid protein**

La seconde protéine la plus exprimée dans la myéline du SNC est la PLP. Elle est la famille de protéine la plus abondante de la myéline car elle représente, avec ces deux isoformes, (PLP (25kDa) et DM20 (20kDa)) environ 50% des protéines présentes. Ces protéines sont très largement conservées au sein des mammifères et partagent des homologies de séquences allant jusqu'à 100% entre la souris et l'Homme (Macklin et al., 1987). Le variant DM20 est principalement exprimé durant la phase précoce de différenciation des oligodendrocytes. Celui-ci décline ensuite graduellement avant d'être remplacé par la PLP, protéine spécifique des oligodendrocytes matures. La PLP est une protéine membranaire constituée de quatre hélices alpha hydrophobes traversant la membrane lipidique des oligodendrocytes, ainsi que deux domaines extra-cytoplasmiques localisés dans les lignes intrapériodiques (ou lignes denses mineures) et trois domaines cytoplasmiques localisés dans les lignes denses majeures. Ainsi, après compaction de la myéline, les PLP participent à la création de jonctions membranaires stabilisées entre les faces extracellulaires des couches de myéline aboutissant à la formation des lignes intrapériodiques (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Boison and Stoffel, 1994; Verkhratsky and Butt, 2013). L'inhibition *in vivo* de ces protéines ne montre pas d'altération du mécanisme de myélinisation des axones ou d'assemblage des gaines de myéline compactée. Il a néanmoins été constaté que l'absence de PLP mène à une condensation des lignes denses mineures en corrélation avec une réduction de la stabilité structurelle des jonctions membranaires. L'absence de PLP conduit également à une dégénérescence axonale, surtout pour les axones de petits diamètres et une mort prématurée des oligodendrocytes, se traduisant par des déficits locomoteurs chez la souris (Edgar and Garbern, 2004).

### **c. 2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase**

La protéine CNP est exprimée exclusivement par les oligodendrocytes du SNC, où elle représente quatre pourcents des protéines myéliniques. Elles se localisent principalement au niveau des corps cellulaires des oligodendrocytes non-myélinisants et également au niveau des boucles paranodales, mais peu au niveau de la myéline compactée. La CNP est présente sous deux formes, la CNP1 et la CNP2, exprimées différenciellement durant la différenciation des oligodendrocytes. Les OPC expriment seulement le CNP2, alors que les oligodendrocytes expriment les deux variants. La CNP est une enzyme qui intervient dans les stades précoces de la myélinisation. Elle participe à la croissance des prolongements cytoplasmiques des oligodendrocytes en interagissant avec les éléments du cytosquelette. Sa surexpression conduit à l'apparition de perturbations dans le mécanisme de formation de la myéline et une expansion



aberrante des ramifications chez les oligodendrocytes (Gravel et al., 1996). A l'inverse, son inhibition se traduit par une dégénérescence axonale indiquant un rôle possible dans les interactions axogliales (Edgar and Nave, 2009; Verrier et al., 2012).

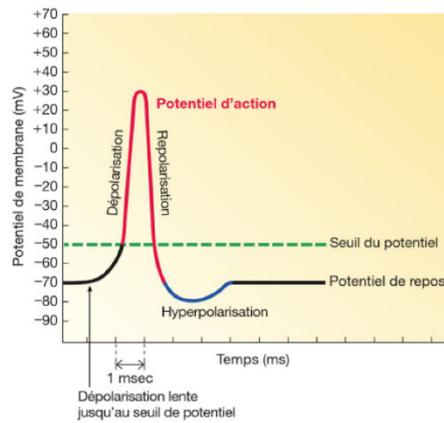
### **d. Myelin associated glycoprotein**

Les protéines MAG sont des éléments mineurs de la myéline représentant moins d'un pourcent de l'ensemble des protéines myéliniques. Elles sont les plus importantes glycoprotéines au sein de la myéline et font partie de la super famille des immunoglobulines (Ig). Au niveau du SNC, deux isoformes sont différenciellement exprimées, la L-MAG et la S-MAG, qui possèdent des fonctions distinctes. La L-MAG est la forme prédominante durant les phases précoces de la myélinisation, puis son expression décline durant la maturation de la gaine de myéline. Inversement, la S-MAG prédomine dans la myéline du SNC adulte. Les MAG sont des protéines transmembranaires qui se localisent principalement sur la face interne de la myéline mature en contact avec l'axone dans l'espace périaxonal (Trapp, 1990). Chez la souris *knockout* (KO), l'absence de MAG conduit à des anomalies dans la formation des boucles paranodales et des bords membranaires de l'espace périaxonal (Verkhatsky and Butt, 2013). Ceci démontre l'implication des MAG dans les interactions axones/gaine de myéline. Le domaine extracellulaire des MAG peut également se fixer avec certains gangliosides axonaux (GD1a et GD1b) participant à l'établissement des contacts axonaux, ainsi qu'à leur stabilisation sur le long terme.

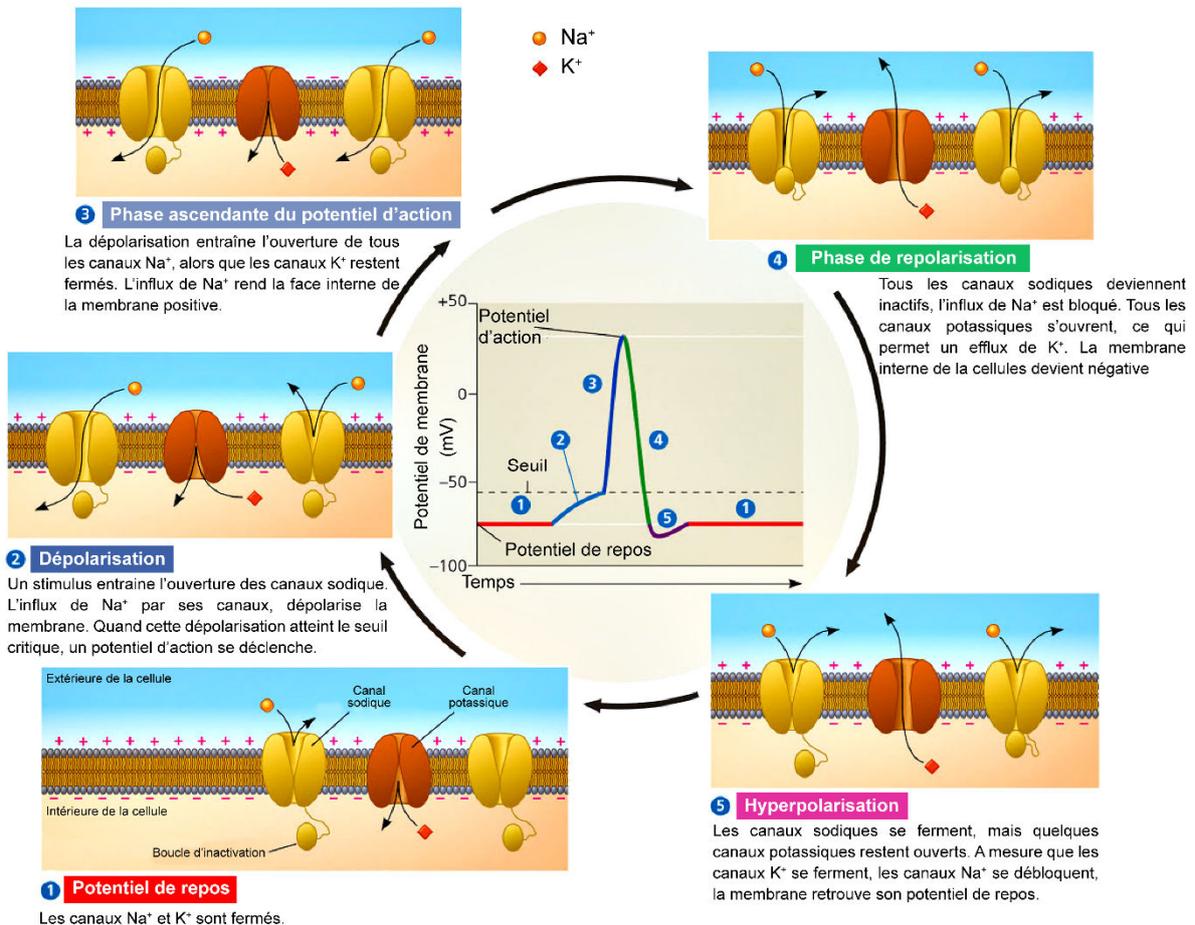
### **e. Myelin oligodendrocyte glycoprotein**

La protéine MOG est spécifique des oligodendrocytes et n'est présente que dans le SNC. Cette glycoprotéine transmembranaire se localise principalement sur la face la plus externe de la gaine de myéline compactée des oligodendrocytes. Son expression intervient tardivement durant la myélinisation. Elle est l'une des dernières protéines myéliniques à être exprimée. Par conséquent, la MOG est utilisée pour identifier les oligodendrocytes matures myélinisants. Sa fonction précise reste encore inconnue, mais sa structure moléculaire et son domaine extracellulaire d'Ig semblent indiquer un rôle possible de récepteur membranaire ou de molécule d'adhésion (Peschl et al., 2017).

D'autres protéines exprimées minoritairement dans la myéline sont également présentes, tel que MOBP (*Myelin-associated/ oligodendrocyte basic proteins*), OSP (*Oligodendrocyte specific protein*), des connexines, des transferrines et des anhydrases



**Figure 32 : Modification d'un potentiel de membrane au cours d'un potentiel d'action (PA).** Le PA se caractérise par une phase de dépolarisation de la membrane plasmique. Arrivée à une valeur critique, dite de « seuil de potentiel » (entre -50 et -55 mV), le potentiel de membrane (PM) atteint une valeur maximale de +35 mV. Cet accroissement du PM s'arrête une fois le pic du PA atteint, c'est le début de la phase de repolarisation de la membrane plasmique. La membrane plasmique revient ensuite à son état basal avec un PM à son seuil de repos (Sherwood and Ectors, 2015).



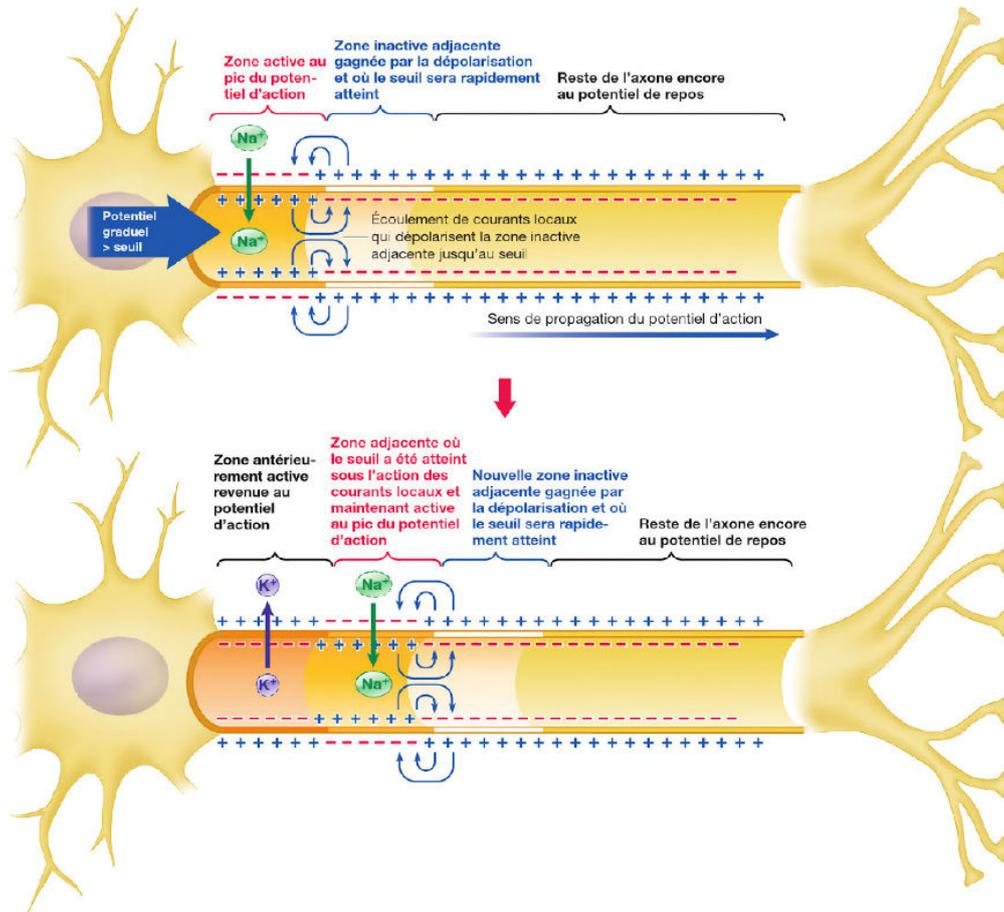
**Figure 33 : Rôles des canaux ioniques voltages dépendants dans la génération du potentiel d'action.** Le symbole + représente une charge électrique positive et le symbole - représente une charge électrique négative (Reece et al., 2015).

carboniques. Toutes ces protéines participent également à la formation et l'entretien de la gaine de myéline (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Verkhratsky and Butt, 2013).

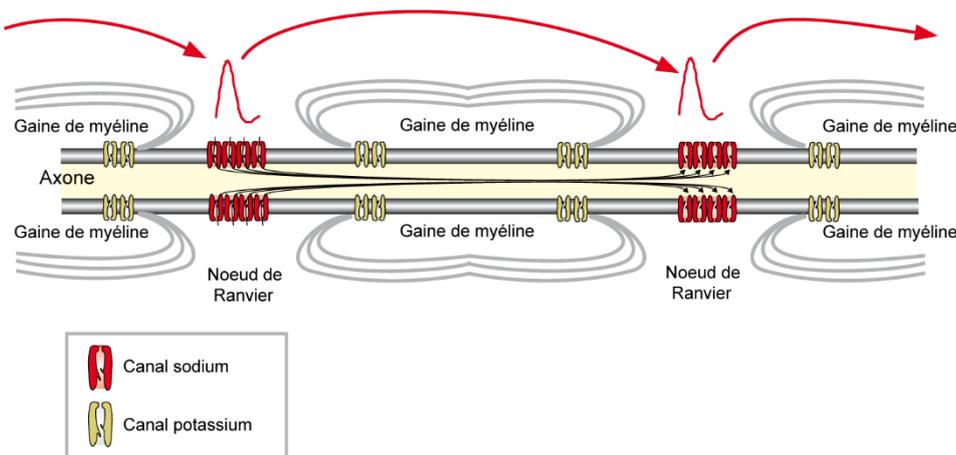
### 6. Le potentiel d'action et la conduction saltatoire

Un PA se définit par une variation brève et importante du potentiel membranaire (PM) d'une cellule excitable par un stimulus. Ceci se traduit par une inversion transitoire de la répartition des charges électriques de part et d'autre de la membrane plasmique de la cellule. Ce mécanisme est rendu possible par la présence de canaux ioniques dits « voltage dépendant », répartis le long de la membrane plasmique de la cellule excitable. Chez le neurone, ces canaux ioniques sont de type sodique ( $\text{Na}^+$ ) et potassique ( $\text{K}^+$ ). Ils se répartissent sur la totalité de la membrane plasmique du neurone, l'axolement. Au repos, le PM du neurone est stable (environ  $-70 \text{ mV}$ ) et les canaux ioniques sont en attente d'activation. Les canaux sodiques sont fermés. Leur porte d'activation est close et leur porte d'inactivation est ouverte ; le sodium extracellulaire ne peut donc pas passer au travers. Les canaux potassiques sont également fermés (porte activation fermée). Lorsqu'un neurone reçoit un signal (stimulus), celui-ci le transmet à une cellule en déclenchant un PA le long de son axone (Sherwood and Ectors, 2015 ) (**Figures 32 et 33**).

La première étape du PA est la phase de dépolarisation de la membrane plasmique. Certains canaux  $\text{Na}^+$  commencent à s'ouvrir et à laisser entrer des ions  $\text{Na}^+$  avec leur charge positive dans le cytoplasme via un gradient électrochimique. Ceci a pour effet d'augmenter progressivement la charge du potentiel de membrane. Arrivée à une valeur critique, dite de « seuil de potentiel » (entre  $-50$  et  $-55 \text{ mV}$ ), la dépolarisation devient « explosive ». Il y a un accroissement rapide du PM qui atteint une valeur maximale de  $+35 \text{ mV}$  (voir  $+40 \text{ mV}$  en fonction du type de cellule). Ceci est dû à une augmentation de la perméabilité de la membrane aux ions  $\text{Na}^+$  (600 fois plus), donc un accroissement du nombre de canaux sodiques ouverts entraînant un influx de massif de  $\text{Na}^+$  dans le cytoplasme. Mais cet accroissement du PM s'arrête une fois le pic du potentiel d'action atteint, car les portes d'inactivation des canaux sodiques se ferment entraînant une inactivation des canaux diminuant la perméabilité aux ions  $\text{Na}^+$ . C'est le début de la phase de repolarisation de la membrane plasmique. Ce mécanisme de contrôle d'ouverture des canaux sodiques s'active dès le début de la dépolarisation. Une ouverture rapide de la porte d'activation conduit à une fermeture lente de la porte d'inactivation du canal. Le pic de PA entraîne l'activation des canaux potassiques, qui ouvrent le canal et laissent passer un flux d'ions  $\text{K}^+$  dans le milieu extracellulaire. Cette sortie de potassium par un



**Figure 34 : Conduction par contiguïté du potentiel d'action.** L'écoulement de courants locaux entre la zone active au pic du PA et la zone adjacente encore au PA réduit le potentiel de cette zone contiguë jusqu'au seuil, ce qui y déclenche un PA. La zone primitivement active revient au potentiel de repos et la nouvelle région active cause sous l'action de courants locaux l'apparition d'un PA dans la zone inactive contiguë suivante et le même cycle se reproduit sur toute la longueur de l'axone (Sherwood and Ectors, 2015).

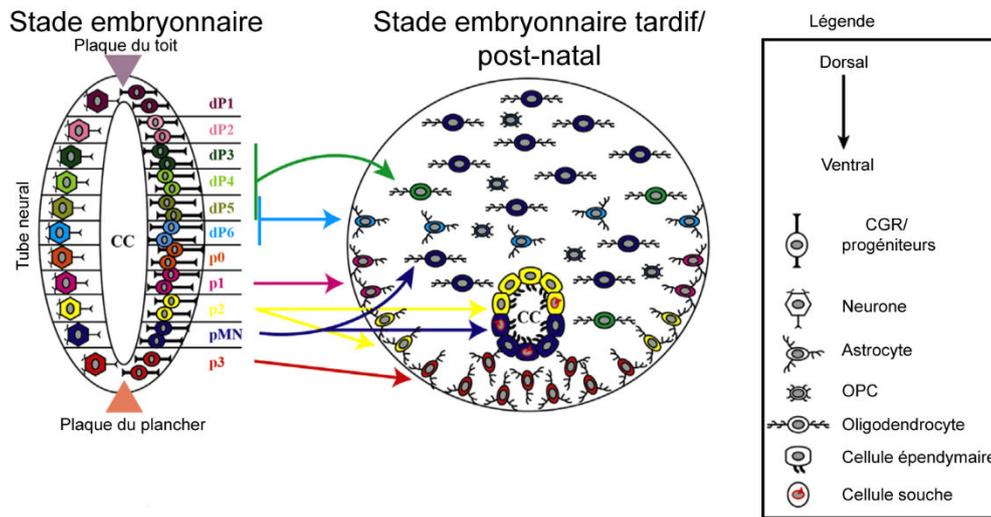


**Figure 35 : Conduction saltatoire du potentiel d'action.** Lors d'un stimulus, un PA se déclenche au niveau d'un noeud de Ranvier à la base de l'axone. Cela entraîne une dépolarisation accompagnée d'un flux massif d'ions  $\text{Na}^+$  à l'intérieur de l'axone. Un flux d'ions positifs se propage alors dans le cytoplasme pour atteindre le noeud suivant. La gaine de myéline possède une haute résistance ainsi qu'une faible capacité électrique, forçant le flux d'ions à passer sous celle-ci plutôt qu'au travers de la membrane axonale. Ces ions vont ainsi modifier le potentiel de membrane du noeud et déclencher un nouveau PA. Ce mécanisme est dit saltatoire puisque les PA se propagent en « sautant » d'un noeud à un autre (Verkhatsky and Butt, 2013).

gradient électrochimique a pour effet de rétablir la négativité du PM. La membrane plasmique revient ainsi à son état basal avec un PM à son seuil de repos, la repolarisation membranaire est terminée. Le système de pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase permet ensuite la restauration des gradients de concentration des ions le long de l'axone afin de le préparer pour un autre PA (Reece et al., 2015).

Au niveau des fibres nerveuses non-myélinisées, le potentiel d'action se transmet le long de la membrane par un phénomène de conduction par contiguïté. Le PA se propage d'une région active à une région inactive (non dépolarisée) par un échange de courant local. Les charges opposées de ces deux régions s'attirent mutuellement, ce qui modifie le PM et conduit une dépolarisation de la membrane dans la région inactive (Sherwood and Ectors, 2015) (**Figure 34**). Ce sens de propagation du PA le long de l'axone est à sens unique. En effet, une région ayant reçue un PA ne peut engendrer un nouveau PA, sans avoir subie au préalable une période de latence, c'est la période réfractaire. Elle se divise en deux phases, la période réfractaire absolue et la période réfractaire relative. La période réfractaire absolue est due à la lenteur des canaux sodiques et correspond au temps nécessaire pour ceux-ci pour revenir à leur conformation d'origine suite à un PA (position porte fermée mais canal en attente d'activation). La période réfractaire relative constitue une seconde sécurité dans ce mécanisme de période réfractaire. Elle est due au temps de repositionnement des canaux potassiques après le PA. En effet, durant la période réfractaire absolue, l'entrée d'ions  $\text{Na}^+$  en réponse à un nouveau stimulus est contrecarrée par la fuite persistante d'ions  $\text{K}^+$  par ses canaux qui ne se sont pas encore refermés, empêchant le PM d'arriver au seuil de potentiel et de déclencher un nouveau PA.

A l'inverse, les fibres myélinisées propagent leur PA par un mécanisme de conduction saltatoire (**Figure 35**). En effet, la gaine de myéline entourant ces fibres sert d'isolant électrique. Celle-ci empêche les ions hydrosolubles de traverser la zone des internœuds. Les nœuds de Ranvier, riches en canaux sodiques, permettent la propagation du potentiel d'action le long de la fibre nerveuse. Lors d'un stimulus, un PA se déclenche au niveau d'un nœud de Ranvier à la base de l'axone, selon le même mécanisme qu'un PA classique. Cela entraîne une dépolarisation accompagnée d'un flux massif d'ions  $\text{Na}^+$  à l'intérieur de l'axone. Un flux d'ions positifs se propage alors dans le cytoplasme pour atteindre le nœud suivant. La gaine de myéline possède une haute résistance ainsi qu'une faible capacité électrique, forçant le flux d'ions à passer sous celle-ci plutôt qu'au travers de la membrane axonale. Ces ions vont ainsi modifier le PM du nœud et déclencher un nouveau PA. Ce mécanisme est dit saltatoire puisque les PA se propagent en « sautant » d'un nœud à un autre.



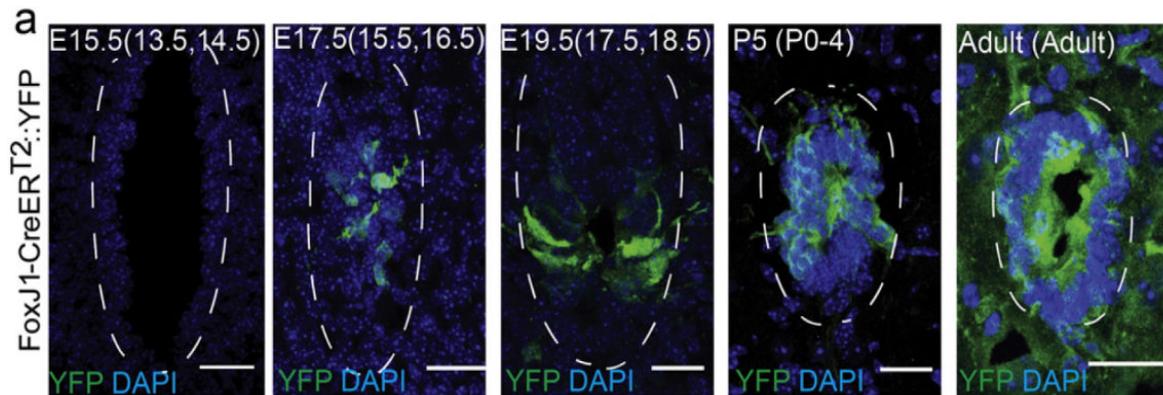
**Figure 36 : Régulation spatio-temporelle du devenir des cellules neurales au cours du développement.** Représentation schématique de la génération des différents types de cellules neurales dans la moelle spinale. Pendant l'embryogenèse, des domaines progéniteurs distincts s'établissent le long de l'axe dorso-ventral sous le contrôle des facteurs sécrétés par la plaque du plancher et la plaque du toit. Tous ces domaines donnent naissance à divers sous-types de neurones vers E10 à E14. Ensuite, durant la phase tardive du développement embryonnaire jusqu'à la naissance, la gliogenèse se met en place. Il a été démontré que des domaines spécifiques génèrent localement des sous-types d'astrocytes (flèches droites), alors que d'autres domaines génèrent des oligodendrocytes qui migrent dans toute la moelle épinière (flèches courbes). Au moins deux domaines contribuent à la couche cellulaire épendymaire qui contient le potentiel des cellules souches adultes. CGR (cellule gliale radiaire), OPC (*oligodendrocyte progenitor cell*), CC (canal central) (Guerout et al., 2014).

### V. Les cellules épendymaires

Les cellules épendymaires font partie des cellules gliales qui constituent le SNC. Elles tapissent les parois du système ventriculaire, constitué par les quatre ventricules cérébraux et par le canal épendymaire dans la moelle spinale. Ces cellules spécialisées multi-ciliées forment une barrière physique continue entre le LCR et le parenchyme nerveux adjacent. Les battements de leurs cils permettent la propulsion du LCR et garantissent l'homéostasie du SNC. Récemment elles furent décrites comme étant des cellules souches neurales endogènes qui participent aux processus de physiopathologies des lésions de la moelle spinale (Del Bigio, 2010).

#### 1. Développement

Durant le développement embryonnaire, les cellules neuroépithéliales prolifèrent extensivement de façon symétrique au niveau de la zone germinale ventriculaire du tube neural. Ces cellules vont se diviser en cellules de la glie radiaire qui donneront ensuite naissance aux neurones de la moelle spinale (**Figure 36**). Vers la phase tardive du développement, les cellules de la glie radiaire changent leur mode de division pour donner naissance aux cellules gliales, c'est la gliogenèse. Durant cette phase, le tube neuronal subit de profondes modifications morphologiques. En effet, vers E12, les parties dorsales opposées du neuroépithélium formant la paroi du canal central primitif vont fusionner par le phénomène d'oblitération, entraînant une diminution importante de la lumière du canal. A la fin de cette phase ne subsiste plus que vingt pourcents du neuroépithélium présent à E6, qui se localise principalement autour du canal central (Bohme, 1988; Richardson et al., 1997). Des différents domaines progéniteurs de l'axe dorso-ventral présents pendant la neurogenèse ne subsistent que les domaines p2, p3 et pMN. Entre E14 et E16, les cellules de la glie radiaire vont se diviser asymétriquement et donner naissance aux cellules épendymaires au niveau futur canal central. Des études ont mis en évidence chez le poulet et la souris, que les cellules épendymaires émanaient des cellules radiaires résidant dans la partie ventrale du tube neural. En effet, les cellules épendymaires de la moelle spinale dérivent principalement de cellules exprimant le gène progéniteur *Nkx6.1* au niveau des domaines pMN et p2 (Fu et al., 2003). L'expression de *Nkx6.1* par le neuroépithélium ventriculaire est dépendante de la présence de Shh issues de la plaque du plancher du tube neural (Fu et al., 2003; Yu et al., 2013). Il fut également démontré l'apparition d'une seconde vague de cellules épendymaires peu de temps après la naissance.

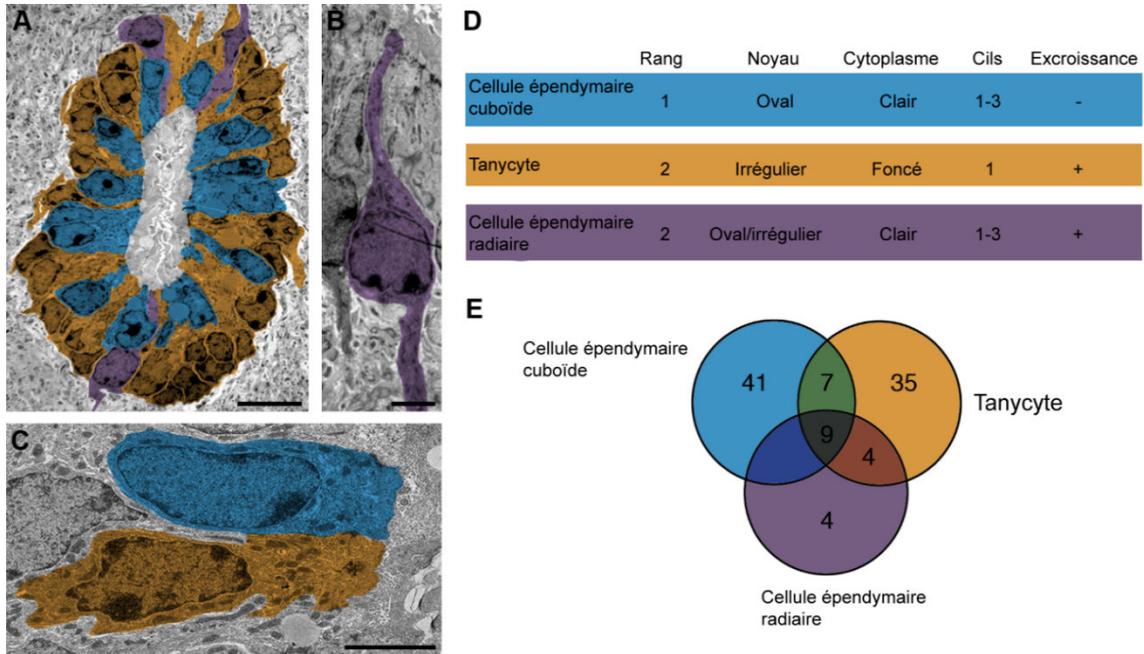


**Figure 37 : Emergence des cellules épendymaires à E15,5 durant le développement embryonnaire de la moelle spinale murine.** Images représentatives en coupe transversale des cellules épendymaires YFP positives autour du canal central (lignes en pointillées) après administration de tamoxifène chez le modèle murin hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP au cours du développement. L'expression de la YFP est induite par l'administration de tamoxifène à E13,5-14,5, E15,5-17,5, E17,5-18,5, P0-4 et chez l'adulte (contrôle). Les moelles spinales embryonnaires et post-natales ont été collectées respectivement à E15.5, E18.5, E19.5, P5 et adulte (contrôle) (Li et al., 2016).

En effet, vers P8-15, deux petites zones de cellules radiaires émanant du plancher et du toit de la moelle spinale, donnent naissance à une seconde population de cellules épendymaires (Qin et al., 2015; Sevc et al., 2011). Une étude récente a permis de mieux comprendre le mécanisme d'apparition des cellules épendymaires durant le développement. En effet, en utilisant la lignée murine transgénique inductible hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP, Li et son équipe ont suivi l'expression de ce gène durant le développement embryonnaire. Ils ont observé l'apparition de cellules épendymaires recombinaisons proliférant autour du canal central à E15,5 jusqu'à P10 (**Figure 37**). Ces observations furent confirmées chez un second modèle non-inductible en combinaison avec les marqueurs spécifiques des cellules épendymaires précédemment décrits (Li et al., 2016b). Ils expliquent leur découverte par le manque de spécificité des différents marqueurs des cellules épendymaires.

Après la naissance, les cellules épendymaires se divisent symétriquement afin de permettre l'élongation du canal central pendant la croissance de la moelle spinale (Alfaro-Cervello et al., 2012; Sabourin et al., 2009). Il a été démontré que les cellules filles issues de cette division symétrique restaient principalement au niveau de la zone épendymaire entourant le canal central (Hamilton et al., 2009). Il est donc probable que la fonction première de ces cellules épendymaires adultes soit la maintenance de la couche épendymaire par un mécanisme d'auto-renouvellement. De plus, la distribution de ces cellules prolifératives au sein de la couche épendymaire est asymétrique. En effet, trois fois plus de cellules en prolifération ont été observées en partie dorsale qu'en partie ventrale du canal, conduisant à l'établissement d'un gradient de prolifération dorso-ventral autour du canal central (Hamilton et al., 2009). Ce phénomène pourrait s'expliquer par la présence d'un plus grand nombre de vaisseaux sanguins en partie dorsale. En effet, des études ont démontré une très forte corrélation entre le taux de prolifération des précurseurs neuronaux et la densité du réseau vasculaire au niveau de la SVZ du prosencéphale (Hamilton et al., 2009; Shen et al., 2008).

Dans le cerveau, les cellules épendymaires participent activement à la neurogènesse tout au long de la vie. En revanche, les cellules épendymaires spinales adultes en condition physiologique sont très largement dormantes, prolifèrent sporadiquement, principalement en partie dorsale et ne génèrent aucun autre type cellulaire durant toute la vie de l'individu (ceci change en cas de lésion médullaire, **voir chapitre 3-4-3**) (Barnabe-Heider et al., 2010; Horner and Gage, 2000; Horner et al., 2000; Meletis et al., 2008). Toutes ces études démontrent l'hétérogénéité des cellules épendymaires constituant le canal central de la moelle spinale adulte.



**Figure 38 : Caractérisation des cellules épendymaires de la moelle spinale par microscopie électronique.** (A-C) Microscopie immuno-électronique du canal central chez une souris FoxJ1-CreER. (A) Pseudos colorations illustrant la localisation des cellules épendymaires radiaires (A), des cellules épendymaires cuboïdes (B) et des tanycytes (C) immuno-réactives pour le CreER. (D) Tableau avec les mêmes codes de couleurs que pour (A-C), décrivant les caractéristiques physiques des trois types cellulaires bordant le canal central. (E) Diagramme de Venn illustrant le pourcentage de cellules épendymaires cuboïdes, de tanycytes, de cellules épendymaires radiaires ainsi que les cellules à la morphologie intermédiaire (Meletis et al., 2008).

### 2. Composition du canal central et place des cellules épendymaires

Le canal central adulte est un épithélium pseudo-stratifié constitué d'une myriade de types cellulaires en contact direct avec la lumière du canal épendymaire ou résidant dans la pseudo zone sub-épendymaire. En effet, contrairement à la zone sous-ventriculaire du cerveau, la région du canal central ne présente pas de zone sub-épendymaire distincte. Une zone sub-épendymaire, arbitraire a donc été définie pour les cellules contiguës à la couche épendymaire (Hamilton 2009). La composition cellulaire de la zone épendymaire est toujours controversée. Il est toutefois maintenant bien établi que le canal central est majoritairement constitué par des cellules épendymaires hautement polarisées, présentant de nombreux cils motiles, ainsi que de nombreuses microvillosités (Jimenez et al., 2014).

Les discordances observées peuvent s'expliquer par l'hétérogénéité morphologique des cellules épendymaires au niveau de la moelle spinale. Une première étude portant sur l'ultrastructure des cellules ciliées bordant la lumière du canal révéla la présence de certaines cellules à l'aspect cuboïdes et d'autres plus allongées à la morphologie caractéristique des tanocytes (Peters et al., 1991). Actuellement, on distingue trois sous-types de cellules épendymaires, morphologiquement différentes, en contact direct avec la lumière du canal central de la moelle spinale adulte : les cellules épendymaires radiales, les cellules épendymaires cuboïdes et les tanocytes (**Figure 38**) (Meletis et al., 2008). Selon Meletis et al, le canal central est composé principalement de cellules arborant des cils motiles (9+2 axonèmes) en contact avec le LCR. Son analyse de l'ultrastructure cellulaire par microscopie électronique révèle une certaine hétérogénéité parmi cette population de cellules ciliées autour du canal. Ainsi, il décrit la présence en forte proportion de cellules épendymaires cuboïdes caractérisées par leur cytoplasme très clair, dépourvues d'extension et arborant plusieurs cils (1 à 3). En proportion équivalente, il note la présence de cellules possédant des caractéristiques proches à celles des tanocytes (cytoplasme foncé, présence d'extensions cytoplasmiques et présence d'un seul cil). En quantité moindre, le canal contient également une troisième population cellulaire, aux caractéristiques proches de celles des cellules épendymaires cuboïdes, mais ayant la particularité de posséder une longue extension cytoplasmique basale orientée le long de l'axe dorso-ventral. Il les décrit comme étant des cellules épendymaires radiales. D'après Meletis, ces cellules épendymaires radiales résident principalement sur les pôles dorsal et ventral de la couche épendymaire. Mais ces observations ne font pas l'unanimité au sein de communauté scientifique.



En effet, le terme tanocytes est employé pour décrire des cellules étant au contact du système ventriculaire et possédant de longues extension radiales s'étirant depuis la « *pial surface* » jusqu'aux vaisseaux sanguins (Bruni, 1998). Par conséquent, certains auteurs décrivent les cellules maintenant un contact avec la « *pial surface* » au niveau des régions dorsale et ventrale du canal comme étant des tanocytes ou « *tanocytes-like* » (Hamilton et al., 2009; Mothe and Tator, 2005). Récemment, une étude a décrit le canal central comme composé principalement de cellules épendymaires, dont certaines, aux niveaux des pôles et des parties latérales, possèdent de longues extensions radiales, rappelant les caractéristiques des tanocytes présents dans le cerveau (Alfaro-Cervello et al., 2012).

La région du canal central contient également des cellules dites « *neuron-like* » en contact avec le LCR. Ces cellules ont été décrites dans la moelle spinale chez diverses espèces, depuis les anamniotes jusqu'aux mammifères, mais leur fonction précise reste incertaine (Vigh et al., 2004). Chez la plupart des mammifères, ces neurones se trouvent distribués de façon sporadique autour du canal central. Leur soma se localise principalement au niveau de la zone sub-épendymaire. Elles se caractérisent par la présence d'un long processus cytoplasmique unique, similaire à une dendrite, qui se projette directement dans la lumière du canal. Une fois au contact du LCR, cette dendrite se termine par un large renflement en contact direct avec le LCR (Sabourin et al., 2009). Dans la moelle spinale adulte, la plupart de ces cellules neuronales expriment différents neurotransmetteurs (tels que le GABA ou VIP, *vasoactive intestinal peptide*) et présentent différentes vésicules synaptiques, suggérant que ce sont des neurones fonctionnels (Vigh et al., 2004). Il semblerait que ces neurones soient impliqués dans les processus d'homéostasie du LCR, par une régulation de sa composition (présence de canaux sensibles aux variations de pH), de son débit et de sa pression (Huang et al., 2006; Marichal et al., 2009). Mais récemment, il a été démontré que ces cellules possédaient des propriétés électro-physiologiques caractéristiques des neurones immatures. Même à l'âge adulte, ces cellules continuent d'exprimer des protéines telles que PSA-NCAM, double cortine (DCX) et GAP43 (*Growth Associated Protein 43*), décrites comme étant impliquées dans les mécanismes de migration et de différenciation de la lignée neuronale. Ces cellules expriment également un marqueur précoce de la lignée neuronale, le HuC/D, mais n'expriment aucunement le marqueur spécifique des neurones matures, NeuN (Hugnot, 2012; Marichal et al., 2009). Certaines équipes soulèveront l'hypothèse selon laquelle la moelle spinale adulte contiendrait un « réservoir » de neurones immatures en mode « *standby* » prêts à réagir en cas de traumatisme (Marichal et al., 2009).

	SVZ prosencéphale	Canal central moelle spinale	Spécificité du marker
Nestine	+	+	Cellules souches indifférenciées et progéniteurs
GFAP	+	+	NSC et astrocytes du prosencéphale
Sox2	+	+	Progéniteurs du prosencéphale
Musashi 1	+	+	Progéniteurs du prosencéphale
CD133/ prominin-1	+	+	Cellules souches/ progéniteur neuraux
Ki67	+	+	marqueur de prolifération cellulaire
NG2	+	-	Progéniteurs du prosencéphale
Olig2	+	-	Progéniteurs du prosencéphale
Mash1	+	-	Progéniteurs du prosencéphale
Vimentine	+	+	Cellules épendymaires du prosencéphale
S100 $\beta$	+	+	Cellules épendymaires du prosencéphale
FoxJ1	+	+	Facteur de transcription cellule épendymaire

**Figure 39 : Tableau illustratif des différents marqueurs spécifiques des cellules épendymaires du SNC.** Ce tableau compare les différents marqueurs exprimés dans le SVZ (*Subventricular zone*) et les cellules épendymaires bordant le canal central de la moelle spinale (Qin et al., 2015).

De récentes études ont démontré la présence de cellules exprimant le marqueur GFAP, spécifique des astrocytes, mature et immature, mais aussi par certaines cellules souches neurales au niveau du canal central (Alfaro-Cervello et al., 2012; Doetsch et al., 1999; Hamilton et al., 2009). Une partie de ces astrocytes se trouve directement au voisinage des cellules épendymaires dans la zone sub-épendymaire (Alfaro-Cervello et al., 2012). Une autre partie réside au niveau du canal central. Ces cellules furent décrites comme étant des «*astrocyte contacting-cells* » du fait de leur contact direct avec le LCR circulant dans le canal central. Leur analyse par microscopie électronique confirme leur identité astrogliale. Elles possèdent un cytoplasme clair, un noyau aux bords irréguliers et une répartition homogène des filaments intermédiaires au sein du cytoplasme (Alfaro-Cervello et al., 2012; Fiorelli et al., 2013). Récemment, une étude chez la souris transgénique hGFAP-CreER<sup>T2</sup>::YFP a démontré qu'une partie de ces astrocytes, principalement ceux de la partie dorsale du canal, exprimait également le marqueur souche/ précurseur, Nestine (Fiorelli et al., 2013). Cette population présente un haut degré de similarité phénotypique avec les cellules de type B1 de la SVZ du cerveau, du fait de leur forte expression de GFAP et de facteur de transcription HES1 (*hairy and enhancer of split-1*), mais également par la présence d'un unique cil associé à son centriole fils et à son extension cytoplasmique radiale, riche en filaments intermédiaires gliaux, s'étendant le long de ligne dorsale (Fiorelli et al., 2013; Hugnot, 2012; Qin et al., 2015).

On observe également la présence d'OPC, caractérisés par leur expression du facteur de transcription *Olig 2* et de la protéine NG2, dans la zone sub-épendymaire mais nullement dans au sein de la couche épendymaire (Barnabe-Heider et al., 2010; Meletis et al., 2008; Qin et al., 2015).

### 3. Marqueurs des cellules épendymaires

Plusieurs marqueurs associés aux cellules épendymaires de la zone sous-ventriculaire sont également exprimés par les cellules épendymaires bordant le canal central (**Figure 39**). Le marqueur des cellules souches et des cellules progénitrices du SVZ, Nestine, est également exprimé par les cellules épendymaires de la moelle spinale adulte (Frisen et al., 1995; Meletis et al., 2008). Dans le canal central, l'expression de Nestine, bien que présente sur tout le pourtour, est fortement détectée au niveau de la partie dorsale. Ces cellules Nestine positives possèdent de longs filaments immuno-réactifs qui s'étirent le long de la ligne dorsale. D'autres fibres similaires sont observées s'étirant depuis la partie ventrale de la zone épendymaire et d'autres occasionnellement depuis les parties latérales. Les protéines Vimentine et S100 $\beta$ , qui



sont des marqueurs des cellules épendymaires du cerveau, sont également exprimées par les cellules épendymaires bordant le canal central (Hamilton et al., 2009). Mushashi1, CD133/prominin, CD15, Sox2, Sox3 et Sox9, correspondant à des marqueurs associés aux progéniteurs cellulaires ou aux cellules neurales immatures dans le cerveau, sont également présents chez les cellules bordant le canal épendymaire (Barnabe-Heider et al., 2010; Qin et al., 2015). Durant leur phase de prolifération, les cellules épendymaires expriment le marqueur nucléaire des cellules prolifératives, Ki67 (Hamilton et al., 2009). Au niveau du cortex, la protéine GFAP est principalement exprimée par les astrocytes et certaines cellules souches neurales. L'expression de GFAP dans la zone épendymaire est présente chez les astrocytes de la zone sub-épendymaire et des astrocytes contactant la lumière du canal. Bien que controversée, une étude a démontré la présence de progéniteurs GFAP<sup>+</sup> en partie dorsale de la zone épendymaire (Fiorelli et al., 2013). Enfin, les marqueurs NG2 et Olig2 ne sont pas présents autour du canal central de la moelle spinale mais au niveau des cellules de la zone sub-épendymaire (Qin et al., 2015).

Les cellules épendymaires étant des cellules ciliées, elles expriment un ensemble de protéines et de facteurs spécifiques à la formation des cils. L'un de ces facteurs est utilisé pour identifier spécifiquement ces cellules ciliées motiles au sein du SNC (Ostrowski et al., 2003). Le facteur de transcription *FoxJ1* (*Forkhead box protein J1*, également appelé HFH4, *Hepatocyte Nuclear Factor-3/forkhead homologue-4*) fait parti des marqueurs permettant d'identifier précisément l'ensemble des cellules arborant des cils motiles au sein de l'organisme. Ce facteur est exprimé par les cellules multi-ciliées peuplant divers tissus, tel que le plexus choroïde, les testicules ou l'épithélium pulmonaire. *FoxJ1* a été caractérisé comme étant le principal régulateur de la ciliogenèse et régule à lui seul l'expression d'une constellation de gènes permettant la synthèse et la fonction des cils motiles (Yu et al., 2008). Son absence entraîne d'importantes anomalies du développement chez l'animal, tel que des aberrations dans l'établissement de l'asymétrie gauche-droite débouchant sur un mauvais positionnement des organes internes. Son absence peut également entraîner une altération, voire une absence totale de cils dans les divers tissus mentionnés précédemment (Brody et al., 2000; Jacquet et al., 2009; Yu et al., 2008). Dans le SNC, une altération des cils engendrée par l'absence de *FoxJ1* conduit fréquemment au développement d'une hydrocéphalie, empêchant généralement l'embryon d'arriver à terme (Muthusamy et al., 2014). Récemment, il a été démontré qu'une expression périnatale de *FoxJ1* par les cellules radiaires était indispensable pour permettre leur différenciation en cellules épendymaires ou en un sous-type d'astrocytes *FoxJ1* positifs

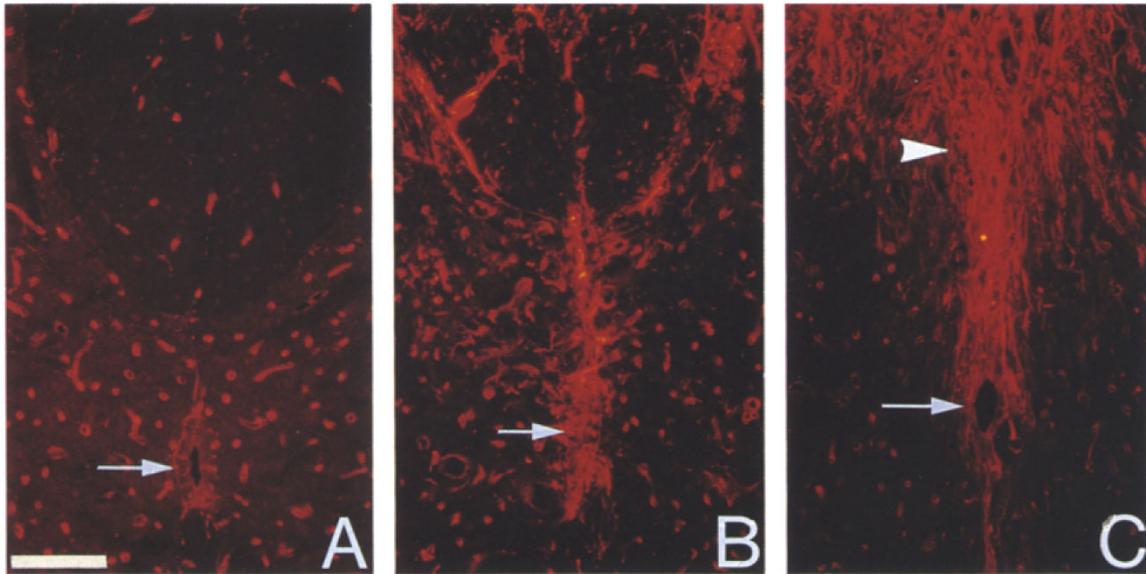


(Jacquet et al., 2009). Au sein de la moelle spinale, l'expression de FoxJ1 est restreinte aux cellules épendymaires bordant le canal central et ce dès E15, 5 (Li et al., 2016b; Meletis et al., 2008). Actuellement, l'étude des cellules épendymaires et de sa progénie (technique de cartographie de la destinée cellulaire ou *fate-mapping*) est rendue possible par l'utilisation du modèle murin transgénique hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP, utilisant la séquence codante du gène *FoxJ1* humain (Barnabe-Heider et al., 2010; Li et al., 2016b; Meletis et al., 2008).

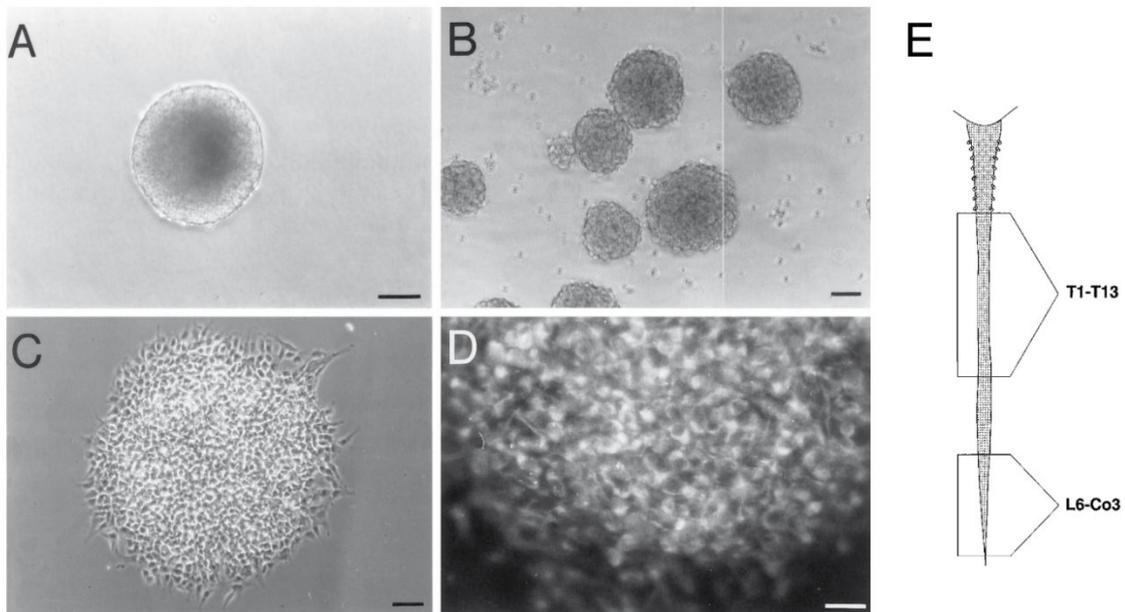
#### 4. Les cellules épendymaires, cellules souches neurales ?

Pendant longtemps, le SNC adulte fut perçu comme une structure tissulaire post-mitotique et donc incapable de se régénérer. Durant cette période, les scientifiques pensaient que le système nerveux d'un individu adulte était constitué dès la naissance d'une quantité définie de neurones et que leur remplacement était impossible du fait de l'absence de processus neurogénique. Mais cette vision fut modifiée au début des années 60, par la publication des travaux de Joseph Altman. Il fut le premier à démontrer, grâce à l'utilisation de la thymidine tritiée (Thymidine-H<sup>3</sup>), l'existence d'une prolifération cellulaire au sein du cerveau de rat adulte après un traumatisme (Altman, 1962a, b). Ces travaux ouvrirent la voie à de nombreuses études, qui s'évertuèrent à prouver l'existence d'une neurogenèse au niveau du cerveau des mammifères. Il est maintenant bien établi qu'au sein du cerveau des rongeurs et chez l'Homme adulte, il existe deux niches neurogéniques distinctes qui se localisent dans la zone sous-granulaire du gyrus dentelé de l'hippocampe et dans la zone sous-ventriculaire (Bonaguidi et al., 2012; Doetsch et al., 1997). Ces deux zones, qui produisent en permanence de nouvelles cellules à partir d'un *pool* de cellules souches neurales (NSC), permettent le renouvellement de la population neuronale du cerveau. Les NSC du gyrus dentelé sont responsables du renouvellement des neurones de l'hippocampe, qui participent principalement aux fonctions cognitives, comme la mémoire et l'apprentissage. Quant aux NSC du SVZ, elles renouvèlent les interneurons des bulbes olfactifs en migrant au sein du courant migratoire rostral (RMS, *rostrally migrating stream*) (Gage, 2000; Johansson et al., 1999; Panayiotou and Malas, 2013). En toute logique, les mêmes investigations furent menées au niveau de la moelle spinale. L'objectif était de déceler la présence d'un *pool* de cellules souches permettant le renouvellement des neurones similairement au cerveau.

En utilisant également de la thymidine-H<sup>3</sup>, Adrian et Walker observèrent l'existence d'une prolifération cellulaire après lésion au sein d'une moelle spinale de souris adulte (Adrian and Walker, 1962). Une étude *in vitro* a mis en exergue l'effet mitogène du facteur de croissance



**Figure 40 : Expression du marqueur Nestine autour du canal central de la moelle spinale murine.** Coupe histologique. Image représentative de l'immuno réactivité de Nestine au niveau du canal central après une lésion en *dorsal funiculus* en coupe transversale. (A) Coupe transversale d'une moelle saine. (B) Coupe transversale d'une moelle lésée 2 jours après la lésion. (C) Coupe transversale d'une moelle lésée 14 jours après la lésion. Les flèches indiquent le canal central de moelle spinale. La tête de flèche indique la zone de lésion (Frisen et al., 1995).

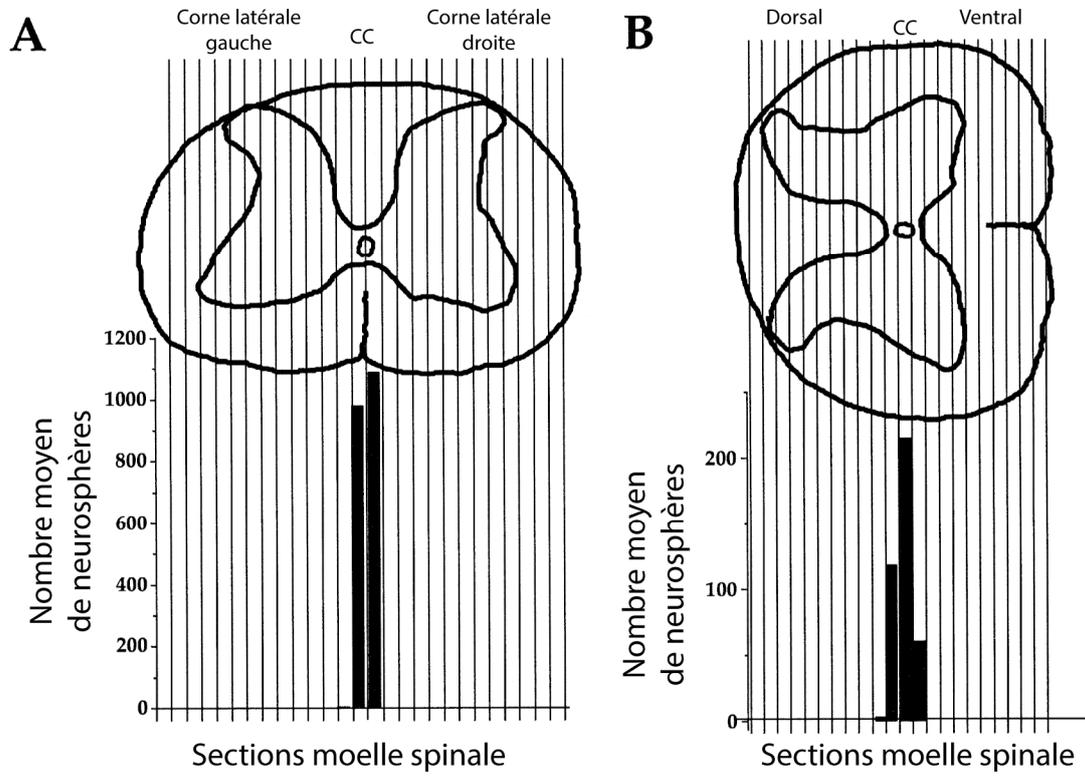


**Figure 41 : Neurosphères générées à partir d'un segment thoracique de moelle spinale adulte.** (A) Neurosphère primaire. (B), Neurosphères secondaires générées à partir d'une neurosphère primaire dissociée. (C) Neurosphère secondaire exprimant le marqueur Nestine. (D) Grossissement d'une neurosphère secondaire exprimant le marqueur Nestine. (E) Moelle spinale d'une souris adulte illustrant les segments spinaux utilisés pour la génération de neurosphères primaire. T : segment thoracique, L : segment lombaire, Co : segment coccygien (Weiss et al., 1996).

bFGF sur une population cellulaire issue d'une moelle spinale d'embryon, présentant des caractéristiques phénotypiques d'une lignée neurale (neuroblaste) (Ray and Gage, 1994). Quelque temps après fut observée, autour du canal épendymaire, une élévation de l'expression du marqueur Nestine, après un traumatisme médullaire. Cette protéine des filaments intermédiaires fut décrite précédemment comme étant fortement exprimée par les cellules progénitrices au niveau du cortex (Frisen et al., 1995). Cette étude démontre une expression rapide et prolongée de Nestine par des cellules avoisinant le canal épendymaire et migrant pour participer à la cicatrisation tissulaire après laminectomie (Frisen et al., 1995) (**Figure 40**). Ceci renforça les soupçons concernant la présence d'une population cellulaire progénitrice au niveau médullaire. Il fallut attendre les travaux de Weiss pour confirmer cette hypothèse.

En 1996, Weiss et ses collaborateurs mirent en évidence *in vitro*, la présence d'une population cellulaire munie d'une capacité d'auto-renouveaulement et de multipotence (Weiss et al., 1996). L'utilisation combinée des facteurs mitogéniques bFGF et EGF (*epidermal growth factor*) sur une culture murine d'un tronçon médullaire adulte permit la prolifération, l'auto-renouveaulement et l'expansion d'une population souche neurale non-adhérente sous la forme d'une sphère, baptisée neurosphère (Weiss et al., 1996) (**Figure 41**). Ces neurosphères, exprimant le marqueur Nestine, se différencient en l'absence de facteurs de croissance et de sérum, en astrocytes, oligodendrocytes et neurones sur support *coaté* avec de la poly-L-ornithine. Dans cette étude, toutes les principales caractéristiques définissant une cellule souche furent prouvées. Ces cellules peuvent s'auto-renouveler, à savoir se diviser symétriquement de manière à générer une cellule identique à elle-même. Elles sont également multipotentes, car elles ont le pouvoir de se différencier en plusieurs types cellulaires possédant les caractéristiques phénotypiques de l'organe dont elles sont issues (Hall and Watt, 1989). L'étude de Weiss reste encore à l'heure actuelle une référence sur l'étude du comportement des cellules souches neurales *in vitro*.

Une fois la confirmation de la présence d'une population au potentiel souche au sein de la moelle spinale adulte, des interrogations demeuraient sur son origine cellulaire et sa localisation anatomique. Il fut donc entrepris d'identifier cette famille de cellule souche *in vivo*. A la suite de ces travaux, Frisen et ses collaborateurs décidèrent d'étudier la prolifération cellulaire au niveau de la moelle spinale et plus particulièrement, les cellules bordant le canal central. Pour cela, ils utilisèrent de la Bromodésoxyuridine (BrdU), un nucléotide synthétique analogue de la thymidine. Tout comme la Thymidine-H<sup>3</sup>, le BrdU permet d'identifier grâce à un anticorps spécifique, les cellules en cours de prolifération au moment de l'administration du



**Figure 42 : Nombre de neurosphères générées par des sections de 100µm coupées au vibratome d'un segment cervical de moelle spinale. (A) Section coupée de gauche à droite. (B) Section coupée de la surface dorsale à la surface ventrale (Martens et al., 2002).**

produit et de suivre le devenir des cellules-filles au sein d'un tissu à des temps plus tardifs. En premier lieu, Johansson démontra par l'injection de DiI (1, 1'-dioctadecyl-3, 3, 3'-tetraméthylindo carbocyanine perchlorate) dans le LCR, une molécule fluorescente lipophile cationique, que la majorité des neurosphères générées *in vitro* est issue des cellules bordant le système ventriculaire (couche épendymaire du cerveau et de la moelle spinale). Il confirma que les neuroblastes renouvelant les neurones au niveau des bulbes olfactifs étaient issus de la couche épendymaire du SVZ. Il observa également une faible incorporation de BrdU dans le temps par les cellules du canal central. Cependant, lors d'une lésion du *funiculus dorsalis*, cette incorporation augmentait significativement, traduisant une élévation du taux de prolifération cellulaire de l'ordre de 50 fois plus au niveau du canal central. Johansson constata également que ces nouvelles cellules migraient vers la zone de lésion et participaient dans le temps à la cicatrice gliale par la génération d'astrocytes (Johansson et al., 1999).

D'autres études contredirent ces observations et rapportèrent que les cellules au niveau du parenchyme médullaire pouvaient également former des neurosphères (Yamamoto et al., 2001; Yoo and Wrathall, 2007). Par exemple, Martens et ses collègues suggérèrent que les cellules souches de la moelle pouvaient provenir de la partie sub-épendymaire (Martens et al., 2002). Pour cela, ils réalisèrent des coupes épaisses (100  $\mu\text{m}$ ) de moelle spinale afin de les mettre dans les mêmes conditions de culture que les neurosphères. Ils constatèrent que seules les coupes contenant le canal central étaient en mesure de générer des neurosphères et que l'injection de bFGF et EGF dans le quatrième ventricule stimulait la prolifération des cellules de la même zone (Martens et al., 2002) (**Figure 42**). Cependant, l'identification de l'origine cellulaire des NSC médullaires fut limitée par le manque d'outils technologiques et de marqueurs spécifiques.

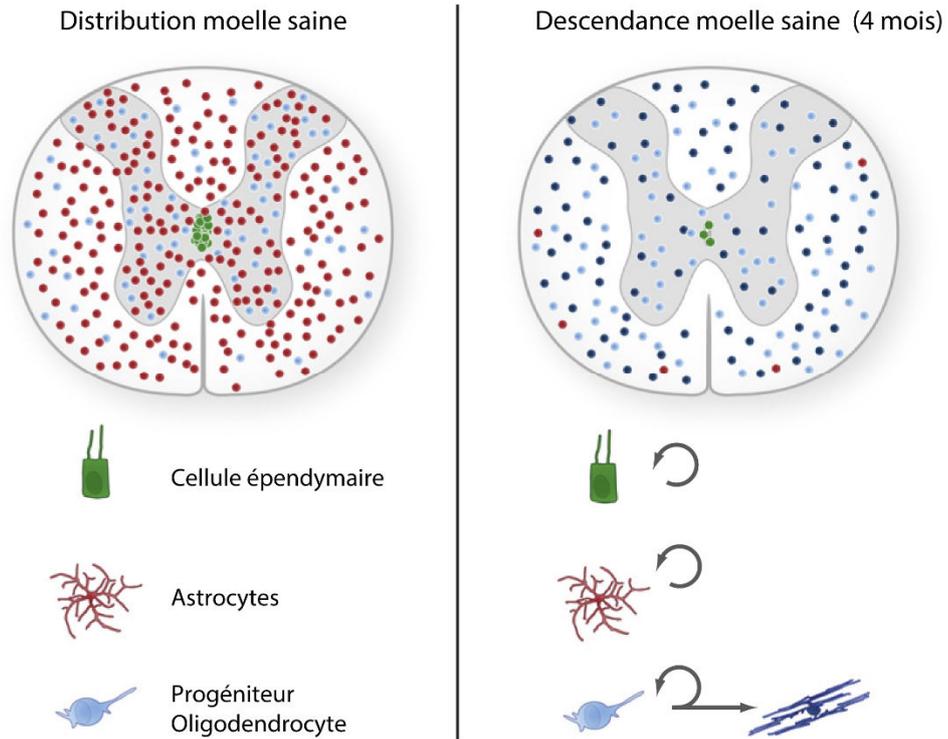
Heureusement, les innovations technologiques récentes dans le domaine du génie génétique permirent de pallier à ces problèmes. Utilisée dans le domaine de la biologie du développement, la technique de *fate-mapping* est une méthode permettant de comprendre l'origine embryologique de différents tissus d'un organisme adulte en établissant une correspondance entre un groupe cellulaire à un stade donné du développement embryonnaire et leur progénie à un stade plus avancé. Pour ce faire, les chercheurs utilisent un procédé ingénieux de construction génétique appelé le système Cre-loxP. Le but est de suivre une population cellulaire donnée par une protéine fluorescente (ex : une GFP ou une  $\beta$ -galactosidase) par l'insertion de sa séquence codante, précédée d'un codon stop flanqué de séquence loxP sous la dépendance d'un promoteur fort dans leur génome. La traduction de la protéine n'est rendue



possible que par l'excision du codon stop par la fixation d'une recombinaise Cre sur les sites loxP (locus de X(cross)-over dans P1). C'est pour cette raison que les cellules doivent également contenir une séquence codante pour la recombinaise Cre. Afin de garantir la spécificité de l'expression de la protéine fluorescente par les cellules d'intérêt, l'expression de la recombinaise est sous la dépendance d'un gène spécifique des cellules d'intérêt. Pour contrôler le moment de l'expression de la protéine fluorescente, l'administration de Tamoxifène est indispensable pour activer l'activité enzymatique de la recombinaise Cre.

L'équipe de Friséen décida donc de suivre les cellules du canal épendymaire et leur progénie en utilisant deux modèles murins transgéniques, à savoir une lignée de souris Nestine-CreER et une autre hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>. Il avait été démontré précédemment que l'expression du gène *FoxJ1*, gène spécifique des cellules ciliées motiles, était restreinte aux cellules épendymaires dans la moelle spinale (Ostrowski et al., 2003). A l'aide de ces modèles murins, cette équipe démontra que les cellules épendymaires composant le canal central exprimant les marqueurs FoxJ1 et Nestine, prolifèrent peu chez l'adulte en condition physiologique. Après lésion du *funiculus dorsalis*, ces cellules augmentent significativement leur taux de prolifération autour du canal central et migrent vers la zone de lésion pour participer au processus de cicatrisation tissulaire. Ces cellules migrantes perdent graduellement leur profil de cellule épendymaire (perte d'expression de Sox2, Sox3 et FoxJ1) mais conservent le profil de cellule souche (expression de Vimentine et de Sox9). Leur suivi dans le temps démontre que ces cellules se différencient fréquemment en astrocytes et parfois en oligodendrocytes matures au niveau de la cicatrice gliale, un mois après la lésion. Ces observations furent confirmées *in vitro* par l'obtention de neurosphères recombinaées issues des souris FoxJ1 et par leur différenciation en astrocytes, oligodendrocytes et neurones également recombinaés (Meletis et al., 2008).

Tous ces travaux menés par l'équipe de Friséen durant une décennie tendent à prouver le cantonnement du potentiel de cellules souches neurales aux seules cellules épendymaires qui bordent le canal central. Ceci changea la vision globale des cellules épendymaires reléguées aux seules fonctions de barrière physique entre le parenchyme et le LCR et de propulsion du LCR au sein du système ventriculaire. Des doutes persistaient néanmoins, quant à ce confinement du potentiel souche pour les seules cellules épendymaires. Des résultats indirects menèrent à la suggestion que les progéniteurs d'oligodendrocytes présentaient des caractéristiques de NSC et produisaient *in vivo* des cellules de différentes lignées, sans toutefois apporter de preuve directe (Horky et al., 2006; Ohori et al., 2006). De plus, au niveau du cerveau, les astrocytes agissent comme des NSC et donnent naissance à de nouveaux neurones

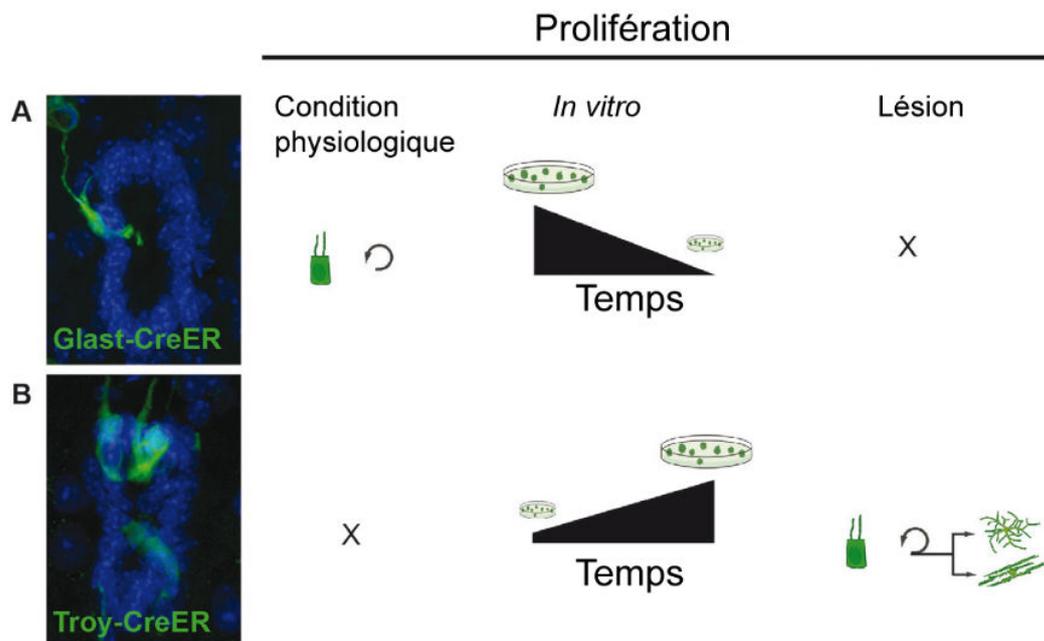


**Figure 43 : Contribution relative des cellules épendymaires, des astrocytes et des progéniteurs d'oligodendrocyte aux nouvelles cellules gliales de la moelle spinale saine au cours du temps. (Barnabe-Heider et al., 2010).**

au niveau du SVZ et du gyrus dentelé. *In vitro*, les astrocytes corticaux acquièrent des propriétés de cellules souches neurales après lésion (Buffo et al., 2008).

Ces interrogations furent résolues en 2010 avec les travaux de Barnabé-Heider. Son équipe analysa simultanément le comportement des trois populations majoritaires de la moelle par *genetic fate-mapping* en condition physiologique et traumatique. Pour cela, la même lignée de souris transgéniques inductibles hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup> fut utilisée en la comparant avec deux autres lignées transgéniques inductibles spécifiques d'un type cellulaire donné, à savoir la lignée Cx30-Cre (spécifique du type astrocytaire) et la lignée Olig2-Cre (spécifique du type oligodendrocyte) (Barnabe-Heider et al., 2010). Ces travaux décrivent qu'en condition physiologique, les progéniteurs oligodendrocytaires constituent la principale population cellulaire qui s'auto-renouvelle, prolifère et qui génère des oligodendrocytes matures au cours du temps (Barnabe-Heider et al., 2010) (**Figure 43**). A l'inverse, les astrocytes et les cellules épendymaires, qui ne se limitent qu'à une autoréplication dans une moelle intacte, deviennent hautement prolifératifs après une lésion médullaire. Enfin, les cellules épendymaires sont les seules cellules ayant la capacité de générer des cellules multipotentes et de conserver des propriétés de cellule souche neurale au cours du temps avec ou sans traumatisme médullaire (Barnabe-Heider et al., 2010). Tous ces travaux indiquent que les cellules épendymaires, bordant le canal épendymaire, sont les seules cellules souches neurales de la moelle spinale.

A l'heure actuelle, une question demeure sur le profil NSC des cellules épendymaires. Ces cellules épendymaires possèdent-elles toutes des propriétés de cellule souche neurale ou ces propriétés sont détenues par une seule sous-population de cellule épendymaire présente dans la moelle spinale ? Comme décrit précédemment, les cellules épendymaires du canal central constituent une population très hétérogène. Manifestement, la partie dorsale du canal central est la zone où prolifère le plus les cellules épendymaires en condition physiologique (Hamilton et al., 2009). Une étude non publiée, mais librement disponible sur internet, fut réalisée pour tenter de répondre à cette question. En effet, Sabelström mentionne en 2014 dans son manuscrit de thèse, qu'elle a réalisé une étude comparative des cellules épendymaires entre deux lignées de souris transgéniques inductibles. La première lignée, la Glast-CreER où le Cre est sous la dépendance du promoteur Glast (Slezak et al., 2007), a permis précédemment de mettre en évidence l'utilité des péricytes de type A dans les mécanismes de cicatrisation tissulaire après lésion médullaire (Goritz et al., 2011). Bien que cantonnée aux péricytes de type A, Glast est également exprimée par certaines cellules épendymaires en partie dorsale du canal central. Elle constata que les cellules recombinées représentent une sous-population qui se limite au



**Figure 44 : Hétérogénéité fonctionnelle des cellules épendymaires.** (A) Les cellules épendymaires recombinées Glast-CreER (vertes) prolifèrent dans des conditions physiologiques, elles possèdent des capacités d'auto-renouveaulement limitées *in vitro* et elles ne génèrent pas de cellules filles après une lésion de la moelle épinière. (B) Les cellules épendymaires recombinées Troy-CreER (vertes) sont quiescentes en condition physiologique. *In vitro*, ces cellules présentent des propriétés souches avec une capacité d'auto-renouveaulement étendue dans le temps. Après lésion, ces cellules génèrent des oligodendrocytes et des astrocytes qui participent à la cicatrisation tissulaire (Sabelstrom et al., 2013).

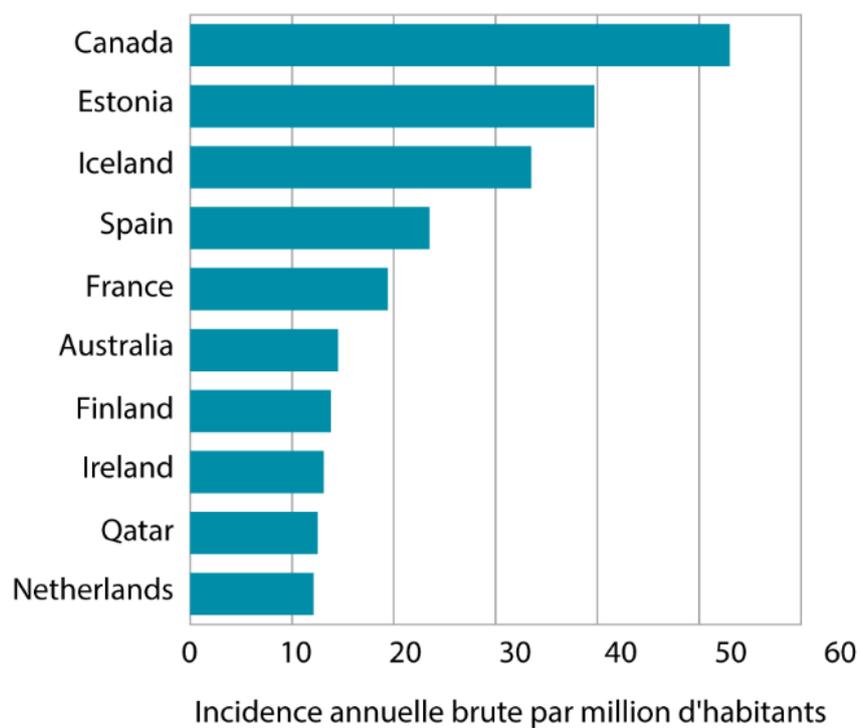
renouvellement des cellules épendymaires en condition physiologique et qui ne présente pas de propriété NSC *in vitro*. Après un traumatisme, ces cellules ne prolifèrent pas et ne participent aucunement à la cicatrice gliale, à l'opposé des cellules recombinaées de la lignée hFoxJ1-CreER (**Figure 44A**).

La seconde lignée utilisée fut la lignée Troy-CreER, sous la dépendance du promoteur Troy. Troy est un récepteur au facteur de nécrose tumorale (*Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19*), décrit comme étant impliqué dans l'activité des cellules souches de certains organes (Stange et al., 2013). Sabelström démontra que les cellules recombinaées Troy sont latentes en condition physiologique mais qu'elles deviennent hautement prolifératives et qu'elles participent activement à la cicatrice gliale suite à un traumatisme médullaire. Elle constata également le potentiel souche de ces cellules recombinaées *in vitro*, comparable à celui de la lignée *FoxJ1* (**Figure 44B**).

En résumé, les cellules épendymaires représentent un type cellulaire complexe, composé de sous-populations aux fonctions diverses au niveau de la moelle spinale. Leur étude pourrait permettre l'amélioration des stratégies thérapeutiques pour les lésions médullaires traumatiques.



# **CHAPITRE III : Les lésions médullaires traumatiques**



**Figure 45 : Variation globale de l'incidence annuelle des lésions médullaires traumatiques (LTM) par pays.** Histogramme représentant l'incidence annuelle brute du nombre de LMT par million d'habitants dans les pays sondés. Selon le rapport de l'OMS, 2014.

Une lésion médullaire est un dommage physique ou une blessure causée à la moelle spinale, conduisant à une altération complète ou partielle de ses fonctions primaires (motrice et sensitive). On distingue deux types de lésions médullaires, les lésions médullaires non-traumatiques qui sont provoquées par une maladie aiguë ou chronique et les lésions médullaires traumatiques (LMT) qui correspondent à une lésion provoquée par une agression physique externe. Dans ce chapitre, seule la lésion médullaire traumatique et ses conséquences physiopathologiques seront abordées.

### I. Incidence

Bien que la lésion médullaire traumatique soit une pathologie relativement rare, elle représente néanmoins un problème majeur de santé publique, principalement dans les pays développés. Actuellement, il est difficile d'obtenir des données statistiques globales fiables du fait du nombre limité de pays communiquant leurs chiffres, mais également du fait d'une grande variabilité méthodologique dans l'enregistrement de ces données. La plupart des analyses statistiques proviennent donc d'estimations déduites de rares rapports publiés. Selon un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) publié en 2014, on estime entre 250 et 500 000 nouveaux cas de lésions médullaires chaque année dans le monde. Les taux d'incidence des LMT varient considérablement à travers le monde. Les LMT fluctuent entre 13 à 50 nouveaux cas par million d'habitants (**Figure 45**). Des disparités géographiques existent également. Ces taux ont tendance à être plus élevés en Amérique du Nord qu'en Europe, probablement en raison d'un plus grand taux de criminalité et d'autodéfense. Toujours selon ce rapport, l'incidence annuelle des LMT en France est estimée entre 10 et 20 nouveaux cas par million d'habitants.

La prévalence des LMT au sein d'une même population est également inégale. En effet, les LMT ont tendance à se produire plus fréquemment chez la population masculine (79,8%) que chez la population féminine (20,2%). L'âge moyen de la population concernée par les LMT est également inégal. Une distribution bimodale de l'âge des individus touchés est constatée, avec un premier pic touchant une population plutôt jeune (entre 16 et 29 ans) et un second, moindre, touchant une population âgée de plus de 50 ans. Cependant, depuis quelques années, un accroissement de l'incidence chez les plus de 50 ans est observé. Cette tendance s'explique par le vieillissement démographique de la population des pays industrialisés résultant d'une amélioration de la qualité de vie et du faible taux de fécondité depuis plusieurs décennies. A titre d'exemple, cette part de la population aux Etats-Unis est passée de 4,6% en 1970 à 13,2% en 2008 (Chen et al., 2016; Devivo, 2012; DeVivo et al., 2011).



### II. Etiologie

Les LMT représentent environ 90% des lésions médullaires enregistrées chaque année dans le monde. Dans la plupart des cas, ces traumatismes sont engendrés par des causes évitables, comme des accidents de la circulation, des accidents domestiques ou par la violence criminelle. Bien que stable, (voire déclinante dans certaines régions), la cause principale de LMT dans les pays de l'OMS reste les accidents dûs à la circulation. Ces chiffres sont néanmoins variables et peuvent être mis en corrélation avec le niveau de développement des pays analysés. En effet dans certaines régions d'Afrique, le taux de LMT imputable aux transports atteints plus de 70%, alors qu'aux Etats-Unis ce taux atteint 38% des LMT sur la période 2010-2014 (Ahuja et al., 2017). Ces chiffres tendent à diminuer du fait de l'amélioration des équipements de sécurité et des infrastructures, surtout dans les pays développés.

La seconde cause de LMT dans le monde correspond aux accidents dits de type « domestiques », comme les chutes ou les activités de loisirs représentant 20 à 40 pourcents des LMT. Les activités économiques, tel que le secteur de la construction, sont impliquées dans l'étiologie des LMT, surtout dans les pays en voie de développement où les standards en terme de sécurité sont moins rigoureux. Dans les pays développés, la cause principale source de chute reste d'origine domestique et survient surtout chez les personnes de plus de 50 ans. Ces chutes sont souvent de faibles hauteurs (inférieure à 1 mètre), et se produisent majoritairement dans l'environnement privé (domicile). Les accidents liés aux activités dites récréatives (loisirs sportifs) engendrent également de nombreuses lésions de la moelle spinale, surtout chez les individus jeunes des pays développés.

Les activités humaines violentes constituent la troisième source la plus fréquente de LMT dans le monde. Ces activités correspondent principalement à l'utilisation d'armes conventionnelles (arme à feu, armes blanches) dans le cadre d'un conflit armé ou durant une situation d'agression (offensive ou défensive). L'énergie cinétique libérée par ces armes est suffisante pour entraîner des lésions tissulaires notables conduisant à des LMT. Les taux les plus importants de LMT engendrés par des actes violents sont enregistrés dans les principales zones subissant des conflits armés (ex : Afghanistan 60% des LMT), mais également dans les pays où la législation sur la circulation des armes à feu est la plus tolérante (ex : USA 11% des LMT, jusqu'à 28% en fonction du groupe ethnique).

La localisation de la lésion sur la moelle est également très variée parmi les individus ayant subis une LMT. Globalement, les statistiques menées sur ces patients révèlent que les



lésions médullaires se situent majoritairement au niveau cervical (environ 60 %), puis lombaire (environ 32 %) et lombo-sacré (environ 9%) (Ahuja et al., 2017).

### III. Mortalité

Bien que la survie des patients médullo-lésés se soit nettement améliorée au cours du temps, le taux de mortalité de ces patients reste très élevé. En effet, durant la phase aiguë du traumatisme, le taux de mortalité des patients admis pour une LMT en milieu hospitalier varie de 4 à 17 %. Une fois les patients stabilisés et sortis de l'hôpital, le taux de mortalité chez ces patients médullo-lésés reste encore élevé. Durant la première année, 3,8 % des patients décèdent des suites de leur traumatisme, 1,6 % durant la seconde année et enfin 1,2 % chaque année qui suit la LMT.

Le risque de mortalité de ces patients est également exacerbé selon la localisation de leur lésion. En effet, plus celle-ci se situe haut sur la moelle spinale plus le risque de décès augmente. D'un point de vue statistique, les lésions médullaires cervicales sont associées à un plus grand taux de mortalité que les lésions médullaires lombaires.

L'âge est également un facteur important dans la durée de survie du patient médullo-lésé. Malgré l'amélioration de la prise en charge des LMT, ces patients restent fragiles et voient fréquemment leur espérance de vie largement diminuée du fait des conséquences de leur traumatisme. Statistiquement, un individu âgé de 40 ans subissant une LMT au niveau cervical (entre C5-C8) a une espérance de vie de 23 ans après la lésion. Cette durée de vie descend à 20 ans si la lésion se localise entre C1-C4 et tombe à 8,5 ans si l'état du patient nécessite une assistance respiratoire permanente (2016).

### IV. Description physiopathologique de la lésion médullaire traumatique

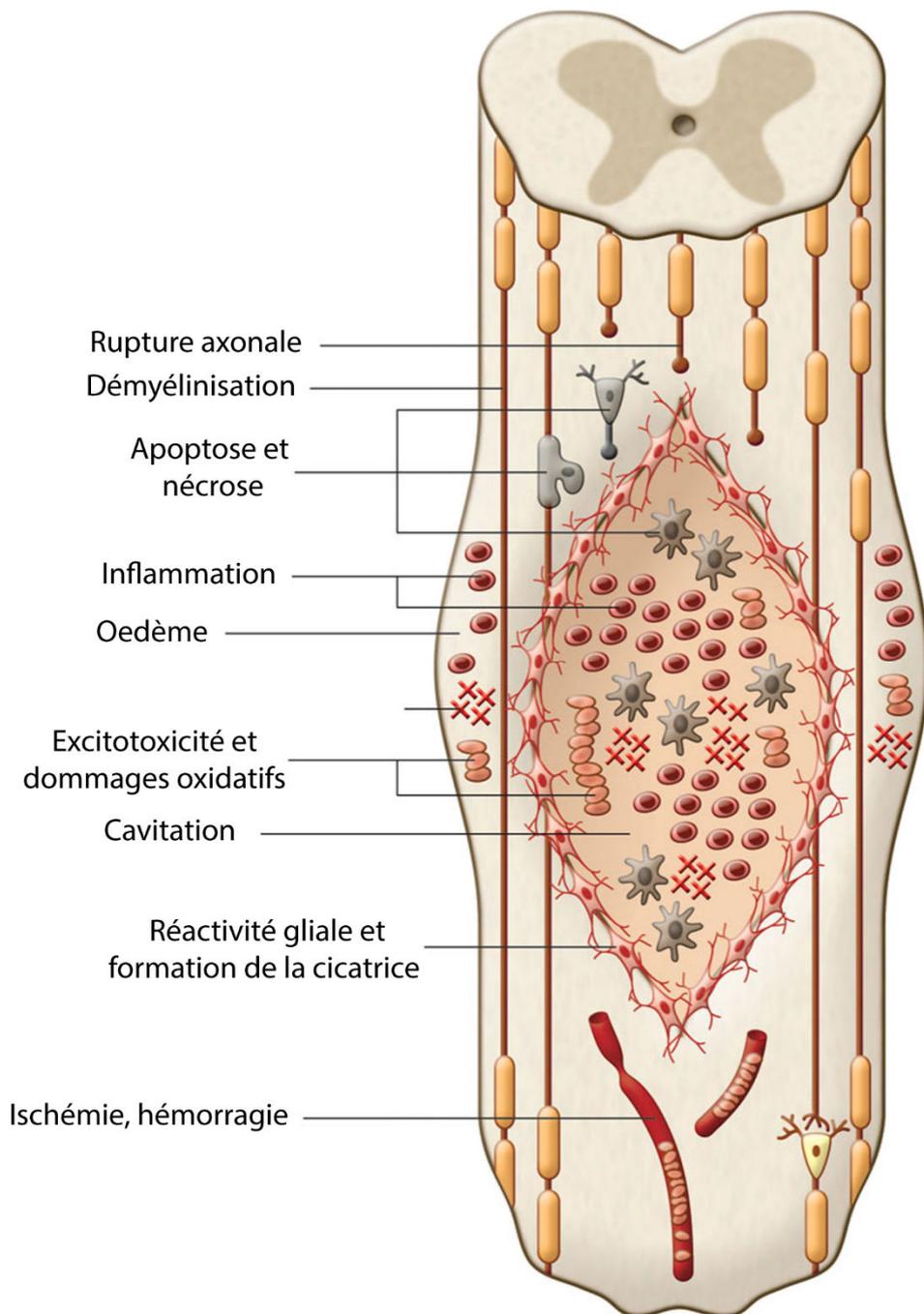
Depuis plus d'un siècle, les différentes études menées sur les LMT permettent à l'heure actuelle de mieux comprendre les différents processus biologiques qui s'opèrent à la suite du traumatisme. Il est maintenant bien établi, que les lésions médullaires débouchent sur un processus physiopathologique biphasique, comprenant une phase primaire et une phase secondaire.



### 1. La phase primaire

La phase primaire est la phase traumatique la plus aigüe lors d'une LMT. Elle correspond principalement aux contraintes mécaniques qui vont s'appliquer sur le tissu nerveux au moment du traumatisme. Actuellement, on distingue quatre profils de lésion primaire différents au niveau de la moelle spinale : un choc induisant une compression continue du tissu médullaire, un choc seul suivi d'une brève compression, une distraction médullaire et une lacération ou contusion médullaire (Dumont et al., 2001). Le traumatisme médullaire le plus communément rencontré chez l'Homme est un impact de l'épine dorsale, accompagné d'une compression médullaire continue. En effet, un choc direct va entraîner une fracturation des vertèbres et/ou une rupture des disques intravertébraux environnants. Ces fragments osseux ou discaux rétropulsés dans le canal rachidien vont conduire à un déplacement du cordon nerveux qui va se retrouver comprimer dans le canal rachidien. Le second type est une compression simple de la moelle due à son déplacement transitoire pendant l'impact. Ce type de lésion est fréquemment observé chez des patients souffrant de dégénérescence cervicale. La distraction médullaire consiste en un étirement forcé de la colonne vertébrale, entraînant une elongation ou un déchirement de la moelle spinale et/ou du système vasculaire médullaire. La lacération/transsection constitue le dernier type de lésion primaire fréquemment décrit. Elle consiste en une lacération du tissu médullaire résultant de la pénétration d'un objet contondant (fragment balistique, arme blanche,...), ou de fragments pointus (tranchants) issus d'une dislocation osseuse, ou d'une distraction médullaire trop importante. Dans certains cas, ces différents éléments peuvent conduire à une transsection du tissu nerveux médullaire, complète ou partielle (Dumont et al., 2001; Oyinbo, 2011).

Toutes les lésions primaires conduisent fréquemment à une altération de l'intégrité tissulaire et donc cellulaire de la moelle spinale. Généralement, les forces libérées au moment de l'impact conduisent à une rupture des faisceaux axonaux, une lésion de la structure vasculaire médullaire et une altération des structures cellulaires importante (McDonald and Sadowsky, 2002). La lésion mécanique initiale tend à toucher plus durement la substance grise que la substance blanche. Ceci viendrait du fait que la substance grise possède une plus faible consistance et une plus grande vascularisation (Dumont et al., 2001; Wolman, 1965). La détérioration de l'intégrité tissulaire et de la destruction cellulaire occasionnées durant la phase primaire ne sont pas les seuls dommages infligés à la moelle spinale par le traumatisme initial. En effet, la lésion primaire est l'élément initiateur d'une réaction en cascade de processus physiopathologiques qui conduiront à l'établissement d'une nouvelle lésion dite secondaire.



**Figure 46 : Physiopathologie de la lésion médullaire traumatique.** Ce diagramme représente synthétiquement les différents événements physiopathologiques se déroulant après une LMT, durant la phase aiguë, subaiguë et chronique (Mothe and Tator, 2013).

### 2. La phase secondaire

La phase secondaire de la lésion médullaire correspond à l'ensemble des mécanismes biologiques activés par l'altération tissulaire consécutive à la lésion primaire (Mothe and Tator, 2013) (**Figure 46**). Cette phase se caractérise par l'apparition de phénomènes, comme la nécrose, des dysfonctions vasculaires, une excitotoxicité, un stress oxydatif, la libération de radicaux libres et une réponse inflammatoire, contribuant à la formation d'une seconde lésion médullaire. Tous ces phénomènes ont pour effet d'exacerber les dommages tissulaires et neurologiques déjà présents. De plus, durant cette phase secondaire, un microenvironnement inhibiteur va progressivement se former rendant toute régénération cellulaire endogène spontanée ou tout mécanisme de remyélinisation difficile (Dasari et al., 2014; Siddiqui et al., 2015). Actuellement, cette phase secondaire est subdivisée en plusieurs phases qui suivent une séquence chronologique distincte mais dont les processus physiopathologiques caractérisant chaque séquence peuvent perdurer d'une phase à une autre.

#### a. La phase immédiate

Cette première phase correspond aux deux premières heures qui suivent la lésion primaire. Les cellules neuronales, gliales et endothéliales ayant subies des altérations de leur structure durant l'impact initial, meurent rapidement. Ce phénomène nécrotique entraîne la libération des contenus cytoplasmiques dans l'espace interstitiel de la moelle au niveau du site de lésion. Les contraintes mécaniques sur le tissu engendrent l'apparition de microhémorragies, d'ischémies, d'œdèmes, consécutifs à la rupture des vaisseaux sanguins et l'altération des membranes plasmiques des cellules endothéliales. Tous ces éléments s'accompagnent d'un phénomène de « choc spinal » qui conduit à des atteintes neurologiques complètes sous le site de lésion.

Dès le début de la phase immédiate, entre cinq et quinze minutes, les cellules immunitaires innées résidentes (les cellules microgliales) s'activent, prolifèrent et commencent la production de cytokines pro-inflammatoires comme le « *Tumor necrosis factor alpha* » (TNF $\alpha$ ), l'interleukine 1 beta (IL-1 $\beta$ ) ou l'interleukine 6 (IL-6) (David and Kroner, 2011; Pineau and Lacroix, 2007). Du fait de la rupture de certains faisceaux axonaux, la lésion entraîne également une accumulation de glutamate dans l'espace extracellulaire jusqu'à atteindre un seuil excitotoxique (Park et al., 2004). Cette première phase immédiate passée, s'ensuit la phase aigüe de la phase secondaire.



### **b. La phase aigue**

Cette phase peut se subdiviser en deux parties avec une phase aigüe précoce et une autre subaigüe.

#### **Phase aigüe précoce**

La phase aigüe précoce se déroule entre deux et quarante-huit heures suivant la lésion primaire. Les problèmes vasculaires persistent et aggravent graduellement les dommages tissulaires au niveau du site de lésion et au-delà. Les microhémorragies et les ischémies prolongées induites par l'interruption de la microcirculation, l'hypotension ainsi que l'augmentation de la pression interstitielle conduisent à une hypoperfusion du tissu nerveux au sein de la zone lésionnelle (Mautes et al., 2000; Siddiqui et al., 2015). Ces processus vasculaires entraînent progressivement une augmentation de perméabilité de la barrière hémato-médullaire. La lésion médullaire conduit à une hausse de la perméabilité de la barrière hémato-médullaire du fait de la rupture mécanique des structures vasculaires et de la sécrétion de médiateurs inflammatoires par les cellules endothéliales lésées (Rowland et al., 2008; Zhang et al., 2012). Dans un modèle de compression médullaire chez le rat, le pic de perméabilité de la barrière hémato-médullaire est maximale vingt-quatre heures après la lésion et perdure durant les deux semaines suivantes (Figley et al., 2014; Noble and Wrathall, 1989). Cette hausse de la perméabilité est exacerbée par l'activation progressive du système immunitaire. Cette activation du système immunitaire est importante pour la repousse axonale des neurones épargnés, car elle permet l'élimination des débris cellulaires (Oyinbo, 2011). Ainsi, le relâchement de la barrière permet le recrutement des cellules du système immunitaire, telles que les lymphocytes T, les neutrophiles et les monocytes au niveau du site de lésion. Dès le début de la lésion, la microglie résidante prolifère et secrète des cytokines qui vont induire la production de chimiokines (Tzekou and Fehlings, 2014). En moins de vingt-quatre heures, les neutrophiles arrivent les premiers au niveau des lésions via le système circulatoire. La présence de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales tel que ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule*) ou VCAM-1 (*Vascular cell adhesion protein 1*) facilite leur extravasation au travers de la barrière hémato-médullaire (Carlson et al., 1998). Ces cellules assurent l'élimination des débris tissulaires et des intrus microbiens par le phénomène de « *burst* respiratoire ». Elles produisent également des cytokines, des métalloprotéases matricielles (MMP), des superoxydes dismutases et des myéloperoxydases (Siddiqui et al., 2015). Les neutrophiles facilitent le chimiotaxisme et l'extravasation des leucocytes ainsi que l'activation des cellules gliales (Neirinckx et al., 2014). Les monocytes sont ensuite recrutés au moment où



le niveau de neutrophiles est suffisant. Dans les soixante-douze heures qui suivent la lésion, ces monocytes nouvellement recrutés, commencent à se différencier en macrophages. Ils produisent alors du glutamate, du TNF- $\alpha$ , de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-6 ainsi que des prostanoïdes (COX-1, pour cyclooxygenase-1) (Schwab et al., 2000). Sept jours après la lésion, la population de macrophage diminue peu à peu, la population microgliale reste toujours active (Donnelly and Popovich, 2008). Chez le rat, les lymphocytes envahissent la lésion au même moment que les monocytes, soit de 3-7 jours post-lésion. À l'inverse, il a été constaté que cette invasion est retardée à environ un mois après la lésion chez la souris et chez l'Homme (Kigerl et al., 2006; Sroga et al., 2003). La réaction du système immunitaire face à une lésion médullaire traumatique constitue une arme à double tranchant car l'activation des cellules immunitaires et la production de cytokines inflammatoires ont à la fois des effets délétères et des effets bénéfiques après lésion. En effet, l'administration d'un cocktail inflammatoire (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6) quatre jours après la lésion réduit l'infiltration macrophagique, l'activation microgliale et la perte tissulaire (Klusman and Schwab, 1997). Mais, l'administration de ce même cocktail vingt-quatre heures après la lésion augmente la perte tissulaire. L'enrayement de la migration des neutrophiles par l'inhibition des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales diminue de façon remarquable la sévérité de la LMT induite par une compression médullaire (Taoka et al., 1997; Zhang et al., 2012). La microglie et les macrophages ont également démontré une certaine dualité dans leur comportement face au traumatisme médullaire. Du fait de leur hétérogénéité, l'état d'activation des macrophages peut être de type pro-inflammatoire (macrophages de type M1) ou de type neuro-protecteur (macrophage de type M2) (David and Kroner, 2011; Kobayashi et al., 2013). Tout ceci suggère que le *timing* de la réponse inflammatoire est un élément crucial dans l'établissement d'une réponse immunitaire destructrice ou protectrice. Toute la difficulté pour les chercheurs actuels est de déterminer la fenêtre de temps adéquate pour l'établissement d'un traitement immuno-modulateur permettant l'atténuation des dommages de la lésion secondaire.

Les phénomènes ischémiques et l'infiltration des leucocytes entraînent la production d'un stress oxydant et la formation de nombreux radicaux libres. Après une LMT, il y a une grande production d'espèces dérivées de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*) et des espèces dérivées de l'azote (RNS, *Reactive Nitrogen Species*) du fait de l'élévation du calcium intracellulaire, des dysfonctionnements mitochondriaux et de l'activation de l'oxyde nitrique synthase (Oyinbo, 2011). Ces dérivés peuvent être produits par les macrophages et les cellules microgliales mais également résulter de l'ischémie tissulaire ou de la reperfusion sanguine



(Siddiqui et al., 2015). Les ROS et RNS causent la peroxydation lipidique au niveau de la lésion, ce qui provoque une instabilité membranaire induisant une réaction en chaîne se terminant par une lyse membranaire et donc une mort par nécrose. Ils participent également aux phénomènes de stress oxydatif et nitritique qui endommagent les acides nucléiques et les protéines, conduisant également à une mort neuronale (Xu et al., 2005). Le stress oxydatif aboutit à l'émergence de phénomènes apoptotiques exacerbants les dysfonctionnements mitochondriaux en contribuant à la détérioration du cytosquelette par les protéases via l'accumulation de calcium intracellulaire. Les ROS et RNS sont des éléments centraux de la LMT, car ils sont à l'origine des nombreux phénomènes de mort cellulaire nécrotique ou apoptotique qui peuvent toucher les neurones, ainsi que les cellules gliales et la microglie (Beattie et al., 2000; Oyinbo, 2011). Leur niveau d'expression est maximal dès douze heures après la lésion et reste élevé durant une semaine.

Les dysfonctionnements de l'équilibre ionique ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ) et l'excitotoxicité induits par la LMT contribuent aux dommages cellulaires. La régulation calcique est un processus important dans la prévention de la mort cellulaire. Sa dé-régularisation cause des dysfonctionnements mitochondriaux, la production de radicaux libres et l'activation de la protéase calpaïne, qui conduisent au déclenchement du processus apoptotique (Momeni, 2011; Siddiqui et al., 2015). Par ailleurs, la disruption des transporteurs membranaires qui assuraient l'homéostasie des ions et du glutamate avant la lésion, conduit à l'élévation de la quantité de glutamate dans l'espace intracellulaire. La sur-activation des récepteurs aux glutamates, NMDA et AMPA, conduit à un influx massif d'ions calcium et sodium dans la cellule et induit une dé-régularisation de l'activité métabolique et mitochondriale ainsi qu'une perte d'équilibre osmotique. Ceci aboutit à une mort cellulaire par un phénomène d'excitotoxicité médullaire (Park et al., 2004).

Les dernières conséquences de ces processus décrits précédemment durant la phase aiguë sont les phénomènes de mort cellulaire et de démyélinisation. La majorité des cellules neurales meurent par nécrose des suites du traumatisme. Néanmoins le phénomène d'apoptose joue également un rôle prépondérant dans la lésion secondaire. En effet, il a été constaté dans des modèles expérimentaux que l'apoptose chez les oligodendrocytes était un élément important du phénomène de démyélinisation axonale. La mort par apoptose des oligodendrocytes est un mécanisme fréquent après LMT et contribue à amplifier les problèmes neurologiques après la lésion (Li et al., 1999). Il semble que ce mécanisme perdure dans le temps (jusqu'à trois semaines après la lésion) et qu'il ne se restreigne pas seulement à la zone



lésionnelle (Almad et al., 2011). Il a été démontré que ce mécanisme était dépendant de l'activation des récepteurs Fas et du récepteur aux neurotrophine, p75<sup>ntr</sup> (Casha et al., 2001). Après lésion médullaire, l'expression des récepteurs Fas est augmentée chez les oligodendrocytes, les lymphocytes et la microglie, ainsi que ses ligands. L'interaction récepteur Fas et son ligand conduit au déclenchement de l'apoptose par l'activation des caspases (Caspases-3,-6 et 8) (Austin and Fehlings, 2008; Casha et al., 2001, 2005). Des études montrent que l'inhibition de la mort cellulaire médiée par Fas après lésion médullaire améliore la récupération fonctionnelle et réduit la dégénérescence axonale post-traumatique durant la phase aiguë de la LMT (Ackery et al., 2006). Certains de ces mécanismes se poursuivent durant la seconde phase de la phase secondaire, c'est la phase subaiguë.

### **Phase subaiguë**

Cette phase prend place environ deux jours après la lésion et se termine deux semaines plus tard. Durant cette phase, les astrocytes, qui n'ont pas été détruits par les phénomènes nécrotiques, deviennent hyperactifs, prolifèrent rapidement et s'hypertrophient (O'Shea et al., 2017). Cette réactivité astrocytaire au niveau de la zone lésionnelle participe à la formation des bordures de la cicatrice gliale. Les cellules épendymaires bordant le canal central commencent également à proliférer extensivement au niveau de la lésion et à se différencier en astrocytes (Stenudd et al., 2015). Les cellules stromales issues d'un sous-type de péricytes qui composent les vaisseaux sanguins médullaires, appelés péricytes de types A, commencent également à participer au processus de cicatrisation en envahissant le cœur de la lésion afin de la sceller (Goritz et al., 2011). Les cellules du tissu cicatriciel commencent à sécréter des molécules inhibitrices de la repousse axonale, tel que les *chondroïtin sulfate proteoglycan* (CSPGs) (Fitch and Silver, 2008). L'établissement d'une cicatrice gliale est un mécanisme critique pour la protection de l'intégrité tissulaire de la moelle spinale lésée. La cicatrice protège la moelle d'une expansion de la zone lésionnelle par le confinement des cellules inflammatoires au cœur de la lésion. Sa perte ou son dysfonctionnement se traduit par une propagation de l'inflammation qui engendre un accroissement de la zone lésionnelle et une dégradation des fonctions neurologiques (O'Shea et al., 2017; Sofroniew, 2015).

### **c. La phase intermédiaire**

Elle débute quinze jours après le traumatisme et se prolonge pendant six mois. Durant cette période, la réactivité des cellules gliales perdure au niveau de la cicatrice qui commence à devenir mature. Par ailleurs, on observe rostralement ou caudalement l'apparition spontanée



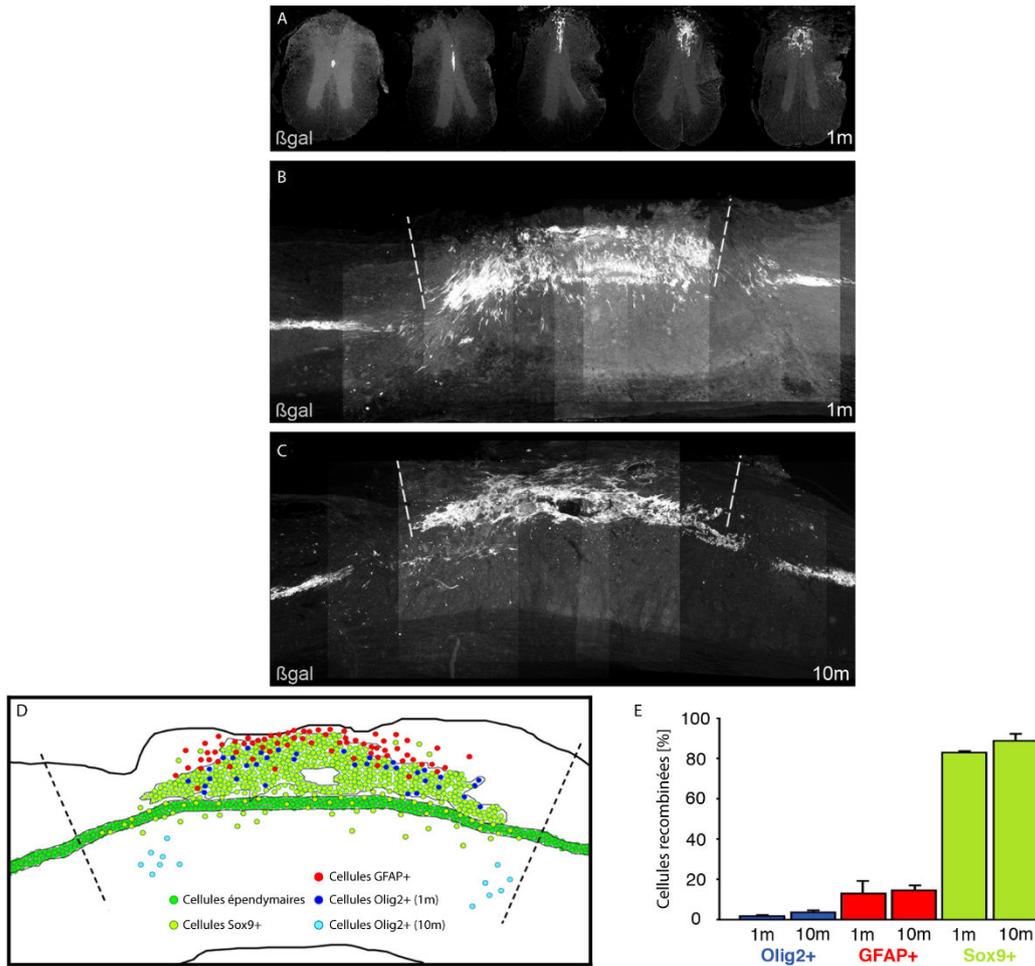
de bourgeonnements axonaux au niveau des faisceaux cortico-spinaux et des fibres réticulo-spinales (Oudega and Perez, 2012). Néanmoins, ce bourgeonnement axonal ne se traduit pas par une amélioration significative des fonctions motrices ou sensitives.

### **d. La phase chronique**

La phase aigüe de la lésion passée, la moelle spinale lésée se stabilise et s'installe dans un processus de pathologie chronique. Chez l'Homme, cette phase débute six mois environ après la blessure médullaire initiale et persiste durant toute la durée de vie de l'individu. A cet instant, la cicatrice gliale est pleinement mature, les différentes couches cellulaires se stabilisent et conduisent au développement de cavités kystiques et syringomyéliques (O'Shea et al., 2017; Rowland et al., 2008). L'apparition de cavités kystiques provient de l'élimination des débris cellulaires par la microglie et les macrophages, consécutive à la dégradation progressive du tissu nerveux. Généralement, au moment du traumatisme, tous les axones ne sont pas endommagés, certaines fibres en périphérie des cavités se trouvent épargnées. Ces cavités constituent malheureusement un obstacle physique pour une possible régénération axonale (Rowland et al., 2008; Siddiqui et al., 2015). De plus, il fut constaté que les axones endommagés par le traumatisme initial continuent de dépérir durant une longue période. Les extrémités distales de ces axones subissent une dégénérescence Wallérienne, conduisant à une perte tissulaire supplémentaire et des perturbations au niveau des circuits neuronaux résiduels (Beattie et al., 2000; Beattie et al., 2002).

### **3. L'origine des nouvelles cellules en réponse à une lésion médullaire**

La LMT résulte d'une perte massive de neurones, d'astrocytes, d'oligodendrocytes et induit une spectaculaire augmentation du taux de prolifération, suivie du recrutement de cellules au niveau du site de lésion. Les cellules épendymaires, qui prolifèrent habituellement peu, se retrouvent activées après une lésion médullaire et augmentent leur taux de prolifération (50 fois plus qu'au premier jour) (Johansson et al., 1999). Cette augmentation du taux de prolifération se retrouve également *in vitro*, où le nombre de neurosphères générées à partir d'un tissu médullo-lésé est largement supérieur à celui d'un tissu sain (Barnabe-Heider et al., 2010). La réactivité des cellules épendymaires reste confinée au seul segment lésé, et de façon surprenante, est absente au niveau des segments adjacents, pourtant indirectement affectés par la rupture des faisceaux axonaux et la dégénérescence Wallérienne (Meletis et al., 2008). Dans les trois jours qui suivent la lésion médullaire, la progéniture des cellules épendymaires commence à quitter la région du canal central pour migrer en direction de la zone lésionnelle



**Figure 47 : Contribution des cellules épendymaires à la cicatrice gliale après lésion médullaire.** (A) Distribution des cellules épendymaires  $\beta$ gal positives recombinaisons chez la souris hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup> après 5 jours d'administration de Tamoxifène en coupe transversale à partir d'un segment médullaire non lésé (à gauche), vers l'épicentre de la lésion (à droite) 1 mois après la lésion. (B et C) Coupes longitudinales représentant la distribution de ces mêmes cellules recombinaisons après lésion du *funiculus dorsalis* (zone de lésion en pointillée) 1 mois après la lésion (B) ou 10 mois (C). (D) Schématisation synthétique (basée sur la figure C) de la distribution des cellules épendymaires recombinaisons et des différents types cellulaires qu'elles ont générées au cours du temps. (E) Evaluation statistique des marqueurs spécifiques de type cellulaire exprimés par les cellules épendymaires, recombinaisons après lésion médullaire. Le type oligodendrocyte est identifié par le marqueur Olig2, les astrocytes par la GFAP et les cellules épendymaires par le Sox9 (Meletis et al., 2008).

(Figure 47) (Johansson et al., 1999; Meletis et al., 2008; Mothe and Tator, 2005). Durant leur migration vers le site de lésion, ces cellules perdent leur caractéristique de cellules épendymaires par une régulation négative de marqueurs, comme Sox2, Sox3 et FoxJ1. La plupart des cellules filles commencent à présenter des caractéristiques semblables à des astrocytes (marqueur et ultrastructure) qui participent activement à la cicatrice gliale (Meletis et al., 2008). Ces nouveaux astrocytes, dérivés de cellules épendymaires, peuplent le cœur de la lésion entourant les cellules stromales fibroblastes-like, qui constituent le centre de la cicatrice en formation (Barnabe-Heider et al., 2010; O'Shea et al., 2017). Ces cellules stromales dérivent d'une sous-population de péricytes de type A, qui prolifèrent énergiquement en réponse à une lésion médullaire. Ces péricytes de type A sont les cellules composant la paroi des vaisseaux sanguins au niveau du parenchyme médullaire. Ils séparent les cellules endothéliales des extensions astrocytaires. Dans les heures qui suivent une LMT, la zone de lésion est presque dépourvue de vaisseaux sanguins mais à partir du troisième jour, de nouveaux vaisseaux apparaissent dans la lésion. Ce phénomène s'accompagne d'un accroissement de la densité en péricyte qui accompagne les cellules endothéliales formant les nouveaux vaisseaux. Certains de ces péricytes, les types A, se détachent de la paroi des vaisseaux sanguins qui ont envahi la lésion et commencent à changer morphologiquement. Ils se différencient progressivement en cellules stromales et participent activement à la formation de la couche fibrotique de la cicatrice gliale (Goritz et al., 2011). La formation de cellules stromales est nécessaire pour sceller la lésion et pour retrouver une intégrité tissulaire.

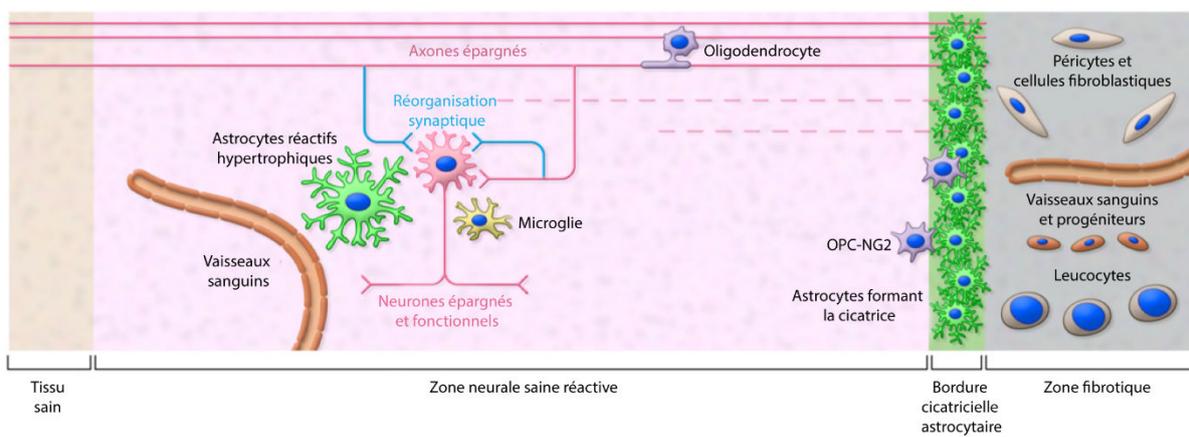
Les astrocytes issus de cellules épendymaires persistent de façon chronique au niveau de la cicatrice et représentent plus de la moitié des nouveaux astrocytes au sein de la cicatrice gliale (Barnabe-Heider et al., 2010). Ces astrocytes dérivés des cellules épendymaires sont légèrement différents de ceux issus des astrocytes résidents, d'un point de vue phénotypique. D'après Meletis, peu de ces astrocytes expriment le marqueur GFAP (Meletis et al., 2008). Après une lésion, la population d'astrocytes résidents s'accroît rapidement du fait d'une augmentation spectaculaire du taux de prolifération, comparable à celui des péricytes. Ces nouveaux astrocytes résidents exprimant la GFAP vont former les bords extérieurs de la cicatrice gliale. A l'heure actuelle, l'existence de différences fonctionnelles entre ces astrocytes résidents et ceux provenant de cellules épendymaires n'est que très peu documentée. Récemment, des études ont mis en évidence des comportements différents au sein d'une même population d'astrocytes résidents. En effet, certains astrocytes exerceraient des effets nuisibles



pour la repousse axonale et d'autres des effets bénéfiques (Anderson et al., 2016; Burda and Sofroniew, 2014).

La perte en oligodendrocytes est également un élément important du traumatisme médullaire car les neurones se retrouvent sans leur gaine de myéline, ce qui, avec le temps exacerbe la mort neuronale et les problèmes neurologiques (Grossman et al., 2001). Bien que de nouveaux oligodendrocytes myélinisants soient formés après une lésion médullaire, le niveau initial de myélinisation des neurones ne sera jamais retrouvé (Totoiu and Keirstead, 2005). Les oligodendrocytes matures, ayant survécus au traumatisme, sont incapables de remplacer ceux disparus. Il est maintenant bien établi que les OPC sont les principales cellules qui prolifèrent en condition physiologique dans la moelle spinale pour former les oligodendrocytes matures (Barnabe-Heider et al., 2010). Ces précurseurs d'oligodendrocytes furent décrits comme des OPC-NG2 du fait de leur expression de l'antigène NG2. Après une lésion, ces OPC-NG2 augmentent significativement leur de taux de prolifération mais en proportion moindre en comparaison des autres types cellulaires de la moelle spinale (Hackett and Lee, 2016). Ces OPC se différencient ensuite en oligodendrocytes matures. Une partie de ces cellules reste néanmoins des OPC-NG2 et participe à la cicatrice gliale. Ces OPC-NG2 sont dit réactifs car comme les astrocytes, ils s'hypertrophient et surexpriment des CSPGs (O'Shea et al., 2017). Une proportion de ces nouveaux OPC dérive des cellules épendymaires du canal central (Barnabe-Heider et al., 2010; Meletis et al., 2008). Dix mois après la lésion, ces cellules dérivées des cellules épendymaires résident principalement dans la zone lésionnelle. Une petite fraction se retrouve clairsemée au sein du parenchyme et se différencie en oligodendrocytes matures myélinisants (Meletis et al., 2008).

Une population cellulaire au niveau de la substance blanche, caractérisée comme des cellules gliales radiaires médullaires, fut suspectée d'être une population de progéniteurs neuronaux ou de NSC du fait de l'expression de marqueurs associés aux cellules souches neurales, comme BLBP (*Brain Lipid Binding Protein*), Vimentin, Nestine et Sox2 (Petit et al., 2011). Petit et ses collègues démontrèrent une augmentation de la division de ces cellules au niveau de la zone marginale de la substance blanche et une surrégulation de l'expression de gènes associés aux NSC. Une étude évaluant l'intérêt d'une transplantation d'un tunnel synthétique (à base de chitosane afin de promouvoir la régénération axonale au travers de la lésion après LMT), a mis en évidence la présence de ces cellules radiaires au sein du tube de polysaccharides. Ils constatèrent que ces cellules endogènes permettaient le guidage des nouveaux axones en croissance au sein du tube synthétique et encourageaient la réparation



**Figure 48 : Les lésions médullaires traumatiques forment des régions tissulaires spécifiques.** Illustration schématique des différentes zones tissulaires, composées de cellules neurales et non neurales qui apparaissent à la suite d'une LMT (O'Shea et al., 2017).

tissulaire après lésion médullaire (Nomura et al., 2010). Le comportement de ces cellules après lésion médullaire est similaire à celui des cellules gliales du canal central des poissons zèbres, qui forment un pont au travers de la lésion pour accompagner les axones et faciliter leur repousse après une transection médullaire (Goldshmit et al., 2012; Mokalled et al., 2016). Des études complémentaires sont encore nécessaires pour confirmer leur propriété souche au sein de la moelle spinale de mammifère.

Récemment, l'expression des marqueurs Nestine et DCX a été identifiée au sein des cellules composant la méninge des moelles spinales adultes. Ces cellules ont démontré une capacité à former des neurosphères, à se différencier en oligodendrocytes et en neurones immatures *in vitro*. Après une lésion médullaire, les cellules méningées augmentent leur prolifération et migrent extensivement au sein du parenchyme où elles participent à l'établissement de la cicatrice gliale (Decimo et al., 2011; Decimo et al., 2012). D'après les auteurs, les cellules de la méninge pourraient constituer une nouvelle population de cellules souches ou progénitrices au sein de la moelle spinale adulte. Ces données peuvent être mises en corrélation avec les travaux de Nakagomi, qui démontrèrent des propriétés souches de la part des cellules de la leptoméninge après ischémie cérébrale (Nakagomi et al., 2011). Toutes ces cellules répondant à la lésion médullaire ont pour point commun leur participation à l'établissement de la cicatrice gliale.

#### 4. La cicatrice gliale

En fonction de l'importance des lésions traumatiques médullaires, celle-ci peuvent conduire à l'apparition d'une zone cicatricielle hermétique, remplie de composants cellulaires et d'éléments de la MEC. Indépendamment du type de lésion ou de la taille, le tissu cicatriciel médullaire mature peut se diviser en trois zones tissulaires distinctes ayant des propriétés cellulaires spécifiques. Ainsi, on peut observer après une LMT, la zone centrale non neurale de la lésion (également appelée zone de lésion fibrotique), la cicatrice gliale qui encercle la zone fibrotique et la zone neurale saine mais réactive qui entoure l'ensemble de la lésion (Burda and Sofroniew, 2014). Ces trois zones tissulaires présentent des compositions cellulaires et des interactions fonctionnelles très différentes (O'Shea et al., 2017) (**Figure 48**).

##### a. La zone fibrotique

Les dommages cellulaires après une LMT sont médiés par les forces physiques engendrées par l'impact, les dommages métaboliques et les phénomènes ischémiques. L'accumulation de débris cellulaires conduit, avec le temps, à l'établissement d'un



environnement toxique pour le tissu nerveux (Hawkins and Devitt, 2013). C'est pour cela que dès les minutes qui suivent la lésion primaire, des mécanismes finement équilibrés se mettent en place pour le nettoyage des débris cellulaires dans la zone de lésion et tentent d'épargner le tissu neural avoisinant potentiellement fonctionnel. Parmi ces mécanismes, la réponse du système immunitaire inné met en place la dépollution des déchets cellulaires de la moelle. Les cellules microgliales et les astrocytes sont les premières cellules qui commencent le processus de cicatrisation avec l'élimination des déchets, mais leur capacité à phagocyter est limitée. Afin de palier cela, ces cellules recrutent des cellules immunitaires professionnelles depuis la circulation sanguine par la production de facteurs de croissance, de cytokines et de chimiokines. Ainsi, au cœur de la lésion se produit un recrutement massif de cellules immunitaires, comme des macrophages dérivés de monocytes, des neutrophiles et des lymphocytes, qui s'appliquent au nettoyage des débris cellulaires (Burda and Sofroniew, 2014). Parallèlement, la rupture vasculaire et tissulaire entraîne l'apparition massive de fibroblastes méningés, de fibroblastes périvasculaires dérivés de cellules stromales et de péricytes qui se mettent à proliférer dans le cœur de la lésion (Goritz et al., 2011; Soderblom et al., 2013). A mesure que les débris cellulaires sont éliminés et que la lésion mature, un tissu cicatriciel commence à se former en son centre. Il se compose principalement d'un enchevêtrement de ces cellules stromales non neurales et de progéniteurs de cellules endothéliales, accompagné de vaisseaux sanguins néoformés. On note également une présence importante de cellules de la circulation sanguine, comme des fibrocytes, les cellules immunitaires et une accumulation de composants de la MEC. Au cours du temps, ces cellules immunitaires vont peu à peu quitter le cœur de la lésion et laisser place à la zone cicatricielle fibrotique.

#### **b. La zone gliale**

Cette zone tissulaire est spécifique au processus de cicatrisation du tissu nerveux central et se met en place à la fin du premier jour de la lésion pour se poursuivre durant les dix jours suivants. La cicatrice gliale se caractérise par une astrogliose massive au niveau du site de lésion. Les astrocytes résidents s'hypertrophient et deviennent hyper-réactifs. Leur volume et leur taille augmentent et ils commencent à surexprimer des marqueurs comme la GFAP, la Vimentine et la Nestine (Cregg et al., 2014). Cette hyperréactivité se caractérise par une prolifération massive au niveau du site de lésion. Ces nouveaux astrocytes prolifératifs migrent et s'entremêlent avec leurs ramifications afin de former une bordure cicatricielle autour du cœur de la lésion non-neurale inflammée (Burda and Sofroniew, 2014; Wanner et al., 2013). La formation de cette bordure est complète au bout de deux à trois semaines et constituée



principalement des nouveaux astrocytes. La structure et les fonctions de cette organisation cellulaire est comparable à la « *glia limitans* », formée par les pieds astrocytaires le long des surfaces méningées et des vaisseaux sanguins, observée en condition physiologique. Fonctionnellement, cette bordure astrocytaire confine les cellules inflammatoires à l'intérieur de la zone tissulaire endommagée (Sofroniew, 2015; Wanner et al., 2013). Ceci permet de protéger le tissu neural sain adjacent d'une expansion des cellules immunitaires. Une perte ou une dysfonction de cette barrière entraîne une propagation destructrice de l'inflammation, conduisant à de plus larges dommages tissulaires et par conséquent une augmentation des pertes neurologiques. Comme la « *glia limitans* » le long de la méninge, cette bordure astrocytaire est très fine, d'une épaisseur de quelques couches cellulaires. Les astrocytes s'entremêlent également avec quelques OPC réactifs, exprimant la protéine NG2. L'origine de ces nouveaux astrocytes n'est pas encore clairement établie et reste encore sujet à débat. Certains auteurs déclarent que la majorité des astrocytes générés après une lésion médullaire sont issus uniquement de la prolifération des astrocytes résidents (Faulkner et al., 2004; Ren et al., 2017). Certaines études ont démontré qu'une forte proportion de ces nouveaux astrocytes prolifératifs était issue de la division des cellules épendymaires au niveau du canal central (Barnabe-Heider et al., 2010; Meletis et al., 2008; Sabelstrom et al., 2014). En effet, d'après ces études, les cellules épendymaires constituent la principale source de nouveaux astrocytes participant à la formation de la cicatrice gliale. Ces astrocytes, dérivés des cellules épendymaires, forment la partie la plus interne de la cicatrice, au contact de la zone fibrotique, alors que les astrocytes résidents, nouvellement formés constituent la périphérie de cette cicatrice. Ces cellules sont indispensables à la restauration de l'intégrité tissulaire après une lésion médullaire. En effet, l'inhibition de leur cycle dans un modèle expérimental conduit, au cours du temps, à une exacerbation des dommages tissulaires. La lésion s'étend plus largement et plus profondément au sein du tissu nerveux, aboutissant à des atteintes axonales plus importantes (Sabelstrom et al., 2013). De plus, ces cellules constituent également une source importante de facteurs neurotrophiques indispensables à la survie neuronale.

### **c. La zone neurale saine réactive**

En bordure de la cicatrice gliale se trouve le tissu nerveux sain épargné, qui englobe le cœur de la lésion. Ce tissu est composé par les mêmes éléments que le tissu médullaire en condition physiologique, à l'exception de la présence de cellules gliales réactives. En effet, cette zone se caractérise par la présence d'astrocytes réactifs, de cellules microgliales et d'OPC-NG2 dont l'hyper-réactivité diminue graduellement à mesure que l'on s'éloigne de la zone de lésion.



Le rôle de ces cellules gliales réactives est encore mal compris, mais ce phénomène graduel de réactivité serait dû à la diffusion de diverses molécules libérées par la rupture de la barrière hémato-médullaire suite au choc, ou produites par les cellules de la zone de lésion (Burda and Sofroniew, 2014). Certaines hypothèses suggèrent que cette réactivité favoriserait la mise en place des mécanismes de remodelage tissulaire, comme la formation de nouvelles synapses par les axones épargnés et l'établissement d'un nouveau réseau neuronal au sein de la moelle lésée.

### V. Stratégies thérapeutiques de la LMT

La difficulté à trouver des nouveaux traitements efficaces dans la prise en charge des patients atteints de LMT n'est pas récente. Dès 1700 avant Jésus Christ, un chirurgien de l'ancienne Egypte exprimait dans ses écrits sa frustration face aux fractures spinales qu'il devait soigner. Il en concluait que « cette maladie ne peut être traitée » (Breasted JH. Chicago: *University of Chicago Press*; 1930. *The Edwin Smith surgical papyrus*). Depuis plusieurs siècles, de nombreux médecins se sont attelés à trouver des moyens de soigner ces patients condamnés. Au cours de ces dernières décennies, les innovations médicales et technologiques ont permis d'améliorer la prise en charge de ces patients et également d'améliorer leur qualité de vie. Malheureusement, bien que certains traitements soient prometteurs, aucun ne permet une récupération complète des fonctions motrices ou neurologiques perdues. L'analyse bibliographique des études sur le traitement des LMT révèle différentes techniques de prise en charge, telles que les stratégies chirurgicales, pharmacologiques et plus récemment, les thérapies cellulaires. Dans ce chapitre, nous nous concentrerons sur la bibliographie concernant l'utilisation de la greffe cellulaire comme stratégie thérapeutique de la LMT.

#### 1. Pratiques cliniques actuelles

Un leitmotiv important dans le domaine de la prise en charge des patients ayant subi une LMT est « *Time is spine* ». En effet, comme dans toutes lésions aiguës du SNC, le tissu nerveux peut être irrémédiablement perdu durant les heures qui suivent le traumatisme, d'où la nécessité de diagnostiquer rapidement les patients et de mettre en place des manœuvres précoces neuroprotectrices durant la phase aiguë de la lésion. Dès l'arrivée des secours, l'utilisation d'un collier cervical et d'un plan dur permet l'immobilisation de l'axe cranio-spinal du patient afin d'éviter toutes lésions supplémentaires pouvant survenir durant son transport vers les unités de soins intensifs.



Parallèlement, les constantes vitales, comme le rythme cardiaque, la respiration et l'hémodynamisme, sont scrupuleusement surveillées afin de conserver une perfusion médullaire optimale et ainsi éviter toute hypotension. L'agence américaine des neurochirurgiens recommande le maintien constant d'une pression systolique inférieure à 90 mmHg, une pression artérielle entre 85 et 90 mmHg et un taux d'oxygénation supérieur à 90 %, et ce, durant les sept jours qui suivent le traumatisme (Resnick, 2013). Bien que sujet à controverse, l'administration précoce de glucocorticoïdes, comme le méthylprednisolone, est préconisée afin d'améliorer la restauration de la perméabilité vasculaire et d'atténuer les phénomènes inflammatoires chez le patient (Hall and Braughler, 1982).

Une fois en unité de soin, l'intervention chirurgicale est la pierre angulaire du traitement précoce des LMT durant la phase aigüe. Elle tend à diminuer les effets directs de l'altération structurelle engendrée par l'impact initial sur la colonne vertébrale. Utilisée depuis plus de 40 ans, la prise en charge chirurgicale précoce des patients médulo-lésés a fait ses preuves et peut se révéler déterminante pour la réussite des traitements futurs.

Cette intervention chirurgicale se base sur le réalignement de la colonne vertébrale et la restauration de la stabilité spinale par l'utilisation, en fonction du type de lésion, de supports orthopédiques (broches, implants métalliques,...). Ceci a pour objectif de diminuer la compression médullaire occasionnée par les dommages osseux ou ligamentaires. La compression médullaire exacerbe les phénomènes ischémiques et par conséquent, potentialise la lésion secondaire. Pour cette raison, une intervention chirurgicale précoce permet de limiter la zone de lésion et par la suite, d'améliorer les résultats cliniques (Ahuja et al., 2017). En effet, les meilleurs résultats, en terme de récupération neurologique, sont obtenus lorsque l'intervention chirurgicale est pratiquée dans les vingt-quatre premières heures suivant le traumatisme (Fehlings et al., 2012).

Bien que ces pratiques aient permis d'améliorer significativement le taux de survie de ces patients et également leur qualité de vie, tous les problèmes ne sont pas résolus. En effet, les mécanismes physiopathologiques de la LMT se poursuivent et continuent à endommager le tissu nerveux conduisant à la lésion secondaire. Le but des différentes stratégies thérapeutiques est de limiter ou de contenir les effets de cette lésion secondaire et à plus long terme, de réparer les dommages tissulaires engendrés par celle-ci. Du fait de l'aspect multifactoriel de la lésion médullaire, il existe, à l'heure actuelle, une variété de stratégies thérapeutiques en cours de développement qui font appel à des domaines très divers. Parmi ces innovations, l'utilisation



de la thérapie cellulaire pour le traitement des LMT constitue l'une des stratégies thérapeutiques les plus prometteuses.

### 2. Les thérapies cellulaires

L'objectif de la thérapie cellulaire est d'utiliser les propriétés physiques et fonctionnelles innées de certains types cellulaires pour les appliquer aux aires lésionnelles résultants de la lésion médullaire. De nombreux types cellulaires ont été étudiés pour le traitement des LMT. Les résultats de ces études ont démontré que les effets bénéfiques des thérapies cellulaires provenaient de la mise en œuvre de différents mécanismes dépendant du type cellulaire employé. Selon leur source, les cellules transplantées peuvent constituer un effet anti-inflammatoire ou immuno-modulateur, anti-gliotique, pro-oligodendrogénique, pro-neurogénitique ou également une source de facteurs anti-apoptotiques, pro-angiogéniques ou neurotrophiques et une source de remplacement cellulaire (Siddiqui et al., 2015; Vawda et al., 2012). Cette section synthétise les différents résultats d'études menées sur les principaux types cellulaires utilisés dans le cadre du traitement des lésions médullaires.

#### a. Les cellules de Schwann

Les CS sont les principales cellules gliales à former une gaine de myéline sur les axones des neurones sensitifs et moteurs au niveau du système nerveux périphérique. Après une lésion nerveuse périphérique, les CS jouent un rôle clef dans la promotion de la régénération axonale par différents mécanismes. Les CS ont montré leur capacité à sécréter de nombreux facteurs neurotrophiques, comme le *nerve growth factor* (NGF), le *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), la *neurotrophin-3*, le *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), le GDNF et le FGF (Oudega and Xu, 2006). Ces cellules servent également de support à la repousse axonale par l'expression membranaire de différentes molécules d'adhésion comme *neural cell adhesion molecule* (NCAM) ou L1CAM et par la production de molécules de la MEC, comme la laminine, la fibronectine ou le collagène (Chernousov and Carey, 2000; Mirsky et al., 2002).

Il fut également constaté qu'à la suite d'un traumatisme conduisant à une altération de la *dorsal root entry zone* (DREZ), les CS des racines nerveuses étaient capables de migrer au niveau de la zone de lésion et myéliniser les axones présents (Brook et al., 1998; Nagoshi et al., 2011). De plus, leur facilité de prélèvement depuis un nerf périphérique, comme le nerf distal (pour l'Homme) ou le nerf sciatique (chez l'animal), font de ces cellules un candidat idéal pour l'établissement d'une transplantation autologue de cellules chez l'Homme. C'est pour ces



raisons que les CS furent le premier type cellulaire à être analysé dans le cadre des lésions médullaires (Duncan et al., 1981).

Après plusieurs décennies d'études, il a été démontré que l'implantation de CS dans divers modèles animaux de LMT, stimulait la repousse et la myélinisation des axones des neurones sensitifs et des faisceaux proprio-spinaux (Bunge and Wood, 2012; Kanno et al., 2014). La greffe de CS augmente également au cours du temps la survie neuronale et conduit à une diminution des altérations tissulaires par la réduction de la surface et de la quantité de lésions kystiques dans des modèles expérimentaux (Barbour et al., 2013). De plus, les CS par la sécrétion de neurotrophines favorisent la récupération de certaines fonctions sensorimotrices et donc une amélioration comportementale de l'animal après une LMT (Kanno et al., 2014; Park et al., 2010). Néanmoins, les effets de la transplantation de CS ne sont généralement pas suffisants pour générer une réponse axonale conduisant à la récupération des fonctions motrices (Fouad et al., 2005; Kanno et al., 2014).

Des études ont mis en évidence que sans intervention supplémentaire, les axones supra-spinaux échouaient à se régénérer seuls au sein du greffon cellulaire et qu'à l'inverse, les axones en repousse au sein du greffon n'arrivaient pas à s'étendre au sein de la zone de lésion (Kanno et al., 2015). Il a été démontré que les interactions cellulaires entre les CS et les astrocytes entraînaient une hypertrophie et une hyperréactivité astrocytaire, inhibant la capacité de migration des CS et également celle des axones en repousse du fait de la production de molécules inhibitrices par les astrocytes (Bunge and Wood, 2012; Li et al., 2012). Par conséquent, les transplantations de CS sont fréquemment combinées avec d'autres traitements, tels que des bloqueurs de molécules inhibitrices, des neuro-protecteurs ou des facteurs neurotrophiques. L'objectif est d'améliorer la permissivité du greffon et de l'interface greffon/tissu médullaire dans le but de promouvoir une repousse axonale au travers du transplant cellulaire (Kanno et al., 2014; Silva et al., 2014).

De façon surprenante, à l'heure actuelle, peu d'études translationnelles existent dans le domaine de l'utilisation des CS comme traitement des LMT. Deux études cliniques chinoise et iranienne menées chez l'Homme démontrent la non iatrogénicité de l'utilisation des CS après lésion médullaire. Néanmoins ces études n'apportent aucune preuve d'amélioration des signes cliniques chez ces patients après traitement (Sabeti et al., 2011; Zhou et al., 2012).



### b. Cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires (ESC, *embryonic stem cells*) sont des cellules souches pluripotentes dérivées de la masse cellulaire interne du blastocyste. Ces cellules ont la capacité de se renouveler indéfiniment en culture et de générer les trois principaux feuilletts embryonnaires indispensables à la formation d'un individu (à savoir le mésoderme, l'ectoderme et l'endoderme) (Conley et al., 2004). Cette capacité à générer n'importe quel type cellulaire, constitue un outil biologique précieux dans le domaine de la médecine régénérative.

En raison du risque élevé de formation de tératomes, les ESC ne sont jamais directement transplantées, elles sont préalablement différenciées *in vitro* en progéniteurs cellulaires, avant d'être utilisées comme traitement (Hendricks et al., 2006). Dans le cas du traitement des lésions médullaires, des résultats prometteurs sont obtenus lorsque ces cellules sont dérivées en NSC, en motoneurons ou en OPC. La transplantation d'ESC dérivées vers un phénotype neural a montré l'induction d'une repousse de neurones sérotoninergiques endogènes, une augmentation de la survie des neurones endogènes et une diminution des atteintes tissulaires après lésion médullaire conduisant à une amélioration des fonctions motrices (Nogradi et al., 2011; Rossi et al., 2010). Ces effets furent également confirmés chez le primate (Iwai et al., 2015).

Dans un modèle expérimental de lésion au niveau thoracique, une étude démontre que la transplantation de neurones GABAergiques dérivés d'ESC, entraîne une diminution des douleurs neuropathiques chez l'animal (Hwang et al., 2016). Des études approfondies ont également été menées avec les progéniteurs d'oligodendrocytes dérivés des ESC. Une fois transplantées, ces OPC sont capables de se différencier en oligodendrocytes matures et de restaurer un processus de myélinisation des axones au sein du SNC. Dans un modèle de compression médullaire, ces OPC conduisent à une remyélinisation et à une récupération partielle des fonctions motrices au niveau des membres inférieurs (Keirstead et al., 2005).

Néanmoins, l'utilisation des ESC soulève quelques inquiétudes. En effet, la principale étant la question d'éthique entourant l'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines dans le cadre des thérapies cellulaires. De plus, des préoccupations quant à l'innocuité de la transplantation d'ESC sont également apparues lors de la publication d'études faisant état de la formation de tératomes (Li et al., 2008). Les futures applications cliniques possibles des ESC chez l'Homme dépendent de façon critique de la capacité des laboratoires à produire des populations de cellules différenciées pures *in vitro* afin d'écartier tous risques pour la santé.



Une étude clinique de phase I a été initiée à la suite des résultats expérimentaux, en 2009, par un laboratoire américain, mais a été interrompue quelque temps plus tard, faute de moyens financiers. Les quelques résultats issus de cet essai clinique démontrèrent la non dangerosité des ESC dérivées chez l'Homme, et ce malgré l'observation de quelques phénomènes kystiques chez certains patients. Néanmoins, aucune récupération neurologique ne fut observée durant cet essai clinique (Bretzner et al., 2011; Wilcox et al., 2012).

### **c. Les cellules souches pluripotentes induites**

En 2006, Takahashi et Yamanaka firent la démonstration par une technique de reprogrammation génétique utilisant un rétrovirus de la possibilité d'obtenir des cellules souches pluripotentes à partir de fibroblastes (Takahashi and Yamanaka, 2006). Plus tard, il fut démontré que ces mêmes cellules souches pouvaient être obtenues sans utiliser un vecteur viral. Les cellules obtenues, baptisées iPSC (*inducible pluripotente stem cells*), présentent des caractéristiques communes aux ESC, comme la capacité à générer les différents types cellulaires des trois feuilletts embryonnaires (Takahashi et al., 2007). Cette découverte ouvrit de nouvelles possibilités pour le domaine des thérapies cellulaires, car contrairement aux ESC, l'utilisation des iPSC s'affranchit des différentes contraintes éthiques et religieuses. De plus l'utilisation des iPSC dans le domaine des thérapies cellulaires donne la possibilité de générer tous les types cellulaires à partir d'une biopsie de patient, écartant les risques de réponse immunitaire face au greffon.

Ainsi, des progéniteurs neuronaux ou gliaux dérivés d'iPSC ont été transplantés dans un modèle animal de lésion médullaire. Les résultats obtenus ont montré l'apparition d'une remyélinisation, une augmentation de la régénération axonale et une amélioration générale de la survie des neurones endogènes, ce qui favorise la récupération de certaines fonctions locomotrices et sensibles (Hatami et al., 2009; Nutt et al., 2013; Salewski et al., 2013). Bien qu'expérimentale, l'utilisation des iPSC semble prometteuse. Il est néanmoins nécessaire d'analyser sa sûreté et sa faisabilité dans des modèles expérimentaux, avant d'envisager des applications cliniques chez l'Homme.

### **d. Les progéniteurs neuronaux ou cellules souches neurales**

Les NSC et les progéniteurs neuronaux (NPC, *neural progenitor cells*) sont des cellules multipotentes qui ont la capacité de s'auto-renouveler et de générer les trois types cellulaires neurales : les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones. Leur capacité à générer de nouveaux neurones a rapidement suscité l'intérêt des chercheurs car elles constituaient une



source potentielle de remplacement cellulaire pour la population neuronale endommagée durant une lésion de la moelle spinale (Tetzlaff et al., 2011).

L'objectif de l'utilisation des NSC dans le traitement des LMT est de pouvoir remplacer le tissu nerveux (principalement les neurones et les oligodendrocytes) endommagé et également de fournir un support trophique au tissu sain épargné par le traumatisme. En effet, il a été démontré que les NSC ont la capacité de sécréter divers facteurs neurotrophiques, comme le BDNF, le NGF et GDNF, *in vitro* et *in vivo* (Lu et al., 2003). Pourtant, lorsque des NSC sont transplantées dans une moelle spinale saine ou lésée de rat, ces cellules génèrent rarement de nouveaux neurones. Elles restent fréquemment indifférenciées ou parfois se différencient vers un certain type glial (Cao et al., 2001; Shihabuddin et al., 2000). De façon surprenante, une transplantation hétérotopique de NSC issues de la moelle spinale de rat dans une zone neurogène du cerveau comme le gyrus dentelé, conduit à la formation de nouveaux neurones dérivés de ces cellules. Cependant, lorsque ces mêmes cellules sont transplantées dans une moelle spinale, elles ne génèrent que des cellules gliales (Shihabuddin et al., 2000). Néanmoins, les NSC induisent une amélioration significative des performances de l'animal pendant les tests d'évaluation de leurs fonctions locomotrices (Bottai et al., 2008; Hofstetter et al., 2005).

A la suite de ces observations, certains laboratoires décidèrent d'utiliser directement des progéniteurs neuronaux ou gliaux (NPC) issus de ces NSC afin de contrôler le lignage cellulaire transplanté. La transplantation de NPC, humains ou murins, améliore la réparation et la régénération neuronale au niveau de la moelle spinale et augmente également la récupération des fonctions motrices et sensibles après une LMT chez le rat (Alexanian et al., 2011; Emgard et al., 2009; Karimi-Abdolrezaee et al., 2010). Le mode d'action de ces NPC est un remplacement des cellules du tissu nerveux et une intégration de celles-ci par le phénomène de plasticité neuronale. Ces cellules permettent également une remyélinisation des neurones présents dans la moelle spinale et apportent un support neurotrophique à ces neurones, conduisant à une régénération axonale et un effet immunomodulateur. Des études ont démontré que l'effet majeur de la transplantation de NPC dans un modèle animal était une myélinisation des axones locaux par des oligodendrocytes matures dérivés du greffon cellulaire (Hawryluk et al., 2014). Une autre étude, menée en 2012, démontra que la transplantation de NSC humains ou murins permettait la génération de nouveaux neurones s'étendant sur de grandes distances et s'intégrant parfaitement au réseau neuronal existant, et ce malgré le milieu inhibiteur de la lésion. L'intégration de ces nouveaux neurones forme un relai neuronal fonctionnel permettant



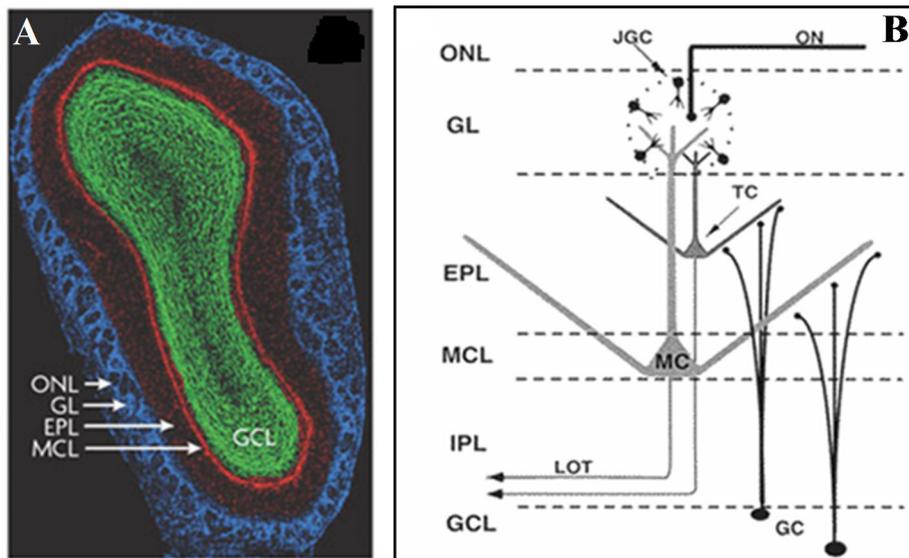
la restauration d'une activité électrophysiologique et une amélioration générale du comportement de l'animal lésé (Lu et al., 2012).

Néanmoins, malgré des résultats expérimentaux existants, la récupération des NSC chez l'Homme pose problème. En effet, ces cellules peuvent être isolées à partir de différentes zones du système nerveux, comme la zone sous-ventriculaire du cerveau, la zone granulaire du gyrus dentelé et la moelle spinale. Mais de par leur localisation anatomique, l'utilisation de NSC pour une greffe autologue dans le cadre du traitement des lésions médullaires chez l'Homme semble difficilement réalisable. Une alternative à ce problème serait l'utilisation de NSC ou de NPC dérivées de cellules souches plus primitives comme les ESC ou les iPSC. Mais leur utilisation reste néanmoins limitée du fait des mêmes contraintes abordées précédemment (éthique, stabilité génétique,...).

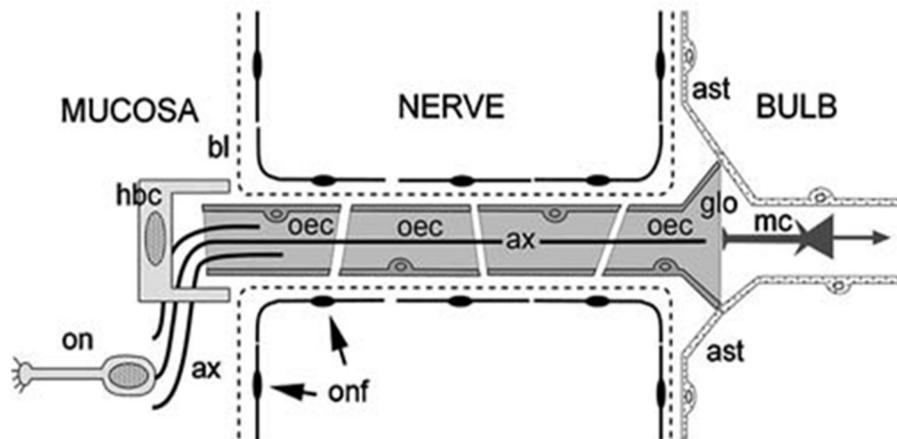
#### **e. Les cellules souches mésenchymateuses**

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC, *Mesenchymal stem cells*) sont des cellules multipotentes facilement isolables depuis des tissus adultes ou postnatals, comme la moelle osseuse, le tissu adipeux, le liquide amniotique, le cordon ombilical ou d'autres tissus fœtaux. Ces cellules sont particulièrement intéressantes du fait de leur facilité de prélèvement et de culture sans contrainte technique ou éthique. Les MSC sont bien connues pour présenter une faible immunogénicité et représentent un faible risque tératogène quand elles sont transplantées. Elles possèdent également des effets anti-inflammatoires et immuno-modulateurs. De plus, elles peuvent également être facilement utilisables pour la réalisation de greffes autologues chez l'Homme (Vawda et al., 2012).

Différents groupes de recherche ont étudié ces MSC dans le cadre du traitement des LMT. Une fois transplantées, ces cellules exercent un effet immuno-modulateur et apportent un support trophique. Elles modifient l'environnement lésionnel et fournissent un support physique permettant l'élongation axonale (Carrade et al., 2011; Mothe et al., 2011). La transplantation de MSC est capable de diminuer les phénomènes de démyélinisation axonale et de réduire la quantité de molécules inhibitrices présentes au sein de la lésion, ce qui stimule la régénération axonale (Malgieri et al., 2010). Dans un modèle de compression médullaire, ces cellules ont permis de diminuer l'étendue des phénomènes kystiques au sein du tissu et d'améliorer la récupération des fonctions sensori-motrices des membres postérieurs de l'animal (Boido et al., 2014).



**Figure 49 : Organisation du bulbe olfactif.** (A) Coupe transversale d'un bulbe olfactif. Taille ventro-caudale = 2mm. (B) Organisation cellulaire d'un bulbe olfactif. JGC : cellule juxtaglomerulaire, TC : cellule touffue, ON : nerf olfactif, GC : cellule granulaire, MC : cellule mitrale, LOT : tractus olfactif latéral (Hayar et al., 2004).



**Figure 50 : Représentation schématique de la glia limitans au niveau de la partie externe des bulbes olfactifs.** ON : Nerf olfactif ; Ax : Axone ; Ast : Astrocyte ; MC : Cellule mitrale ; OEC : Cellule gliale olfactive ; ONF : Fibroblaste olfactif nerveux ; HBC : Cellule basale ; BL : Lamme basale (Li, 2005).

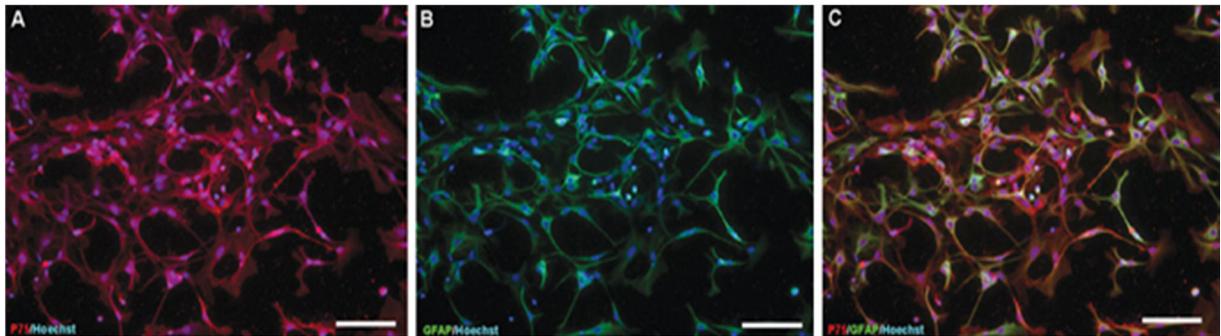
Parmi toutes ces thérapies cellulaires développées dans le traitement des lésions médullaires humaines, on note également l'utilisation d'une autre population de cellules démontrant des résultats cliniques prometteurs, ce sont les cellules gliales olfactives.

### VI. Les cellules gliales olfactives d'origine bulbaire

Le système olfactif primaire composé d'un épithélium et de deux bulbes, a la capacité unique de former de nouveaux neurones olfactifs primaires et ce, durant toute la vie de l'animal (Graziadei and Graziadei, 1979). Du fait de leur exposition dans la cavité nasale, les neurones olfactifs sont sujets à de multiples traumatismes. De ce fait, le système olfactif primaire a conservé la capacité de former de nouveaux neurones à partir d'une population de cellules souches. Ce mécanisme, appelé neurogenèse, prend place au niveau des cellules basales de l'épithélium olfactif et permet l'établissement de nouvelles connexions nerveuses avec les bulbes (Doucette, 1990). Contrairement au système olfactif, un traumatisme du SNC conduit à une repousse axonale limitée et une perte de la conduction nerveuse (Kiernan, 1979). C'est pour cette raison qu'une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires permettant la régénération du système olfactif primaire est indispensable.

#### 1. Les bulbes olfactifs

Localisés à la base du cortex, dans la région rostrale, ils sont les premiers organes du SNC à traiter l'information olfactive émergeant de l'épithélium. Ils sont constitués de différentes couches cellulaires : une couche nerveuse olfactive (ONL), une couche glomérulaire (GL), une couche plexiforme externe (EPL), une couche de cellules mitrales (MCL), une couche plexiforme interne (IPL) et une couche de cellules granulaires (GCL) (Hayar et al., 2004) (**Figure 49**). Les axones des neurones olfactifs empaquetés par les CGOs (cellules gliales olfactives) sous forme de fascicules nerveux émergent de la muqueuse à travers des orifices de la lame criblée. Ces fascicules sont entourés de fibroblastes nerveux olfactifs (ONFs) formant ce que l'on appelle les nerfs olfactifs (ONs). Au point d'entrée des nerfs dans la partie ventrale des bulbes, les ONFs interagissent avec les fibroblastes méningés recouvrant les bulbes. C'est dans cette zone « charnière » que les CGOs s'entremêlent avec les astrocytes présents pour former la « *glia limitans* » (**Figure 50**) (Doucette, 1990). A l'inverse de la muqueuse olfactive où les neurones sont gainés aléatoirement par les CGOs, au niveau de la GL, ceux-ci sont défasciculés puis refasciculés de manière spécifique en fonction du type de récepteur olfactif (OR) qu'ils expriment. Ainsi ces nouveaux fascicules se projettent directement dans le



**Figure 51 : Caractérisation phénotypique d'une culture de CGOs.** Illustration par microscopie en fluorescence de la morphologie cellulaire et du *pattern* d'expression typique des CGOs *in vitro*. (A-C) montrent une zone de culture contenant des CGOs avec un marquage p75 (A, rouge) et GFAP (B, vert), ainsi que la superposition des 2 marquages (C), avec un co-marquage nucléaire au Hoechst. Echelle=100 $\mu$ m (Lankford et al., 2008).

glomérule propre à la molécule odorante reconnue par l'OR qu'ils expriment. On parle de guidance axonale ou de phénomène de « *targeting* ». Une fois dans leur glomérule cible, les axones olfactifs interagissent avec les cellules mitrales et touffues par le biais de leurs dendrites. Les glomérules sont constitués d'un réseau de terminaisons nerveuses et de connections synaptiques. Les cellules mitrales et touffues, localisées dans la couche plexiforme et mitrale, se projettent dans le cortex olfactif via le tractus olfactif latéral (LOT) permettant la transmission de l'information olfactive au cortex (Farbman and Buchholz, 1992).

### 2. Les cellules gliales olfactives

Tout comme les CSs, les CGOs dérivent de la crête neurale. Aux stades précoces de l'embryogénèse, ces cellules migrent du tube neural pour envahir le système nerveux. L'intégration des CGOs comme membres à part entière des cellules gliales fut longue et controversée. Ceci est dû à la similarité des CGOs avec les CS non myélinisantes. Toutes deux possèdent la capacité de gagner par paquet des axones sans les myéliniser. Or, des études ont révélé des fonctions similaires aux astrocytes au niveau du SNC. Ils ont donc été nommés « *Olfactory ensheathing cells* » ou CGOs en français (Doucette, 1991). Tout comme leur dénomination, l'origine embryonnaire des CGOs fut controversée. Les travaux de Barraud et de Forni publiés en 2010 et 2011 réfutèrent la théorie précédente selon laquelle les CGOs dérivent de cellules progénitrices de la placode olfactive et qu'elles migraient avec les nerfs olfactifs vers les vésicules du télencéphale pour former les bulbes. En réalité, ces travaux démontrent que les CGOs et les CSs dérivent toutes les deux de la crête neurale et qu'elles sont issues d'un même précurseur (Barraud et al., 2010; Forni et al., 2011).

### 3. Aspects morphologiques et expression antigénique des CGOs

Les CGOs ont une morphologie très hétérogène. Durant le développement du système olfactif, deux profils cytoplasmiques de densité électronique sont observés. Les CGOs gainants les nerfs ont un aspect mince et étiré tandis que d'autres sont plutôt rondes et ne semblent pas gagner les axones. En culture, les CGOs issues de la *lamina propria*, de la muqueuse ou des bulbes olfactifs montrent une variété de formes telles que plate, fusiforme ou étoilée (Lankford et al., 2008) (**Figure 51**). Cette variabilité morphologique peut s'expliquer par l'âge ou la source tissulaire, ainsi que les conditions de culture. Malgré ces différences de morphologie, les CGOs conservent une immunoréactivité qui leur est propre (Vincent et al., 2005b).

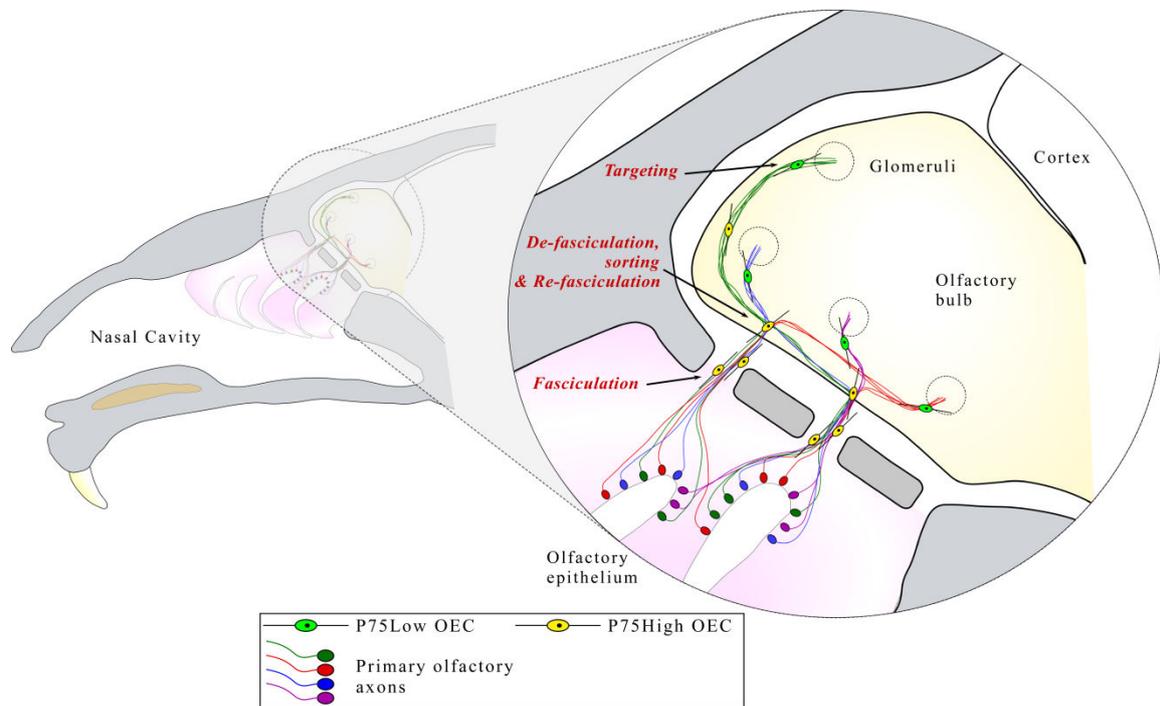
Leur origine partagée avec les CS justifie l'expression de différents marqueurs antigéniques spécifiques communs : la protéine S100 $\beta$ , la protéine GFAP et le récepteur aux



neurotrophines p75 (p75NTR). S100 $\beta$  est une protéine fixatrice de calcium, impliquée dans les processus de phosphorylation, prolifération et différenciation cellulaire et est fortement exprimée de façon spécifique chez les CS ainsi que chez les cellules dérivant de la crête neurale (Vincent et al., 2005b). La GFAP est un filament intermédiaire du cytosquelette de certaines cellules gliales tels que les astrocytes. Chez le rat, ces marqueurs apparaissent au niveau des nerfs olfactifs périphériques dès les stades embryonnaires E14 et E15, puis s'étendent à l'ONL avec une expression graduelle entre la partie externe et interne, juste avant la naissance. Leur expression s'uniformise à l'âge adulte. Le p75NTR est une protéine transmembranaire caractérisée comme le récepteur de basse affinité aux facteurs neurotrophiques de croissance nerveuse (NGF). Celui-ci permet la fixation d'autres membres de la famille des neurotrophines, tel que le BDNF, ou la *neurotrophin-3* (NT3) par association avec les récepteurs neurotrophiques à activité tyrosine-kinase (TRK-A,-B ou -C). Le p75NTR a de multiples fonctions au sein du système nerveux où il est largement exprimé au cours du développement avant de diminuer considérablement à l'âge adulte. Cependant l'expression du p75NTR se trouve fortement augmentée après une lésion de l'épithélium olfactif. De plus, les CGOs au niveau de la muqueuse expriment plus fortement le p75NTR que celles présentes dans les bulbes olfactifs. Ces différences morphologiques et antigéniques ont entraîné des interrogations sur l'existence de sous-populations de CGOs.

#### 4. Les sous-populations de CGOs

De façon certaine, il a été démontré que les CGOs périphériques et centrales jouaient un rôle dans l'établissement et l'entretien des nerfs olfactifs ainsi que dans la guidance des axones au niveau de l'ONL. Il est maintenant établi que les CGOs, en fonction de leur localisation dans le système olfactif, se comportent différemment vis-à-vis des neurones olfactifs en régénération. Leur implantation après une lésion du nerf vague a révélé que les CGOs de la muqueuse ou des bulbes ont un effet bénéfique sur la croissance et la récupération du nerf, avec des rôles différents en fonction de leur origine anatomique (Paviot et al., 2011). Cette différence est confirmée par l'analyse de leur transcriptome. En effet, les CGOs issues de la muqueuse surexpriment des gènes impliqués dans la régulation de la matrice extracellulaire et dans la régénération tissulaire. Quant aux CGOs provenant des bulbes, ils surexpriment des gènes participant à la guidance et à la repousse axonale (Guerout et al., 2010). Ces différences de population entre la muqueuse et les bulbes ont conduit à s'interroger sur l'existence de sous-populations au sein des bulbes. En effet, l'enregistrement en « *patch-clamp* » de deux profils biophysiques différents dans une même population de CGOs bulbaires et l'observation en



**Figure 52 : Représentation schématique de la répartition des sous-populations de cellules gliales olfactives dans le système olfactif primaire. (Honore et al., 2012).**

immunohistologie d'une expression différentielle du p75NTR par les CGOs de l'ONL, ont conduit à s'interroger sur l'existence de ces sous-populations (Rela et al., 2010; Windus et al., 2010). Windus a montré *in vivo et in vitro* que les CGOs, présentes dans l'ONL établissent des contacts cellulaires différents en fonction de leur position. Les CGOs de la partie externe de l'ONL permettraient la défasciculation axonale des neurones olfactifs primaires alors que celles de la partie interne aideraient à la refasciculation et la guidance des axones exprimant les mêmes ORs vers les glomérules cibles. Cette suspicion de sous-populations au niveau des bulbes restait toutefois à confirmer par des éléments discriminants spécifiques des CGOs. Le récepteur p75 permet de confirmer cela. Des différences d'expression du récepteur pouvaient être observées le long de la voie olfactive. Une analyse par cytométrie en flux des CGOs du bulbe a permis de mettre en évidence l'existence de deux populations exprimant différemment le p75NTR. Il fut découvert pour la première fois, une population de CGOs exprimant fortement le p75 (CGO p75-High) et une autre l'exprimant plus faiblement (CGO p75-Low). De plus, il a été démontré que les facteurs sécrétés par les fibroblastes du microenvironnement bulbaire sont responsables de la différenciation et de la maturation de ces deux populations (Honore et al., 2012) (**Annexe I**). Dans cette même étude, l'analyse comparative du transcriptome de ces deux populations a mis en évidence des « *patterns* » d'expression différents spécifiques. Ainsi, les CGOs p75-High surexpriment des gènes impliqués dans les mécanismes de régulation de la matrice extracellulaire et dans le phénomène de défasciculation. Quant aux CGOs p75-Low, celles-ci surexpriment des gènes de régulation de la guidance axonale et de modulation du cône de croissance. Ces études permirent de repositionner hypothétiquement les CGOs dans les divers mécanismes de la neurogenèse du système olfactif. Les neurones olfactifs primaires émergeant de la muqueuse pénétreraient dans les bulbes olfactifs au niveau de l'ONL où ils seraient défasciculés par les CGOs P75-High. Ces mêmes CGOs refasciculeraient ensuite les axones en fonction du récepteur olfactif qu'ils expriment. Puis les fascicules nerveux seraient guidés par des CGOs p75-Low jusqu'à leur glomérule cible (Honore et al., 2012) (**Annexe I**) (**Figure 52**). Dans un but clinique, les CGOs semblent être des candidats prometteurs pour la réparation du système nerveux central ou périphérique.

#### 5. Les CGOs dans les lésions médullaires

De nombreuses études ont été menées sur le potentiel des cellules gliales à stimuler la repousse axonale après une lésion du système nerveux central ou périphérique. Les premières études portaient sur le potentiel des CS pour la réparation des lésions médullaires. Mais les propriétés de migration et de contact cellulaire de celles-ci se révélèrent délétères envers la



régénération axonale. En effet, le contact des CSs avec les astrocytes entraîne une hyperréactivité astrogliale conduisant à l'établissement d'une cicatrice lors de la lésion médullaire. Cette cicatrice gliale crée ainsi un rempart à la repousse axonale que les CSs sont incapables de traverser contrairement aux CGOs. Effectivement, les CGOs se mêlent librement avec les astrocytes, tant *in vitro* qu'*in vivo*, sans pour cela déclencher d'hyperréactivité astrogliale (Lakatos et al., 2000). C'est pour ces diverses raisons qu'aujourd'hui les CGOs représentent un outil thérapeutique majeur dans le cadre des lésions de la moelle spinale (Anna et al., 2017; Feron, 2007; Watzlawick et al., 2016). Depuis la première greffe de CGOs montrant une croissance des axones de la racine dorsale de la moelle spinale, de nombreuses autres transplantations ont montré des résultats encourageants. De toutes ces études sur les lésions médullaires, cinq effets bénéfiques généraux des CGOs ont été décrits : (1) la stimulation de la croissance axonale, (2) la préservation des axones et des tissus, (3) la capacité de migrer du site de lésion vers le tissu cicatriciel, (4) la promotion de l'angiogenèse et (5) la remyélinisation des axones (Franssen et al., 2007). La plupart des études a été réalisée avec des sources très hétérogènes de CGOs. La localisation anatomique de celles-ci leur conférerait des propriétés spécifiques. Il a donc été observé que les CGOs du système olfactif pouvaient sécréter des facteurs neurotrophiques (NGF, BDNF, GDNF,...) et des facteurs de croissance indispensables à la neurogenèse (Feron et al., 2008; Mackay-Sim, 2005). De plus, elles ont la capacité de myéliniser les axones de gros calibres. Une étude menée au sein du laboratoire avait consisté en une étude comparative des capacités des CGOs bulbaires (purifiées ou non) sur la repousse axonale dans le cadre d'un traumatisme sévère de la moelle spinale (Mayeur et al., 2013) (**Annexe II**). Ce projet a permis de montrer que la greffe de CGOs non purifiées issues des bulbes olfactifs dans un modèle de section médullaire permettait une amélioration de l'activité locomotrice au cours du temps. Cette amélioration est accompagnée par une réduction de la cicatrice gliale due à une diminution des CSPGs ainsi qu'une faible hyperréactivité astrogliale. Ainsi les CGOs ont permis l'établissement d'un environnement favorable à la repousse des axones au niveau de la section. Dans tous les cas, la culture primaire de CGOs bulbaires composée de deux sous-populations semblerait être plus efficace pour la stimulation de la neurogenèse dans SNC. Une étude récente réalisée en collaboration avec le Pr Raisman a fait grande impression dans le domaine des thérapies cellulaires (Tabakow et al., 2014). En effet, chez un homme de 38 ans ayant subi une transection traumatique de la moelle spinale thoracique au niveau vertébral supérieur Th9, les chercheurs ont prélevé l'un des bulbes olfactifs du patient et l'on utilisé pour réaliser une culture contenant des CGOs et des fibroblastes nerveux olfactifs. Après résection de la cicatrice gliale, ces cellules cultivées ont été transplantées dans la moelle



spinale au-dessus et en-dessous de la lésion accompagnée de quatre bandes de nerf sural autologue pour combler l'espace généré par la résection de la cicatrice. Le patient a fait l'objet d'un programme intensif de rééducation avant et après l'opération. Dix-neuf mois après l'opération aucun effet indésirable n'a été observé, l'ablation du bulbe olfactif n'a pas entraîné d'anosmie unilatérale persistante. A cours du temps, il fut constaté chez le patient une amélioration de la stabilité du tronc, des mouvements volontaires des membres inférieurs, une augmentation de la masse musculaire de la cuisse gauche et une restauration partielle des sensations superficielles et profondes. Plusieurs mois après l'intervention et de longues heures de rééducation, le patient a retrouvé des sensations en dessous de la zone de lésion, tel que le control urinaire ou ces fonctions sexuels. Il est également capable de se déplacer seul avec des béquilles sur de courtes distances ou d'effectuer les efforts musculaires nécessaires pour se déplacer sur un tricycle. Ces résultats sont très encourageants pour les personnes travaillant à l'étude des CGOs dans le cadre des lésions médullaires. Ils démontrent que malgré les contraintes chirurgicales, l'utilisation de CGOs non purifiées est possible chez l'Homme et peuvent donner des résultats probants. Ces même chercheurs ont précédemment tenté d'utiliser des CGOs issues de la muqueuse olfactive chez des patients médulo-lésés sans obtenir des résultats aussi spectaculaires (Tabakow et al., 2013). Cette étude, nous a conforté dans l'idée de continuer à étudier les CGOs bulbaires dans le cadre des LMT chez l'animal.



---

## OBJECTIFS DE THESE

L'ensemble des travaux de thèse a été réalisé au sein du laboratoire de chirurgie expérimentale GRHV (Groupe de Recherche sur le Handicap Ventilatoire), équipe d'accueil 3830, dirigée par le Pr Jean-Paul MARIE, en co-encadrement avec le Dr Nicolas GUÉROUT.

Ces travaux de thèse s'inscrivent directement dans la continuité des projets menés au sein du laboratoire. Depuis plusieurs années, le laboratoire s'est attelé à l'étude des réhabilitations des lésions du SNP et du SNC. L'objectif premier du laboratoire fut de trouver de nouvelles thérapies cellulaires capables d'améliorer, de manière significative, les atteintes neurologiques inhérentes aux lésions du SNP. Pour cela, notre laboratoire décida de se concentrer sur l'utilisation des propriétés neuro-régénératives des CGOs afin d'améliorer la réhabilitation des lésions des nerfs périphériques. Nos travaux démontrèrent les atouts quant à l'utilisation de CGOs issues des bulbes olfactifs plutôt qu'issues de la muqueuse olfactive dans différents modèles expérimentaux de lésion du nerf périphérique.

Bien que contraignante d'un point de vue clinique, l'utilisation des CGOs bulbaires démontre de formidables opportunités thérapeutiques pour le traitement des lésions nerveuses. Ces propriétés peuvent s'expliquer par leur hétérogénéité cellulaire au sein des bulbes olfactifs. En effet, notre laboratoire mit en évidence pour la première fois, l'existence de sous-populations de CGOs au niveau des bulbes olfactifs, jouant des fonctions variées durant le mécanisme de la neurogenèse du système olfactif chez le modèle murin. Ces travaux constituent une partie de mes résultats de Master et de la première moitié de ma thèse et débouchèrent sur leur publication en 2012 dans la revue *GLIA* (**Annexe I**). Au vue ces résultats, nous décidâmes de les appliquer dans le cadre des lésions médullaires. Comme précédemment, l'utilisation d'une culture primaire de CGOs bulbaires (ou bCGO) dans un modèle murin de lésion médullaire démontra de meilleurs résultats d'un point de vue neurorégénératif en comparaison à l'utilisation des CGOs de la muqueuse olfactive. Ces travaux débouchèrent également sur une publication dans la revue *PlosOne* en 2013 dans laquelle je suis co-auteur (**Annexe II**).

A la suite du retour de post-doctorat du Dr Nicolas Guérout, durant lequel il étudia au sein du laboratoire du Dr Fanie Barnabé-Heider, les mécanismes du développement embryonnaire des cellules de la moelle spinale murine et plus particulièrement la formation des cellules épendymaires formant le canal central de la moelle, il fut décidé de changer notre thématique de recherche. En effet, les cellules épendymaires sont les cellules souches



endogènes de la moelle spinale et elles participent de façon importante aux mécanismes de cicatrisation de la moelle spinale après lésion. Il fut donc décidé de fusionner notre axe de recherche sur les CGOs bulbaire, mené depuis plusieurs années au sein du laboratoire, avec l'expertise du Dr Guérout sur les cellules épendymaires de la moelle spinale.

Mon premier objectif fut d'évaluer l'influence de la transplantation de CGOs issues des bulbes olfactifs sur la prolifération des cellules épendymaires dans le modèle murin transgénique  $hFoxJ1-CreER^{T2}::YFP$  après une hémisection dorsale de la moelle spinale, afin d'étudier l'influence du greffon cellulaire sur les cellules épendymaires *in vivo*. En parallèle, je devais évaluer l'impact de la capacité souche de ces cellules épendymaires *in vitro*. Mon second objectif de thèse fut d'effectuer ces mêmes analyses dans un second modèle murin, la souris  $hFoxJ1-CreER^{T2}-rasless::YFP$ . Cette lignée est caractérisée par l'inhibition spécifique de la prolifération des cellules épendymaires après administration de Tamoxifène. Son utilisation permet de visualiser le seul effet de la transplantation des CGOs sur les cellules endogènes de la moelle spinale en absence de prolifération des cellules épendymaires après lésion médullaire.

L'objectif global de ma thèse fut donc de comprendre, pour la première fois, l'effet direct d'une transplantation de cellules, sur le comportement des cellules résidentes de la moelle spinale et plus particulièrement les cellules épendymaires après lésion médullaire.



# RESULTATS



# Première partie

---

## I. Introduction article I

Durant ma thèse, j'ai été amené à travailler sur un projet en collaboration avec le laboratoire du docteur Fanie Barnabé-Heider du *Karolinska Institutet* de Stockholm. Ce projet portait sur l'étude de la mise en place de la gliogenèse au cours du développement de la moelle épinière et plus particulièrement, du développement des cellules épendymaires autour du canal central.

Durant le développement, les cellules progénitrices bordant le canal central naissant, subissent de profondes modifications par l'effet de gradients de molécules morphogènes sécrétés depuis la plaque et le plancher du tube neural, tel que le Shh et le BMP. Ces molécules permettent d'activer ou de réprimer des familles de facteurs de transcription, conduisant à la formation de différents domaines progéniteurs spécifiques le long de l'axe dorso-ventral du tube neural. Durant le développement, deux périodes distinctes permettent la formation des neurones et des cellules gliales composant le SNC, c'est la neurogenèse et la gliogenèse. La neurogenèse, qui se déroule très tôt durant le développement, permet la génération des différentes populations de neurones émergeant de leurs domaines progéniteurs spécifiques. Ensuite, des modifications complexes dans l'expression des facteurs de transcription, des miRNA ainsi que des changements épigénétiques conduisent à la mise en place de la seconde phase du développement embryonnaire, la gliogenèse. Cette phase, qui se déroule vers la fin du développement, permet la formation des oligodendrocytes, des astrocytes et des cellules épendymaires au sein de la moelle spinale. Cette phase, bien que longtemps étudiée, reste encore mal comprise, plus particulièrement concernant l'apparition des cellules épendymaires.

Les travaux précédents menés par l'équipe du docteur Barnabé-Heider démontrent par l'utilisation des lignées transgéniques hFoxJ1::EGFP et hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP que les cellules épendymaires apparaissent au niveau de moelle spinale vers E15,5 et que celles-ci restent confinées au seul canal central après la naissance. Le facteur FoxJ1 fut décrit comme étant spécifiquement exprimé par les cellules multiciliées présentes chez les mammifères, tel que les cellules du plexus choroïde, des testicules, de l'épithélium pulmonaire et les cellules épendymaires de la moelle spinale adulte. Des études démontraient l'importance de ce facteur dans le processus de différenciation des cellules de la glie radiaire en cellules épendymaires et en une sous-population d'astrocyte au cours du développement dans le cerveau (Jacquet et al., 2009). Il fut également constaté son implication dans la neurogenèse post-natale au sein des bulbes olfactifs (Jacquet et al., 2011).

Partant de constatations bibliographiques, le facteur FoxJ1 ne semble pas seulement servir à l'établissement des cils motiles mais pourrait jouer un rôle plus important durant le développement embryonnaire. C'est ainsi que mon travail s'est porté sur l'implication du facteur FoxJ1 dans les mécanismes de la gliogenèse au cours du développement au sein de la moelle spinale, sujet encore inexploré.

Pour ce faire, l'utilisation des lignées transgéniques hFoxJ1::EGFP et hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP a permis de caractériser l'expression de FoxJ1 au sein de moelle spinale durant le développement. L'analyse histologique des embryons à différents stades du développement, a révélé, de façon surprenante, que l'expression de FoxJ1 n'était pas confinée aux seules cellules épendymaires mais qu'il était également exprimé transitoirement par d'autres cellules neurales au sein de la moelle spinale. Ces observations furent confirmées par hybridation *in situ* de l'ARNm de FoxJ1. L'utilisation des marqueurs spécifiques des différents types cellulaires composant le tube neural a permis d'identifier ces cellules comme étant des sous-types d'interneurones (V1 et V2) et des sous-populations d'astrocytes dorsaux et latéraux.

Par la suite, afin de mieux analyser le rôle de FoxJ1 durant le développement et durant la période qui suit la naissance, une nouvelle lignée transgénique pour le gène *FoxJ1* (comme hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP), basée sur le système d'expression inductible CreER-loxP, la lignée FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>, a été utilisée (Muthusamy et al., 2014). Cette lignée fut croisée avec la lignée *floxed*, ROSA26-CAG-TdTomato afin d'avoir un gène rapporteur permettant de suivre l'expression de FoxJ1. En contraste avec les résultats précédents, des différences quant à la localisation anatomique des cellules recombinées furent constatées chez les souris FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> homozygotes. Celles-ci restent confinées aux seuls bords du canal central et au niveau de la plaque du plancher durant le développement. Il fut également constaté que le nombre de cellules recombinées TdTomato autour du canal central était jusqu'à cinq fois inférieur à celui observé chez les souris hFoxJ1::EGFP. Cette diminution s'accompagne d'une diminution significative du taux de prolifération de ces cellules recombinées à E13,5. Ce phénomène peut être mis en corrélation avec la présence du transgène CreER<sup>T2</sup> par les souris. Ainsi des souris génotypées WT présentent des taux de prolifération cellulaire plus important que les souris hétérozygotes et les hétérozygotes plus que les homozygotes. La délétion du gène *FoxJ1* influence également la différenciation des progéniteurs durant le développement. On observe qu'en comparaison avec les souris hFoxJ1::EGFP, les cellules recombinées perdent le phénotype de cellules épendymaires au profit d'un profil neurogénique mais sans que celles-ci ne parviennent à un stade de neurones pleinement mature.

A la lumière de ces résultats surprenants, il semblait évident que le gène *FoxJ1* était requis dans les mécanismes de migration et de prolifération des progéniteurs durant le développement et que son altération avait des conséquences. Ainsi, nous décidâmes d'analyser l'effet de cette délétion du gène *FoxJ1* par *knock in*, sur le potentiel souche des cellules épendymaires dans une moelle saine et lésée. C'est sur cette partie que j'ai travaillé durant ma thèse. Mon rôle a été de comparer le potentiel souche des cellules épendymaires *in vivo* et *in vitro* en utilisant les lignées hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP et FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>. Pour cela, j'ai réalisé différents tests *in vitro* de prolifération et de différenciation en utilisant des cultures de neurosphères issues des moelles spinales de ces deux lignées transgéniques à l'âge P10 et adulte. Une partie de ces tests a été réalisée en condition physiologique et l'autre partie des tests fut réalisée dans le cadre d'une lésion médullaire. J'ai donc réalisé l'ensemble de la procédure chirurgicale permettant l'induction d'une lésion médullaire thoracique par une hémisection dorsale de la moelle spinale suivie d'une période d'incubation de sept jours. Nous constatâmes que FoxJ1 est essentiel à la maintenance du potentiel souche de la moelle spinale. En effet, les cultures comparatives de neurosphères issues des deux lignées transgéniques, avec ou sans lésion et à deux âges différents, nous permirent de constater que la délétion de *FoxJ1* sur un allèle conduisait à une altération significative de l'auto-renouveau des cellules épendymaires et une diminution du nombre de neurosphères générées. Ceci était cohérent avec les résultats obtenus *in vivo* quant à la diminution du taux de prolifération des cellules épendymaires chez les souris FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> homozygotes et hétérozygotes. De plus, les tests de différenciation de ces neurosphères révélèrent également de profondes différences quant aux types de cellules générées. La différenciation *in vitro* des premières neurosphères issues des souris FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> hétérozygotes permit de constater que celles-ci génèrent plus de neurones et moins d'oligodendrocyte en comparaison avec les lignées contrôles hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP et WT.

Après une lésion médullaire, il fut constaté une rapide et importante prolifération des cellules épendymaires, qui sortent du canal central pour envahir la zone de lésion et participer à la cicatrisation médullaire. Ce phénomène est facilement observable chez la lignée transgénique hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP adulte. Deux semaines après la lésion, plus de 40% des cellules épendymaires recombinaées migrent vers la lésion et se différencient en astrocytes et en quelques oligodendrocytes. Pourtant chez la souris FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> hétérozygotes, nous avons constaté que la délétion sur un allèle du gène *FoxJ1* entraînait une diminution

significative de la proportion de cellules épendymaires recombinaées dTomato qui migrent après une lésion médullaire.

En conclusion ces travaux ont permis de démontrer que le gène *FoxJ1* ne se contente pas d'agir durant les processus d'établissement de la ciliogenèse, mais que son rôle est beaucoup plus large. L'expression du gène *FoxJ1* est indispensable pour la détermination du devenir des cellules progénitrices durant le développement embryonnaire de la moelle spinale et également dans l'entretien du potentiel souche de la moelle spinale adulte.

Ces travaux sont actuellement en cours de révision dans la revue *Journal of Neuroscience*.



# Article I

# FoxJ1 regulates spinal cord development and is required for the maintenance of spinal cord stem cell potential

**Authors:**

Xiaofei Li<sup>1\*</sup>, Elisa M. Floriddia<sup>1,6\*</sup>, Konstantinos Toskas<sup>1,7</sup>, Chaima Chalfouh<sup>2</sup>, Axel Honore<sup>2</sup>, Anne Aumont<sup>3</sup>, Nicolas Vallières<sup>4,5</sup>, Steve Lacroix<sup>4,5</sup>, Karl J.L. Fernandes<sup>3</sup>, Nicolas Guérout<sup>1,2#</sup> and Fanie Barnabé-Heider<sup>1#</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup>Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, 17177 Stockholm, Sweden

<sup>2</sup>Normandie Univ, UNIROUEN, EA3830, GRHV, 76000 Rouen, France; Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000 Rouen, France.

<sup>3</sup>Department of Neurosciences, Faculty of Medicine, Université de Montréal, H3C3J7 Montréal, QC, Canada

<sup>4</sup>Centre de recherche du Centre hospitalier universitaire (CHU) de Québec–Université Laval, G1R2J6 Québec, QC, Canada

<sup>5</sup>Département de médecine moléculaire, Faculté de médecine, Université Laval, Québec, G1V0A6 QC, Canada.

<sup>6</sup>Current address: Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, 17177 Stockholm, Sweden

<sup>7</sup>Current address: Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institutet, 17177 Stockholm, Sweden

\*Equal contribution

#Co-correspondence

**Address correspondence to:**

[fanie.barnabe-heider@ki.se](mailto:fanie.barnabe-heider@ki.se)

[faniebh@gmail.com](mailto:faniebh@gmail.com)

#Dr. Fanie Barnabé-Heider, Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, Stockholm 171 77, Sweden

Phone number: + 1 514 220 6371

**Co-correspondent:**

[nicolas.guerout@univ-rouen.fr](mailto:nicolas.guerout@univ-rouen.fr)

#Dr. Nicolas Guérout, Normandie Univ, UNIROUEN, EA3830, GRHV, 76000 Rouen, France; Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000 Rouen, France.

Phone number: + 33 6 22 71 72 17.

**ABSTRACT**

Development of the spinal cord requires dynamic and tightly controlled expression of numerous transcription factors. Forkhead Box protein J1 (FoxJ1) is a transcription factor involved in ciliogenesis and is specifically expressed in ependymal cells (ECs) in the adult central nervous system. However, using FoxJ1 fate-mapping mouse lines, we observed that FoxJ1 is transiently expressed by other subtypes of neural cells in addition to ECs during development. Moreover, using a knock-in mouse line, we discovered that FoxJ1 is essential for embryonic progenitors to follow a normal developmental trajectory. FoxJ1 loss perturbed embryonic progenitor proliferation and cell fate determination, and resulted in formation of adult ECs having impaired stem cell potential and an inability to respond to spinal cord injury in both male and female animals. Thus, our study uncovers unexpected developmental functions of FoxJ1 in cell fate determination of subsets of neural cells and suggests that FoxJ1 is critical for maintaining stem cell potential into adulthood.

**Key words:**

Neural progenitors; astrocyte subtypes; ependymal cells; self-renewal; differentiation; spinal cord injury

**SIGNIFICANCE STATEMENT**

Here we report the unexpected discovery that the transcription factor FoxJ1, considered specifically expressed by ependymal cells in the central nervous system and involved in ciliogenesis, is also required for the correct specification and migration of different progenitor cell types in the developing spinal cord. Furthermore, we show that FoxJ1 is also required for the maintenance of the stem cell potential and the of ependymal cells, the only cell type in the spinal cord retaining stem cell properties during adulthood and after spinal cord injury.

## INTRODUCTION

The spinal cord comprises the caudal region of the central nervous system (CNS) and is responsible for conveying motor and sensory information between the brain and the periphery, as well as for elaborating reflexes. During development, the spinal cord progenitor cells surrounding the ventricular zone, the nascent central canal, are subjected to their cell fate determination mainly by gradients of dorsal and ventral morphogens, where BMPs, Wnt, and Shh signaling are majorly involved (Charron and Tessier-Lavigne, 2005). The diffusion of these different morphogens activates or represses a number of transcription factor families, giving rise to the spatially segregated progenitor domains, marked by sets of transcription factors including Olig2, Pax2, Chox10, among others (Diez del Corral and Storey, 2001), along the dorsal-ventral axis of the ventricular zone from where distinct neuron types, first, and glial cells, later, will be generated (Goulding, 2009; Rowitch and Kriegstein, 2010).

During the neurogenic period, distinct cell types will be generated from these neuronal and glial progenitor cells and migrate from their homeodomains of origin to their final locations in the spinal cord, where they will engage in distinct specific functions (Panchision et al., 2001; Helms and Johnson, 2003; Dessaud et al., 2008; Alaynick et al., 2011; Yu et al., 2013; Anderson et al., 2014) . We have a good understanding of neurogenesis and the type of neurons that originate from each ventricular domain during development, on the other hand our understanding of the complex developmental origin of glial cells (astrocytes, oligodendrocytes, and ependymal cells), their fate specification, and consequent heterogeneity is more limited (Deneen et al., 2006; Zheng et al., 2010; Guérout et al., 2014; La Manno et al., 2016). Several subtypes of astrocytes are generated in a similar spatial manner around the ventricular zone, and migrate to the lateral region horizontally (Hochstim et al., 2008), however gliogenesis in the dorsal spinal cord has not been studied in detail yet (Guérout et al., 2014). Ependymal cells appear around the ventricular zone at E15.5 in mice. Their differentiation is dependent on Shh

signaling pathway and the expression of the transcription factor FoxJ1 (Yu et al., 2013; Li et al., 2016). In contrast to newly born astrocytes, ependymal cells that appear around E15.5 do not migrate away from the central canal, as they are involved in the production and regulation of cerebrospinal fluid, remaining proliferative and continuously expressing FoxJ1 during embryonic development and throughout adulthood (Meletis et al., 2008; Li et al., 2016). The heterogeneity of progenitor subtypes during development is reflected in the neural cell type variety generated and present later on in adulthood (Tsai et al., 2012; Bayraktar et al., 2014; Zeisel et al., 2015; Lake et al., 2016).

Ependymal cells can easily be identified by FoxJ1 expression, a transcription factor classically involved in ciliogenesis and expressed by diverse multi-ciliated cells, including cells in the choroid plexus, lung epithelium, oviduct and testis (Clevidence et al., 1994; Hackett and Weller, 1995; Murphy et al., 1997; Stubbs et al., 2008; Yu et al., 2008). Therefore, in the CNS, FoxJ1 is mostly considered a specific marker for ependymal cells. However, FoxJ1 is also expressed by subsets of progenitor cells. Indeed, some radial glial cells along the brain ventricles express it as well and its expression is required for proper differentiation into ependymal cells and a subset of astrocytes (Jacquet et al., 2009). A subset of progenitors also require FoxJ1 expression during the embryonic-to-postnatal transition in olfactory bulb neurogenesis (Jacquet et al., 2011). These studies suggest that FoxJ1 is important not only in ciliogenesis, but also in cell fate specification during development in the brain. However, its role during neurogenesis and gliogenesis in the developing spinal cord is still unknown.

Here, using three transgenic models, we report that FoxJ1 is transiently expressed not only by ependymal cells but also by other neural cell types during spinal cord development, including subsets of V1 and V2 interneurons and by astrocytes of unknown origin, suggesting that FoxJ1 is involved in cell fate specification during neurogenesis and gliogenesis in a spatio-

temporal specific manner. We also observed that FoxJ1 is involved in the regulation of progenitor cell proliferation during development, and maintenance of the ependymal cells stem cell potential from development to adulthood. In addition, we investigated the role of FoxJ1 in the adult ependymal cells activated by spinal cord injury and found that FoxJ1 is required for their migration towards the lesion site. In summary, we propose novel roles for FoxJ1 in the developing and adult spinal cord beyond ciliogenesis, paving the way for further studies on the development of spinal cord and identification of novel targets for regenerative therapies following SCI.

## Materials and methods

### Mice

All experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Swedish Board of Agriculture (ethical permit N329/11, N217/14) and were approved by the Karolinska Institutet Animal Care Committee.

We used three mice lines in this study, including randomized grouped male and females (**Figure 2**). 1) Non-inducible FoxJ1::EGFP (Ostrowski et al., 2003)( where the FoxJ1 promoter driving EGFP expression were used for tissue collection at E10.5-E17.5 and P0-P10. 2) Tamoxifen-inducible FoxJ1-CreER<sup>T2</sup> transgenic mice were crossed with Rosa26-YFP mice (Ostrowski et al., 2003; Meletis et al., 2008). 3) FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>:Tomato mouse line for the study of *FoxJ1* gene deletion effects, which was generated by crossing a knock-in mouse line with FoxJ1 deletion (Muthusamy et al., 2014) with ROSA26-CAG-tdTomato reporter mice (The Jackson Laboratory stock #007908) for lineage tracing. The mouse lines were bred with C57Bl6/J so that the same genetic background allowed us to safely compare the different conditions. To induce recombination in line 1 and 3, we injected intraperitoneally the dams with 60 mg/kg of body weight or gavaged mice 50mg/kg daily for 2 days or 5 days in embryonic and postnatal stage, respectively. These animals were sacrificed one day after the last tamoxifen administration, as indicated on the Figures.

### Tissue preparation and sectioning

At the end of the survival period, the adult animals (P60-P120) were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (150 mg/kg body weight) and perfused transcardially with 0.1 M PBS, pH 7.4, and 4% PFA in PBS, pH 7.4. Spinal cords from embryonic or early postnatal stages were dissected quickly on ice cold PBS after dams were sacrificed. Pups (P0-P10) were sacrificed by cervical dislocation and spinal cords were dissected on ice cold PBS. Dissected

spinal cords were further post-fixed in 4% PFA in PBS at 4°C overnight and cryoprotected in 30% sucrose for at least 48 h. After embedding in Tissue-Tek OCT compound, the spinal cords were cut to 16 µm-thick sagittal or coronal sections using a cryostat. Sections were collected 1:12 accordingly to stereological principles and stored at -20°C until further use.

### **Tissue processing**

For experiments involving *in situ* hybridization (ISH), time-pregnant dams at embryonic day 11.5, 13.5 and 15.5 were overdosed with a mixture of ketamine and xylazine and transcardially perfused with a 0.9% saline solution followed by 4% paraformaldehyde (PFA), in borax buffer, pH 9.5. Embryos were collected, post-fixed for 2 days in PFA, and then placed in a 4% PFA-borax/10% sucrose solution until tissue processing. For neonatal mice, pups were killed by decapitation under ice anesthesia at post-natal day 10 (P10). Brains and spinal cords were dissected out and placed in fixative for 2 days, followed by transfer in a 4% PFA-borax/10% sucrose solution.

Frozen brains were mounted on a microtome and cut into 30-µm coronal sections from the olfactory bulb to the end of the medulla. Tissue sections were collected in a cold cryoprotectant solution and stored at -20 °C. All solutions were treated with diethylpyrocarbonate (DEPC) and sterilized to prevent RNA degradation. Spinal cords were embedded in OCT compound and then cut in 7 series of 14-µm-thick coronal sections using a cryostat (model CM3050S; Leica Biosystems). All spinal cord sections were collected directly onto X-tra Slides having a permanent positive charged surface (Leica Biosystems) and stored at -20 °C until use.

### **In situ hybridization (ISH)**

ISH was performed to detect mouse FoxJ1 mRNA following our previously published method (Pineau and Lacroix, 2007). In brief, a coding sequence of 831 base pairs matching

only the FoxJ1 gene, as verified by BLAST analysis in Genbank, was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from a C57BL/6 mouse brain cDNA library using the same primers used in the Allen Developing Mouse Brain Atlas (forward 5'-ACATCAACTGCCCTGCTACCT-3'; reverse 5'-CTAGCGGGCTTAGAGACCATTT-3'). The amplicon was cloned into the pCR-Blunt II expression vector (Thermo Fisher Scientific Inc.). Radiolabeled cRNA probes were transcribed from linearized cDNAs using the Riboprobe Combination System SP6/T7 (Promega Corporation) in the presence of both [<sup>35</sup>S]-UTP and [<sup>35</sup>S]-CTP (Perkin Elmer). Brain and spinal cord sections were pre-hybridized, hybridized and post-hybridized as before (Pineau and Lacroix, 2007), except for the step in which sections were permeabilized with proteinase K. Instead, a 1.25 mg/mL (~0.0025 U/mL) solution of proteinase K was made and tissue sections digested for 5 minutes for spinal cords and 10 minutes for brains.

All images were acquired using a QIClick™ CCD Camera (QImaging) installed on a Nikon Eclipse 80i microscope.

### **Surgical procedure and postoperative care**

Dorsal funiculus transection was performed to mice at T10 level in the spinal cord. The surgical procedure and postoperative care was previously described in detail (Li et al., 2016). Briefly, the skin was incised at thoracic level and laminectomy performed to expose the spinal cord at T9-10 level. The spinal cord was transected with a micro knife (Fine Scientific Tools) in order to damage the dorsal finiculi. The central canal is left untouched by the procedure. The mice were checked daily for signs of distress and to monitor the physiological recovery of functions after injury.

## **Immunohistochemistry**

Spinal cord sections were blocked with 10% normal donkey serum, 0.3% Triton X-100 in PBS for 1 h at room temperature. Primary and secondary antibodies were diluted in 2% BSA, 0.2% Triton X-100 in PBS. Primary antibodies were incubated at room temperature (RT) overnight and secondary antibodies were incubated for 1 hour at RT. AlexaFluor conjugated secondary antibodies (Invitrogen) were used. Counterstaining was performed with DAPI (1:10,000) in PBS and sections were coverslipped with Vectashield mounting media. Full details of the primary antibodies used are reported in **Table 1**.

## **Neural stem cell cultures**

### ***Culture***

Animals were sacrificed for control culture or one week after SCI. Spinal cord cells were dissociated and neurosphere cultures were established as described before (Meletis et al., 2008; Li et al., 2016). After counting, cells isolated from one spinal cord were plated in T25 flasks. Primary neurospheres were harvested after 12 days in culture then were dissociated into single cells for passage or differentiation. Approximately 100,000 cells per animal were plated in T25 flasks for the next generation of neurospheres, and all the new neurospheres (second and third generation) were harvested after one week in culture. Dissociated primary neurospheres, approximately 70,000 cells/well, were plated in poly-L-lysine-coated chamber slides (Sigma) for differentiation with growth factor-free medium supplemented with 1% fetal bovine serum.

### ***Immunocytochemistry***

In order to assess the recombination rate after 12 days *in vitro*, approximately 100-200 recombined primary neurospheres were plated in poly-L-lysine-coated chamber slides for one day, followed by fixation with 4% PFA (20 minutes at room temperature) and immunocytochemistry for quantification of recombined neurospheres with either an anti-GFP

or anti-TdTomato antibody. For differentiation assay, after 10 days in growth factor-free differentiation condition, immunocytochemistry was performed as described above. Full details of the primary antibodies used are reported in **Table 1**.

### ***Cell culture analysis***

For the neurosphere proliferation assay, neurospheres were sampled from one culture dish in quadruplicate (250 ml per time) and the numbers of neurospheres were counted. The total number of neurospheres was calculated per total volume of media (30-35 ml per dish). For the neurosphere differentiation assay, we performed immunocytochemistry and quantified the marker expression by counting at least 6 fields of views selected in a randomized fashion (20X magnification) per well under fluorescence microscope. At least two wells for one marker per animal and condition were used for quantification of a minimum of 3 animals per group. The total number of cells was obtained counting DAPI<sup>+</sup> nuclei stained.

### **Image acquisition and tissue analysis**

Confocal representative images of the spinal cords were acquired using the Zeiss LMS700 microscope set up (Zeiss). Quantification of the number of cells were performed using the Zeiss Apotome2 microscope set up (Zeiss). For the quantification, the regions along the rostral-caudal axis (cervical, thoracic and lumbar segments) were analyzed separately. In the same fashion, we quantified the grey matter, central canal, lateral white matter, dorsal white matter and floor plate. The tissue quantification was performed on at least 3 sections per segment and area. For each experimental group and marker, 3-9 animals were analyzed.

**Experimental design and statistical analysis**

We performed Student's T-test for comparing two groups and Student's T-test with Bonferroni's correction for more than two groups' comparisons by statistical analysis software Prism version 6.0. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001. For each experimental group and marker staining, 3-9 animals were analyzed.

## RESULTS

### Spatiotemporal changes in FoxJ1 expression in the developing spinal cord

FoxJ1 transcription factor is expressed in cells with motile cilia, and is specifically expressed in ependymal cells since their appearance at E15.5 in the developing spinal cord (Meletis et al., 2008; Barnabé-Heider et al., 2010; Li et al., 2016). Surprisingly, *in situ* hybridization analysis showed that FoxJ1 mRNA is widely expressed along the ventricular zone in the developing spinal cord as early as E11.5, and decreases postnatally. The expression is restricted to the central canal by P10 (Figure 1).

To examine the different cell types expressing FoxJ1 mRNA during development, we used the FoxJ1::EGFP transgenic mice (Figure 2A) in which the expression of enhanced green fluorescence protein is driven by the human FoxJ1 promoter (Ostrowski et al., 2003). During early development (E10.5-E14.5), we observed FoxJ1 promoter activity in the grey matter and floor plate of the embryonic spinal cord, but not around the ventricular zone. Between E15.5 and E16.5, when ependymal cells originate in the spinal cord (Li et al., 2016), FoxJ1 promoter activity is present in the ventricular zone, floor plate, and in the ventral-lateral grey matter. During late gestation (E17.5), the total number of EGFP<sup>+</sup> cells reached the highest number and appeared also in the dorsal white matter. Early postnatally (P2), the number of EGFP<sup>+</sup> cells decreased dramatically in all regions except for the central canal, which is then surrounded by mature ependymal cells. By P10, EGFP expression was limited to central canal ependymal cells (Figure 3A). Quantification of EGFP<sup>+</sup> cells confirmed these observations (Figure 3 B-E), and further revealed heterogeneous FoxJ1 promoter activity along the rostral-caudal axis (cervical, thoracic and lumbar regions) (Figure 3B-E). We summarize the spatial-temporal dynamic distribution of the EGFP<sup>+</sup> cell populations in the developing spinal cord of the FoxJ1::EGFP mice in the schematic (Figure 3F).

---

## **FoxJ1 promoter is active in subtypes of neurons, astrocytes, and ependymal cells in the developing spinal cord**

### ***A subset of V1 and V2 interneurons express FoxJ1 during neurogenesis in the spinal cord.***

We next identified and quantified the cell types showing FoxJ1 promoter activity by immunofluorescence. During early development (E10.5-E13.5), FoxJ1::EGFP signal was detected in interneurons expressing the pan-interneuron marker PAX2 (Figure 4A-C). Interneurons express subtype-specific markers in the medial-lateral homeodomains at the ventricle of the spinal cord during early development (Alaynick et al., 2011). We found that V0 interneurons (EVX1<sup>+</sup>) do not expressed FoxJ1::EGFP and a limited number of V2 interneurons (Chx10<sup>+</sup>) expressed FoxJ1::EGFP (Figure 4D-F). None of the FoxJ1::EGFP<sup>+</sup> cells originated from the Olig2<sup>+</sup> motor neuron (pMN) domain (Figure 4G). FoxJ1::EGFP<sup>+</sup> interneurons are already post-mitotic at E10.5 and in our experimental paradigm we observed that they did not express the proliferation marker Ki67 (Figure 4H). Thus, we conclude that most FoxJ1::EGFP<sup>+</sup> cells are V1 interneurons and a small subset are V2 interneurons.

### ***Subpopulations of dorsal and lateral astrocytes express FoxJ1::EGFP during gliogenesis in the developing spinal cord.***

We further characterized the FoxJ1::EGFP<sup>+</sup> cells in the dorsal and lateral areas of the spinal cord (Figure 5A). Immunostaining with several astrocyte progenitor markers, including Sox9, Vimentin and GFAP, showed that subsets of lateral and dorsal astrocytes (Figure 5B-E, J-N, P) express FoxJ1 during the peak of gliogenesis period (E15.5-E17.5). There is little knowledge about the developmental origin of spinal cord astrocytes, but previous studies have shown that astrocytes derived from the lateral ventricular zone progenitors migrate horizontally towards the lateral white matter (Hochstim et al., 2008). We found a similar pattern of localization of

FoxJ1::EGFP<sup>+</sup> astrocytes in the lateral white matter. As early as E13.5, a small subset (around 20%) of FoxJ1::EGFP<sup>+</sup> lateral astrocytes expressed Reelin and this expression increased later on (reaching around 40%) (Figure 5 F-I, O).

Interestingly, we found that another subset of FoxJ1::EGFP<sup>+</sup> astrocytes migrates from the dorsal apical domain of the ventricular zone to the dorsal funiculi of the spinal cord. FoxJ1::EGFP expressing lateral astrocytes appear at E13.5, while the FoxJ1::EGFP<sup>+</sup> dorsal astrocytes appear at E15.5. The dorsal population is smaller than the lateral astrocyte population (Figure 5N-P). Postnatally, these two astrocyte populations do not exhibit FoxJ1 promoter activity (Figure 5F-I, O). However, FoxJ1 promoter activity was not associated with oligodendrocyte development, based on immunofluorescence for the oligodendrocytic marker Olig2 at late developmental stages (E17.5; data not shown). Our observations suggest that FoxJ1 is expressed and potentially involved in the development and migration of specific astrocyte populations during embryogenesis.

#### ***Ependymal cells and floor plate progenitors express FoxJ1::EGFP***

Consistent with our previous study (Li et al., 2016), we found that the first FoxJ1::EGFP<sup>+</sup> ependymal cells appeared at E15.5 and highly expressed Vimentin and Sox9. The co-expression of these markers with FoxJ1::EGFP increased during development and reached almost 100% postnatally around the central canal (Figure 6 B,C,F,G). On the other hand, floor plate cells expressed FoxJ1::EGFP already at E10.5, and this expression slowly decreased until disappearing postnatally. Floor plate cells display a high expression of progenitor markers, such as Vimentin, and an oscillating expression pattern of Sox9 (Figure 6 D,E,H,I). Moreover, we observed that FoxJ1<sup>+</sup> cells displayed active but diverse proliferation level at different regions in the developing spinal cord (Figure 6 J-M).

Together, our data show that the FoxJ1 promoter is active in multiple different neural cell types during both neurogenic and gliogenic periods of spinal cord development (summarized in Figure 10), representing a potentially useful marker for further study of the developmental origin and function of these cell types.

### **FoxJ1 is involved in progenitor proliferation in the developing spinal cord**

To shed light on the role of FoxJ1 during spinal cord development, we took advantage of a FoxJ1 knock-in (KI) mouse line in which an exon of the endogenous *FoxJ1* gene has been replaced by CreER<sup>T2</sup>, effectively knocking out the *FoxJ1* allele (FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>, Figure 2C). By crossing FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> mice with a floxed reporter strain (in this case, ROSA26-CAG-TdTomato reporter mice), we can map the cells in which at least one of the *FoxJ1* alleles has been knocked out (Muthusamy et al., 2014). Tamoxifen was administered at either E10.5-11.5, E11.5-12.5, E13.5-14.5 or E15.5-16.5, and embryos analyzed one day later. In contrast to our findings using FoxJ1::EGFP and FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice (Figure 2A-B), we found that TdTomato<sup>+</sup> cells were found only surrounding the central canal and floor plate, but not in the parenchyma (Figure 7A-D).

The genetic background and the tamoxifen treatment to induce recombination are identical between the FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato and the FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mouse lines used in this study, as such we exclude that the more than five-fold difference observed in the number of recombined cells around the central canal during development is affected by a different recombination behavior (Figure 7C-D, H). The recombination difference was further excluded from recombination efficiency by comparing the recombination of ependymal cells around central canal in adults in the FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato and FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mouse lines (elaborated later on in Figure 8).

In FoxJ1<sup>+/+</sup> mice, we found that FoxJ1<sup>+</sup> cells actively proliferate in a heterogeneous manner during embryogenesis (Figure 6 J-M). However, comparing FoxJ1<sup>+/+</sup> mice (FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP) to FoxJ1<sup>+/-</sup> and FoxJ1<sup>-/-</sup> mice (FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato), we observed a significant reduced proliferation of those reporter<sup>+</sup> cells (FoxJ1 promoter active cells) (Figure 7E-G, I). Analysis of Ki67 expression during the neurogenic E13.5 period showed that the ratio of FoxJ1 promoter-active cells with proliferation capacity is significantly lower in both FoxJ1<sup>+/-</sup> and FoxJ1<sup>-/-</sup> embryos, and in all the neural cell types expressing the FoxJ1 promoter. However, by mid-late embryonic gliogenic period, there was no longer a significant difference in proliferating reporter-expressing cells between all the groups (Figure 7I), suggesting that FoxJ1 is more implicated in progenitor proliferation during neurogenesis. Also our *in situ* data (Figure 1) clearly showed that FoxJ1 mRNA is largely expressed by progenitors at the onset of that developmental period. Thus, consistent with a previous study showing the involvement of FoxJ1 in progenitor proliferation and differentiation in the developing brain (Jacquet et al., 2009, 2011), we suggest that FoxJ1 is required for the proliferation and migration of at least a portion of FoxJ1<sup>+</sup> progenitors during spinal cord development (Figure 11).

### **FoxJ1 is required for maintaining the stem cell potential of spinal cord progenitors**

It has been shown that FoxJ1 is required for ependymal cell differentiation in the developing brain (Jacquet et al., 2009, 2011). To further characterize the role of FoxJ1 during cell fate specification in the developing spinal cord, we quantified the ratio of various markers expressed by reporter-positive cells in both FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP and FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mice. This revealed that FoxJ1 deletion was associated with a statistically significant (more than three-fold) reduction in reporter-positive cells expressing the ependymal cell markers Sox9 and Vimentin around the central canal (Figure 7 J,K,M,N). On the other hand, these FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato cells showed a significant upregulation of the pan-

interneuron marker Pax2 (Figure 7 L and O), even though they did not co-express the other neuronal markers DCX or NeuN (data not shown). These results suggest that the deletion of FoxJ1 (one or both alleles) in progenitor cells leads these cells to premature exit from their proliferating phase, increases their neurogenic lineage specification yet prevents them from maturing or terminally differentiating.

To further study how the loss of *FoxJ1* gene expression affects stem cell properties, we performed proliferation and differentiation assays *in vitro* using neurospheres generated from both FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato and FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice. Proliferation and differentiation assays were performed isolating cells from P10 spinal cords, an age at which all spinal cord stem cell potential has normally been confined to ependymal cells (Li et al., 2016). Since homozygous *FoxJ1* knockout leads to perinatal lethality (Muthusamy et al., 2014), only FoxJ1<sup>+/-</sup> P10 pups could be used for this set of experiments. After tamoxifen administration to dams of FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato and FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP pups (P5-P9), P10 pups were sacrificed and their spinal cords were dissociated and cells were cultured to produce primary neurospheres (Figure 8A). To investigate whether all the ependymal cells can give rise to neurospheres and be able to self-renew in both mouse lines, we compared the ratio of neurospheres that were recombined *in vitro* to the ratio of central canal ependymal cells that were recombined *in vivo* from the same animal. Consistent with our previous study (Li et al., 2016), we found that all recombined ependymal cells in FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice can give rise to recombined neurospheres. However, this declined to only 60% of recombined ependymal cells in the FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mice (Figure 8A-B). Performing the same experiment with adult spinal cords, we observed similar results (Figure 8C). These data suggest that the loss of one copy gene of *FoxJ1* perturbs the ependymal cells stem cells potential, as the FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato show a significant decreased ability to generate neurospheres *in vitro* both at neonatal and adult stages.

Interestingly, even though the recombination rate of the neurospheres derived from FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mice was significantly lower than the rate of neurospheres derived from FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice, the recombined neurospheres (TdTomato<sup>+</sup>) completely took over the culture after the first passage. This indicates that the deletion of one copy of *FoxJ1* does not shift the stem cell potential to a cell population other than ependymal cells (Figure 8D-E). Moreover, we found that FoxJ1 is also involved in the self-renewal capacity. Indeed, this neurosphere-generating capacity (the total number of neurospheres from 100,000 cells) generated from P10 WT and FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice (YFP<sup>+</sup> neurospheres from 100,000 cells) was not significantly different over three passages, but it was significantly decreased in the FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mice (TdTomato<sup>+</sup> neurospheres from 100,000 cells) (Figure 8F). During passages, all the neurospheres were derived from ependymal cells, which are the only cell type expressing FoxJ1 since P10 (Figure 8D-E). However, the self-renewal potential in FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-Tomato was significantly lower than FoxJ1<sup>+/+</sup> cells from WT or FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP (Figure 8F). As FoxJ1<sup>+</sup> ependymal cells are the only cell type that can generate neurospheres with capability to maintain this potential during passages *in vitro* (Barnabé-Heider et al., 2010) , our data show that the loss of one copy of *FoxJ1* leads to lower self-renewal potential of ependymal stem cells in the spinal cord.

After differentiation of the primary neurospheres in the above described experiments, we further found that the primary FoxJ1<sup>+/-</sup> neurospheres generated from FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mice produced significantly fewer oligodendrocytes (CNPase<sup>+</sup>) and astrocytes (Sox9<sup>+</sup>) but more neurons (Tuj1<sup>+</sup>) compared to both WT and FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice. This is consistent with our *in vivo* quantifications that indicated that *FoxJ1* deletion forces progenitor cells to prematurely leave the progenitor/stem cell phase, and *in vitro* promotes neurogenesis (Figure 8 G-I).

**FoxJ1 is required for the recruitment of ependymal cells following spinal cord injury**

Using the FoxJ1-CreER<sup>T2</sup> lineage-tracing model, ependymal cells have been shown to be the source of neurosphere-forming stem cells in the adult spinal cord, and to respond robustly following spinal cord injury (SCI) (Meletis et al., 2008; Barnabé-Heider et al., 2010; Sabelström et al., 2013; Li et al., 2016). However, the contribution of ependymal cells to SCI has been recently challenged in a study using the FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato lineage tracing model (Ren et al., 2017). Since we observed here that both alleles of the *FoxJ1* gene are required for the proliferation of progenitor cells and maintenance of stem cell potential and cell fate determination under normal physiological conditions (Figures 7-8), we performed a side-by-side comparison of the ependymal cell response to spinal cord injury (SCI) in the FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP and FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mouse models to test whether the loss of even one *FoxJ1* allele was responsible for the reported different contribution of ependymal cells after SCI (Meletis et al., 2008; Barnabé-Heider et al., 2010; Sabelström et al., 2013; Li et al., 2016; Ren et al., 2017).

Spinal cord ependymal cells from both FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP and FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mice express the progenitor markers Sox9, Vimentin, Nestin and CD133 in the adult (Meletis et al., 2008; Barnabé-Heider et al., 2010; Ren et al., 2017). We performed a mild dorsal funiculus lesion in both transgenic mouse lines and we observed consistent results with all previous studies (Meletis et al., 2008; Barnabé-Heider et al., 2010; Ren et al., 2017). Indeed, two weeks after SCI, ependymal cells migrated to the lesion site in FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice while only few ependymal cells migrated in FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mice (43% versus 18%, respectively; Figure 9A-B). To verify the recombination frequency which could have interfere with our reported results, we quantified the recombination rate in FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP and FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mice *in vivo* and *in vitro*. We showed 85% recombination of ependymal cells *in vivo* in both transgenic lines (Figure 9C). Surprisingly,

FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP and FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato showed 85% and 60% recombination rate in neurosphere culture, respectively (Figure 9D-E), but both neurosphere culture were fully formed from recombined cells after the second passage (Figure 9H). This suggests that FoxJ1<sup>+</sup> ependymal cells remained the source of stem cells after SCI also in FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mice, although with diminished potential.

We also assessed the self-renewal and differentiation potential of the FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato neurospheres following injury. We observed that losing one copy of *FoxJ1* gene does not result in increased self-renewal capacity after SCI but leads to lower oligodendrocytic and higher neurogenic differentiation potential of ependymal cells compared to both WT and FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP cultures (Figure 9F,G,I-J)(Panayiotou and Malas, 2013). These findings indicate that FoxJ1 is critical for normal ependymal self-renewal capacity, glial-neuronal differentiation potential, and migration under both physiological conditions and after SCI.

Altogether, our data suggest that FoxJ1 is transiently expressed by different neural cell types and is required for cell fate determination of specific progenitors during spinal cord development. Furthermore, FoxJ1 is also required for the expression of stem cell properties in ependymal cells under normal condition or after SCI.

## DISCUSSION

In this study, we discovered several unexpected and unreported functions of FoxJ1 during spinal cord development and regeneration, using three transgenic models (Figure 2A-C). We showed that FoxJ1 is not only expressed in ependymal cells, but is also transiently expressed in various cell types, including interneurons and astrocytes, in restricted zones of the developing spinal cord. *FoxJ1* gene deletion revealed novel roles for FoxJ1 in proliferation and glial-neuronal cell fate determination of progenitor cells in the developing spinal cord. Furthermore, we found that loss of a single allele of the *FoxJ1* gene was sufficient to compromise the maintenance of the stem cell potential of ependymal cells during spinal cord development, throughout adulthood and following SCI.

FoxJ1 has been widely studied for its role in ciliogenesis and has been regarded as one of the key transcription factors for ciliary biogenesis (Choksi et al., 2014). In the adult spinal cord, FoxJ1 is specifically expressed by ependymal cells and used as a specific marker for this cell population (Meletis et al., 2008; Barnabé-Heider et al., 2010). We have previously reported that the first FoxJ1<sup>+</sup> ependymal cells appear at E15.5 in the mouse spinal cord (Li et al., 2016).

Here we report that FoxJ1 is also transiently expressed in other cell types in the developing spinal cord (summarized in Figure 10). In the spinal cord, FoxJ1 expression first appears at E10.5 in V1 and a subset of V2 interneurons. From E13.5 to E17.5, FoxJ1 is no more expressed by neurons but is expressed in subpopulations of astrocytes in the lateral white matter and the dorsal funiculus, as well as in ependymal cells around the central canal. Astrocytes constitute one of the more abundant cell populations in the spinal cord and are functionally heterogeneous (Tsai et al., 2012), however our current understanding of their developmental origin is quite limited. A very elegant study reported that astrocyte progenitor cells migrate horizontally from the ventricular zone to the lateral white matter (Hochstim et al., 2008). In accordance with and

complementary to these findings, we observed a subset of FoxJ1<sup>+</sup> astrocytes that migrate horizontally from a lateral domain and dorsally from the apical domain of the ventricular zone to the ventrolateral white matter and the dorsal funiculus, respectively. We suggest that FoxJ1 might be used as a novel marker for future study of different neural cell subtypes in the developing spinal cord.

During development of the brain, FoxJ1 is involved in the migration and differentiation of progenitor cells towards the olfactory bulbs (Jacquet et al., 2011). We observed that FoxJ1 might also be involved in migration of progenitor or stem cells in the developing spinal cord. Indeed, when we deleted only one allele of *FoxJ1*, we observed a very limited number of FoxJ1<sup>+/-</sup> cells that were all restricted to the ventricular zone/central canal.

After SCI, the FoxJ1<sup>+/-</sup> ependymal cells also failed to migrate to the injury site. Therefore, the absence of FoxJ1 appears to prevent migration and proliferation of some progenitor cells, without development of major physiological impairments, such as hydrocephalous or dysplasia. Moreover, it has been shown that FoxJ1 is required for embryonic-to-postnatal transition during olfactory bulb neurogenesis (Jacquet et al., 2011). We found that deletion of FoxJ1 leads to a higher ratio of the PAX2<sup>+</sup> interneurons and lost expression of the mature neuron marker NeuN. These results suggest that the deletion of FoxJ1 enhances the neurogenic potential of FoxJ1<sup>+</sup> progenitors towards an interneuron fate, with reduced differentiation into fully mature neurons. Altogether, we suggest that FoxJ1 is involved in the regulation of proliferation and differentiation of different types of progenitor cells in the whole CNS. Interestingly, a recent study showed similar unexpected results after deletion of the transcription factor Prdm16, which is involved in neural stem cell maintenance and ciliogenesis. However, its deletion at postnatal developmental stage results in no effect on ciliogenesis, but leads to downregulation of FoxJ1

---

expression and upregulation of genes associated with neuronal differentiation that interfere with ependymal cell differentiation potential (Shimada et al., 2017).

FoxJ1 has not been considered a pivotal transcription factor in stem cells, but we observed that FoxJ1 is important to preserve the stem cell potential of spinal cord ependymal cells. Indeed, we cultured *FoxJ1*<sup>+/+</sup> cells from P10 and adult *FoxJ1*<sup>+/-</sup> mice, and in both ages and conditions, we observed that the loss of a single copy of the *FoxJ1* gene leads to significantly reduced self-renewal of ependymal cells and fewer neurospheres. Previously, we described that the injury of the spinal cord enhances the self-renewal potential of spinal cord ependymal cells (Meletis et al., 2008; Barnabé-Heider et al., 2010; Li et al., 2016). To test whether the injury could rescue the phenotype of the *FoxJ1*<sup>+/-</sup> neurospheres, we put them in culture from the adult injured spinal cord, and again observed reduced self-renewal potential and diminished ability to generate neurospheres in culture. Thus, FoxJ1 is a key transcription factor for the maintenance of stem cell potential by spinal cord ependymal cells. Moreover, this is consistent with our *in vivo* data showing that the deletion of one *FoxJ1* allele leads to failure of FoxJ1<sup>+</sup> progenitor cell proliferation.

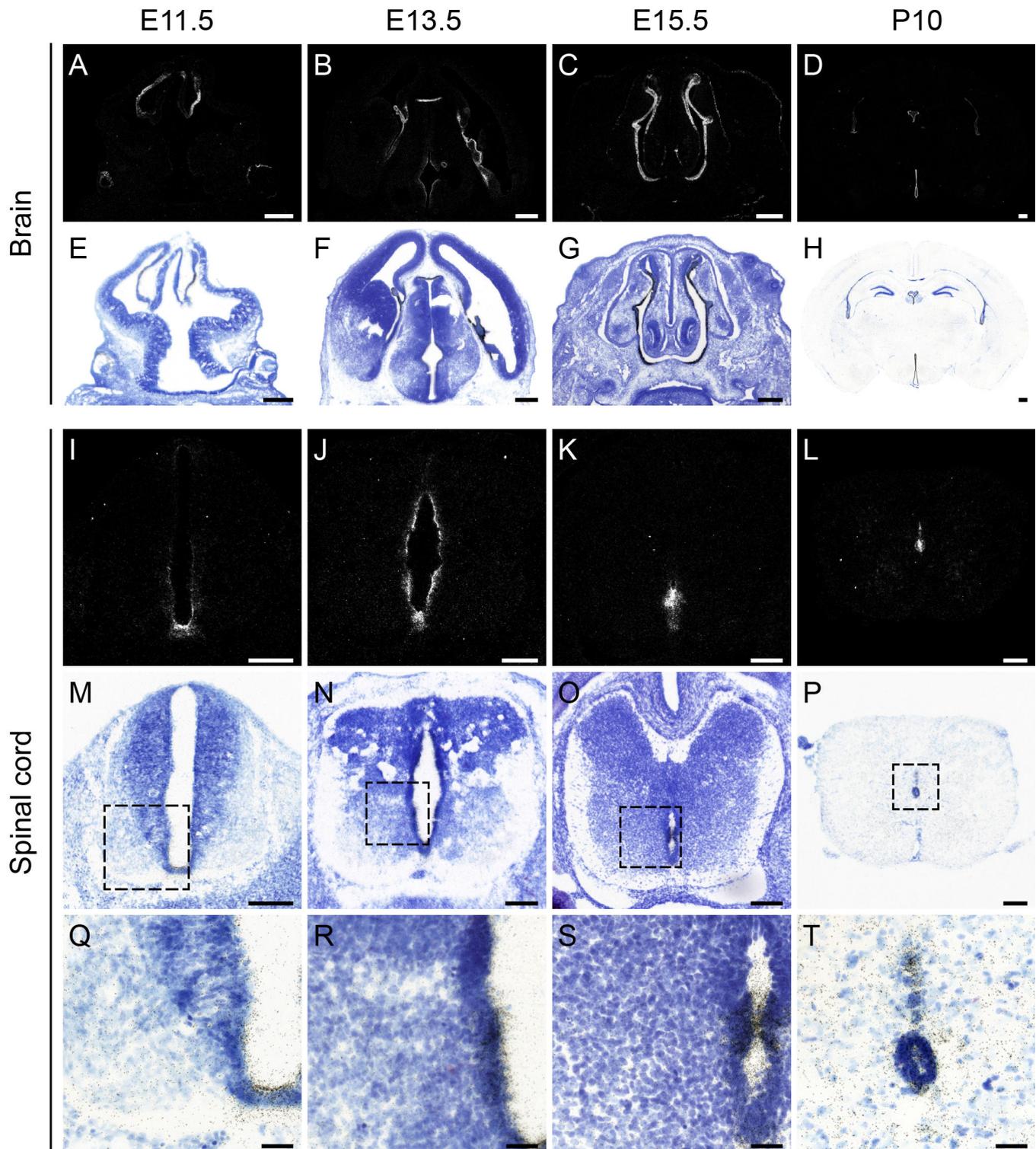
In summary we conclude that FoxJ1 is involved in both cell fate determination of progenitor cells in the developing spinal cord and for the maintenance of stem cell potential during development and adulthood, opening a broader function to cilia (Guemez-Gamboa et al., 2014).

Our findings shed light on a recent controversy regarding the contribution of ependymal cells to the glial response following SCI (Ren et al., 2017). In that study, the authors used the FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mouse model as a lineage-tracing tool for FoxJ1-expressing ependymal cells. Here, we likewise observed that ependymal cells in the FoxJ1-KI model are

largely unresponsive to SCI, in marked contrast to ependymal cells in the FoxJ1CreER<sup>T2</sup>::YFP model used here and in our previous studies (Meletis et al., 2008; Barnabé-Heider et al., 2010; Sabelström et al., 2013; Li et al., 2016; Ren et al., 2017). Importantly, here we show that the deletion of even one allele of the *FoxJ1* gene leads to substantial effects on progenitor cell specification, maintenance of stem cell properties, and differentiation potential of ependymal cells compared to both WT and FoxJ1CreER<sup>T2</sup>::YFP neurospheres (Barnabé-Heider et al., 2010; Li et al., 2016). Our results suggest that the FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mouse model is sub-optimal for fate mapping aimed at characterizing the normal behavior of ependymal cells in physiological or pathological conditions. Furthermore, recent work from our laboratory (Li et al., 2016) suggests that the response of ependymal cells to injury of the spinal cord is more complex than previously appreciated. Indeed, we showed that juvenile ependymal cells are able to sense the severity of the injury and are activated and migrate towards the injury site only in case of severe trauma, while adult ependymal cells are activated by both mild and severe injury. In this study, we suggest that ependymal cells play a role of cellular reservoir of the spinal cord for self-repair (Li et al., 2016).

In conclusion, here we show that FoxJ1 is transiently expressed by subsets of interneurons, astrocytes, ependymal, and floor plate cells in discrete niches of the developing spinal cord. Moreover, we report that FoxJ1 is not only involved in ciliogenesis, but also in proliferation and cell fate determination of distinct progenitor and stem cells and it is required for the maintenance of stem cell properties in ependymal cells during development, adulthood and after injury. Thus, our study expands our understanding of the role of FoxJ1 in the spinal cord. This paves the way for further studies on developmental and stem cell biology and the investigation of FoxJ1 as a potential therapeutic target.

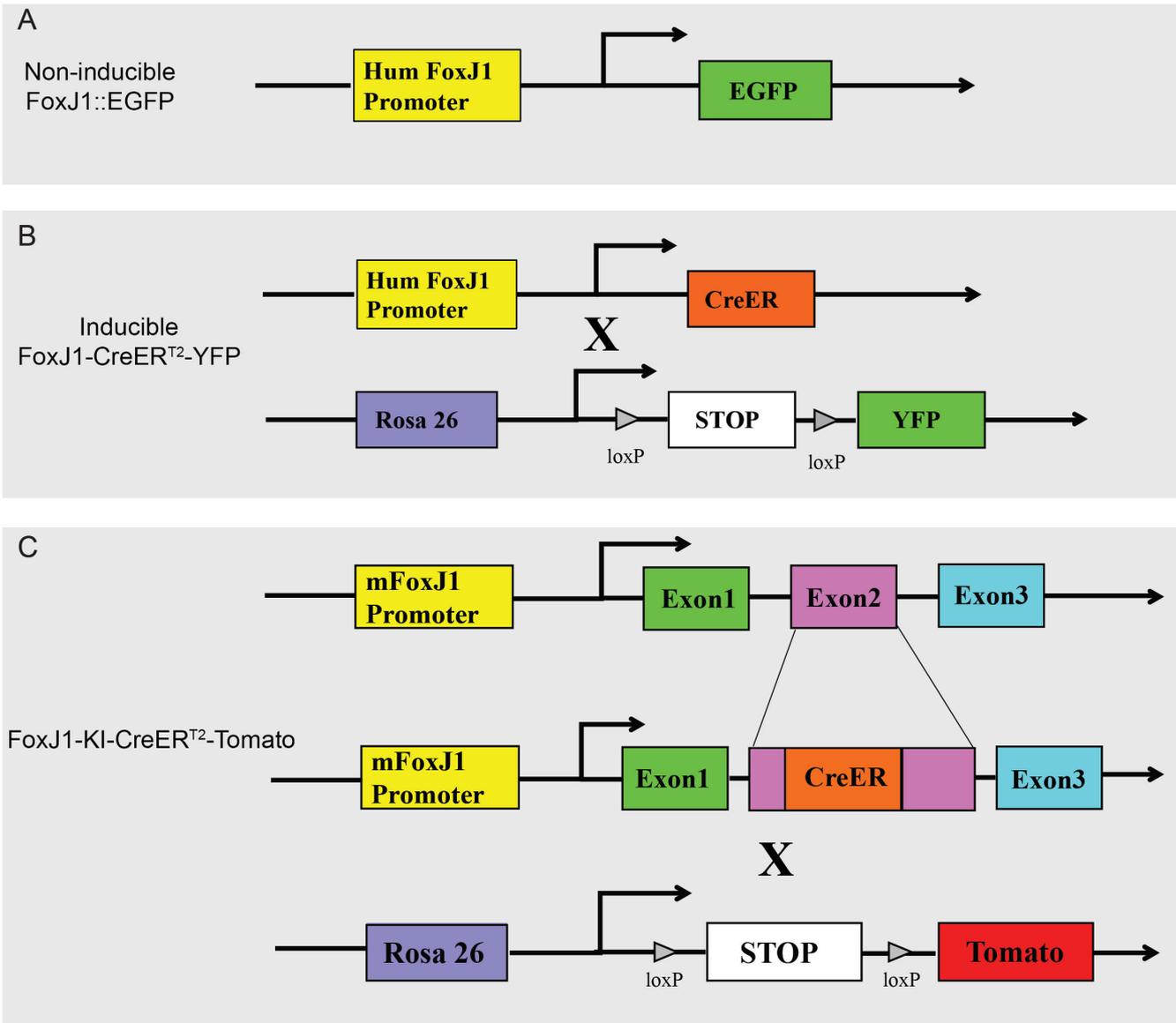
Figure 1. Li & Floriddia et al., 2017



**FIGURE LEGENDS****Figure 1. In situ hybridization for *FoxJ1* mRNA expression in the developing spinal cord.**

*FoxJ1* mRNA is expressed in cell layers lining the ventricles of the mouse brain and spinal cord starting from E11.5. A-T) Representative dark- and bright-field photomicrographs showing *FoxJ1* mRNA expression in the brain (A-H) and spinal cord (I-T) of C57BL/6 mice at E11.5 (A, E, I, M, Q), E13.5 (B, F, J, N, R), E15.5 (C, G, K, O, S), and P10 (D, H, L, P, T). High magnification views of the thionin-stained sections in Q-T, corresponding to insets in panels M-P, allowing visualization of *FoxJ1* mRNA within the anatomical boundaries of the ventricular zone cell layers. Of interest, the presence of a strong *in situ* hybridization signal all around the spinal cord ventricular zone at E13.5 indicates that many neural progenitors are expressing *FoxJ1* mRNA. Scale bars = 250  $\mu\text{m}$  (A-H); 100  $\mu\text{m}$  (I-P); 25  $\mu\text{m}$  (Q-T).

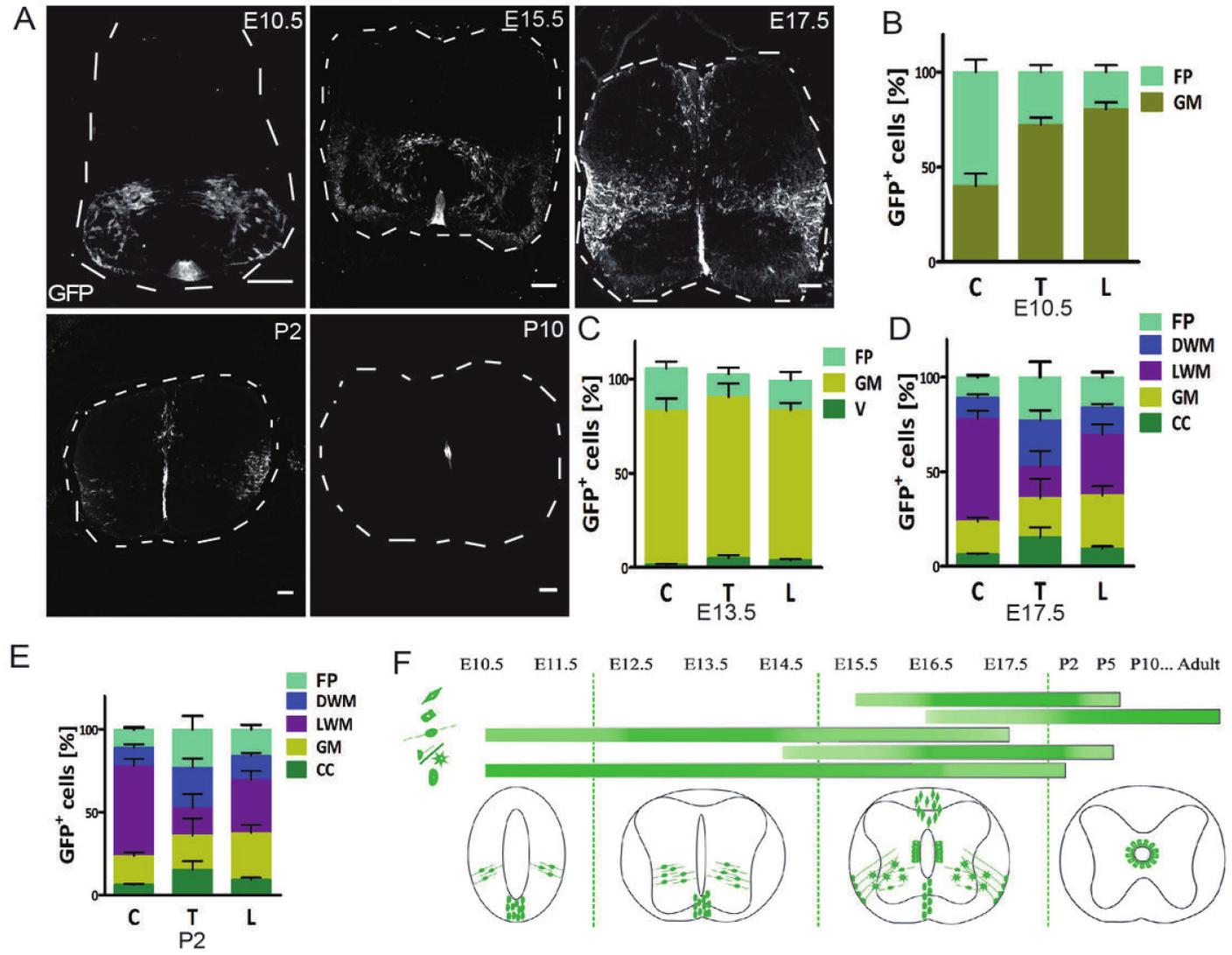
Figure 2. Li & Floriddia et al., 2017



---

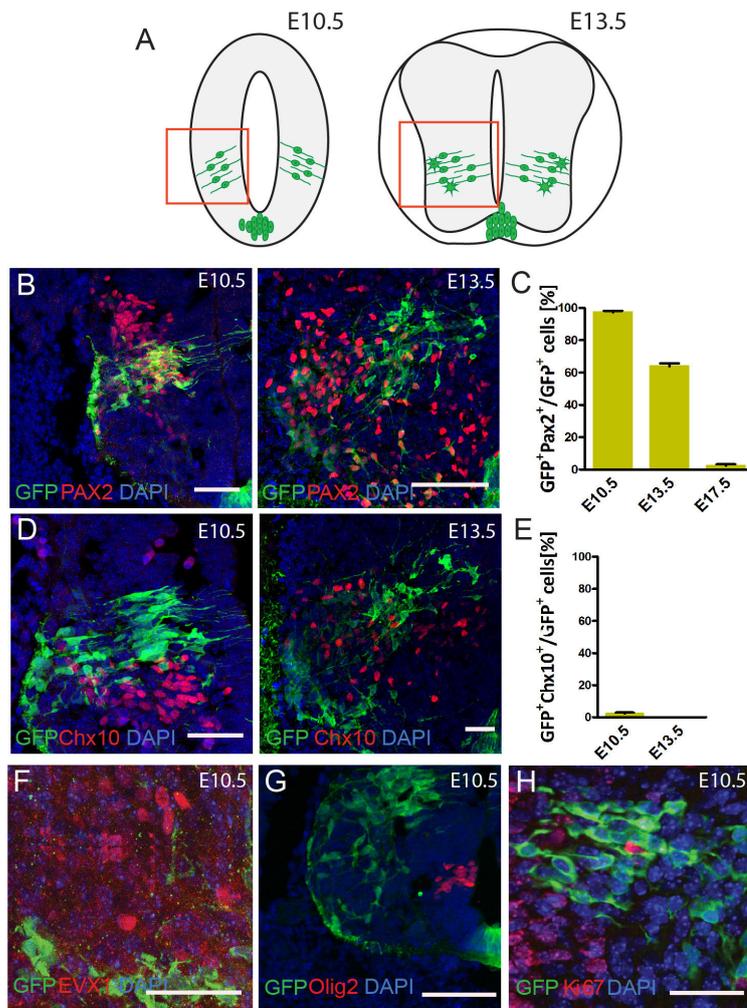
**Figure 2. Schematic summary of transgenic lines used in this study.** Schematic genetic illustration of the three different transgenic mouse models used, including A) non-inducible FoxJ1::EGFP (Ostrowski et al., 2003), B) tamoxifen-inducible FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP (Meletis et al., 2008) and C) FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mice. In the latter model, the CreER sequence is knocked in the FoxJ1 locus and inhibits *FoxJ1* gene expression (knock in –KI) (Muthusamy et al., 2014).

Figure 3. Li & Floriddia et al., 2017



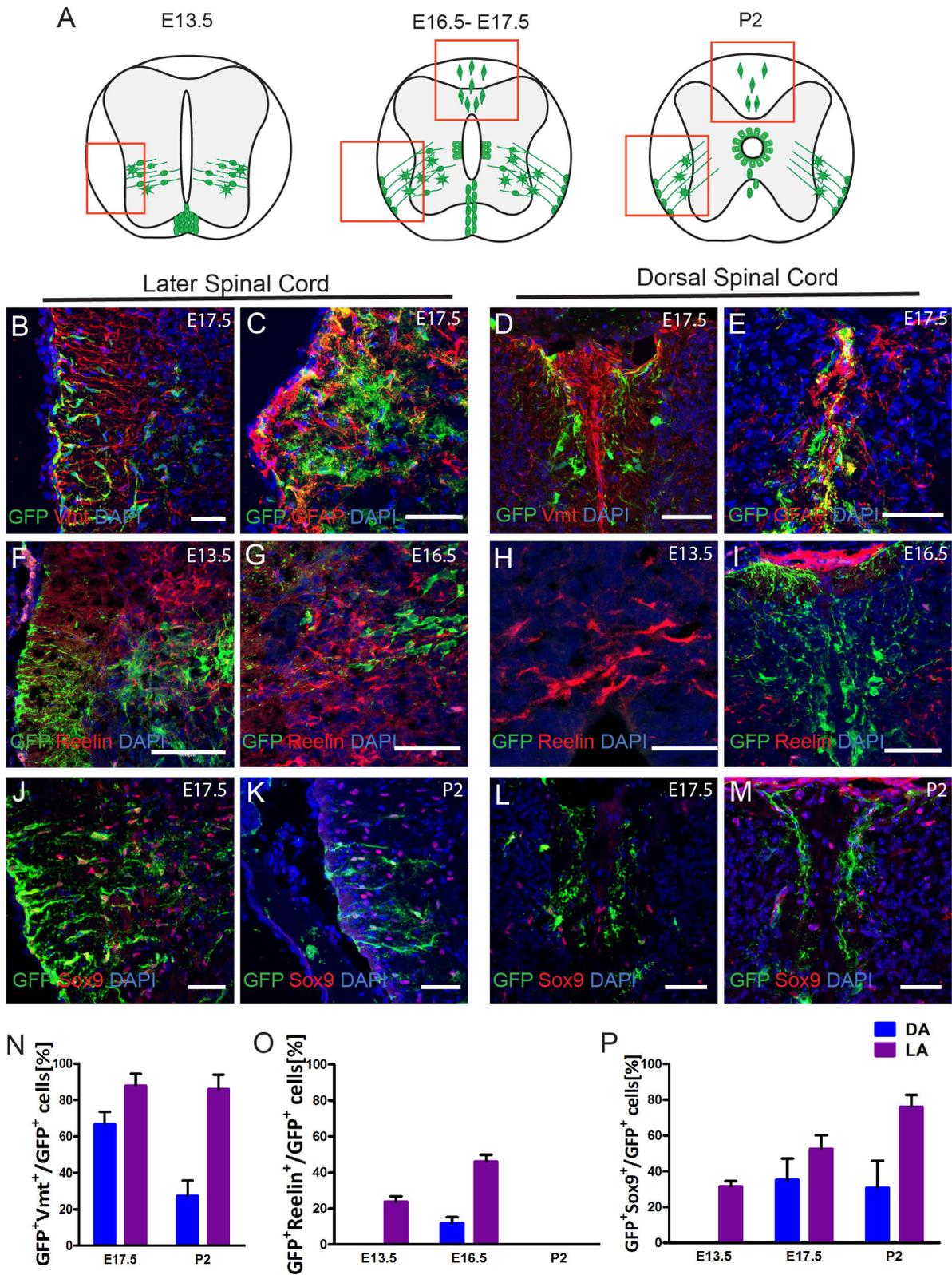
**Figure 3. Spatiotemporal expression of FoxJ1 in the developing spinal cord.** A) Representative confocal images of coronal sections of the developing spinal cord from the FoxJ1::EGFP mice at the indicated embryonic and postnatal developmental stages. B-E) Quantification of FoxJ1::EGFP<sup>+</sup> cells at E10.5 (B), E13.5 (C), E17.5 (D), and P2 (E) by region of interest. F) Summary schematic of the spatio-temporal distribution of FoxJ1::EGFP<sup>+</sup> cells in the embryonic and postnatal developing spinal cord. Dashed lines indicate the outline of the spinal cords. Scale bars: 50  $\mu$ m. Quantification are reported as percentage and ratio between the analyzed regions. Quantification are reported as average  $\pm$  SEM. N=3-4 animals per developmental stage. E= Embryonic day after coitum; P= Postnatal day after birth; FP= Floor Plate; GM= Grey Matter; V= Ventricle; DWM= Dorsal White Matter; LWM= Lateral White Matter; CC= Central Canal; C= Cervical spinal cord; T= Thoracic spinal cord; L= Lumbar spinal cord.

Figure 4. Li & Floriddia et al., 2017



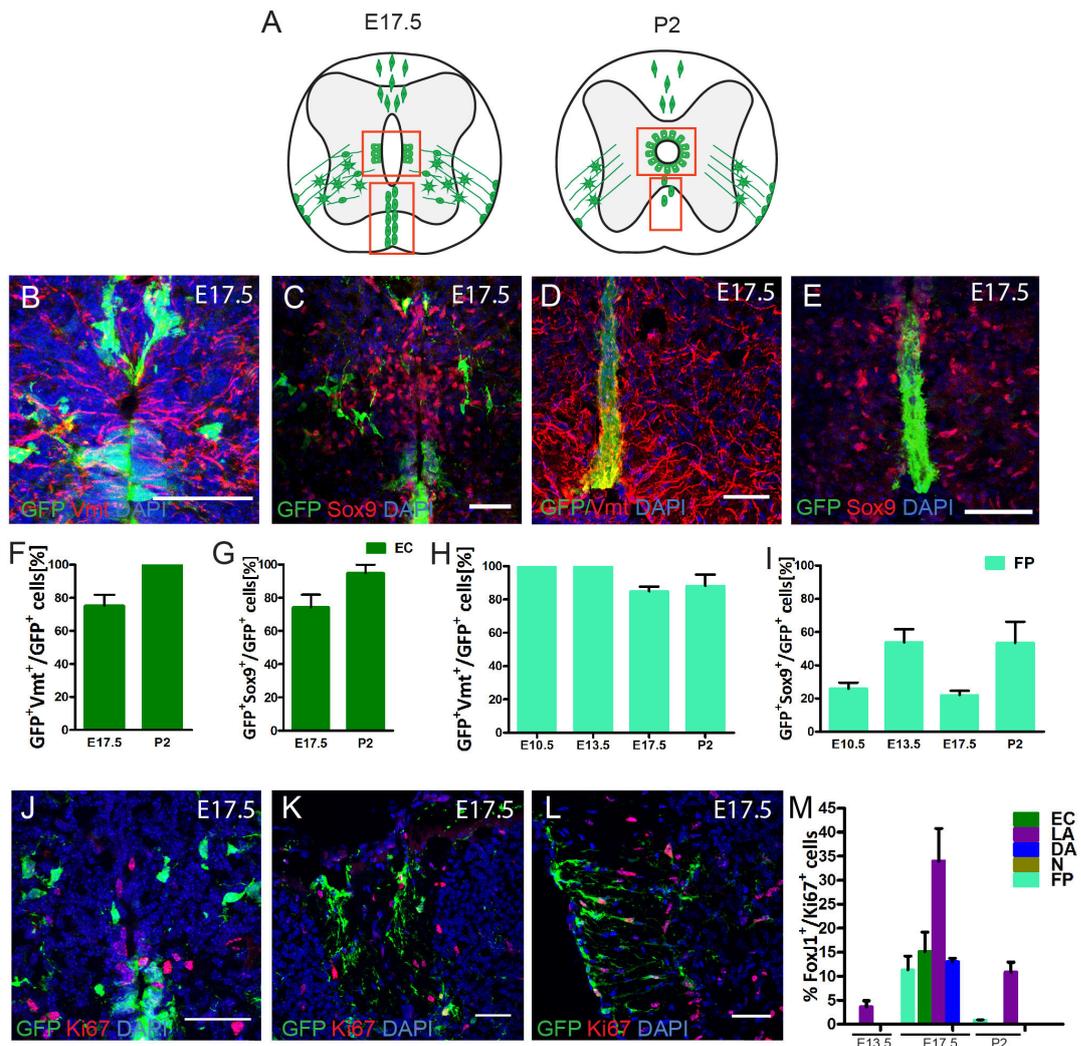
**Figure 4. FoxJ1<sup>+</sup> cells are interneurons in the developing spinal cord during the neurogenesis period.** A) Schematics of the embryonic developing spinal cord at the indicated stages. Red squares highlight the analyzed regions of interest. B, D, F-H) Representative confocal images of coronal sections of the developing spinal cord from the FoxJ1::EGFP mice immunostained for PAX2 (B), Chx10 (D), EVX1 (F), Olig2 (G) or Ki67 (H) at the indicated embryonic developmental stages. Scale bars: 25  $\mu$ m. C, E) Quantification of double positive FoxJ1::EGFP<sup>+</sup> cells in the analyzed regions of the spinal cord at the developmental stages indicated in the graphs. Quantifications are expressed as average  $\pm$  SEM. N=3 animals per analyzed time point and per marker staining.

Figure 5. Li & Floriddia et al., 2017



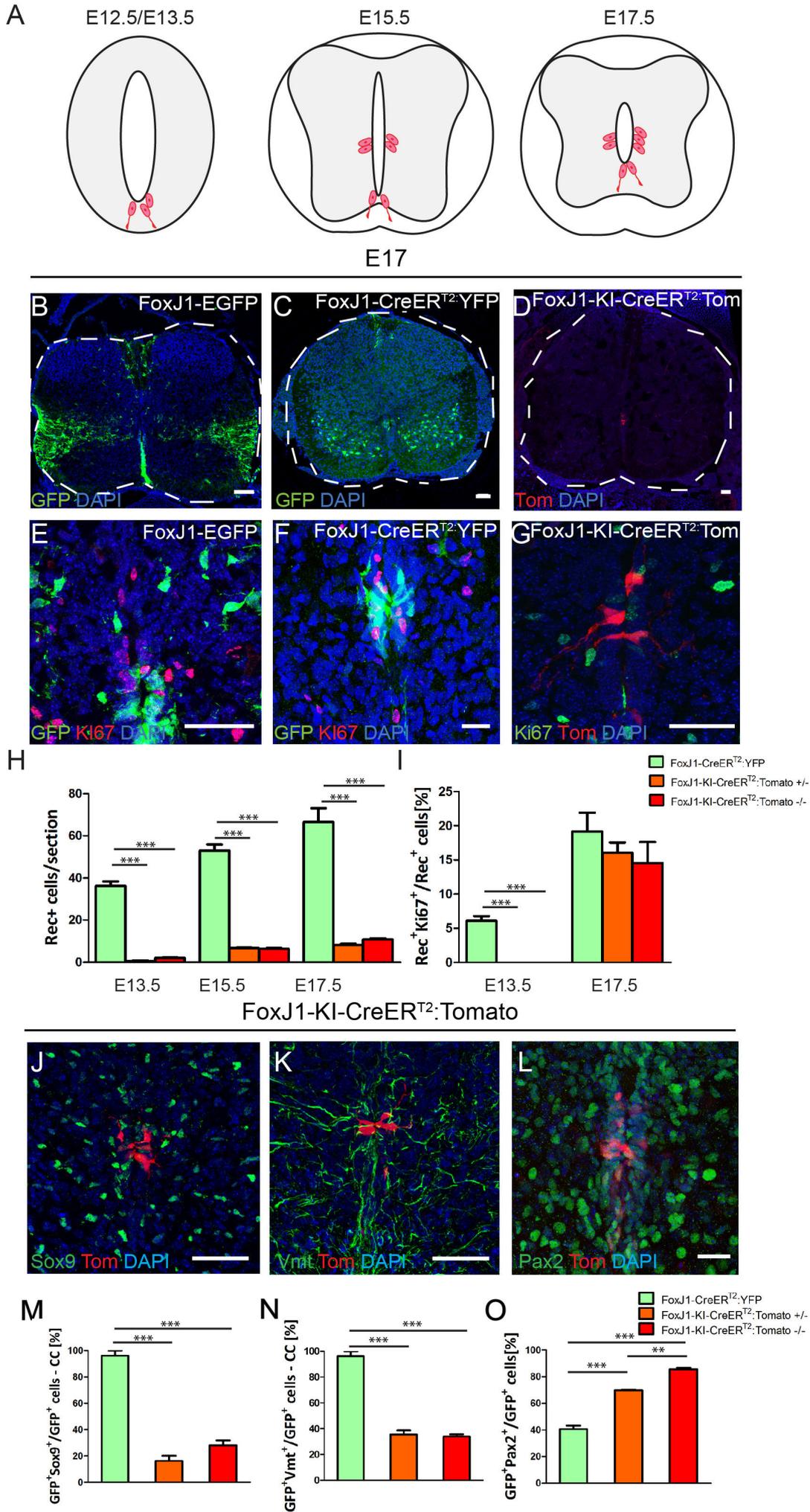
**Figure 5. FoxJ1 is expressed in heterogeneous populations of astrocytes during gliogenesis in the developing spinal cord.** A) Schematics of the embryonic and postnatal developing spinal cord at the indicated stages. Red squares highlight the analyzed regions of interest. B-M) Representative confocal images of coronal sections of the developing spinal cord from the FoxJ1::EGFP mice immunostained for Vimentin (B, D), GFAP (C, E), reelin (F-I), or Sox9 (J-M) at the indicated embryonic and postnatal developmental stages. Scale bar: 25  $\mu$ m. N-P) Quantification of double positive FoxJ1::EGFP<sup>+</sup> cells in the regions of interested of the spinal cord at the developmental stages indicated in the graphs, including Vimentin, reelin, or Sox9. Quantifications are expressed as average  $\pm$  SEM. N=3 animals per analyzed time point and marker staining. DA= Dorsal Astrocytes; LA= Lateral Astrocytes; Vmt= Vimentin.

Figure 6. Li & Floriddia et al., 2017



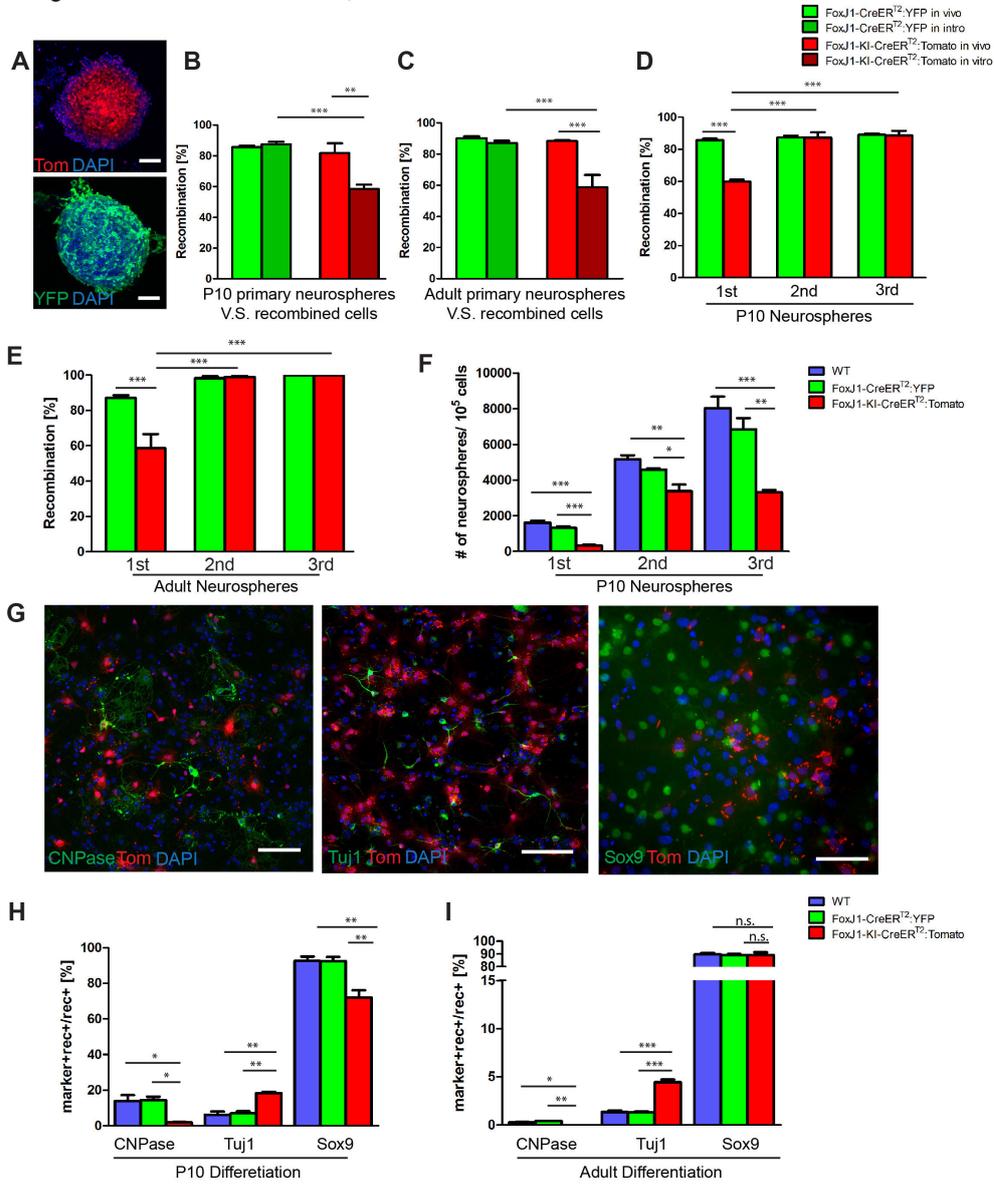
**Figure 6. FoxJ1 is expressed in ependymal and floor plate cells and display various proliferation levels in the developing spinal cord.** A) Schematics of the embryonic developing spinal cord at the indicated stages. Red squares highlight the analyzed regions of interest. B-E) Representative confocal images of coronal sections of the developing spinal cord from the FoxJ1::EGFP mice immunostained for Vimentin (B, D), or Sox9 (C, E) at the indicated embryonic stages. Scale bars: 25  $\mu$ m. F-I) Quantification of double positive FoxJ1::EGFP<sup>+</sup> cells in the regions of interest at the developmental stages indicated in the graphs. J-L) Representative confocal images of coronal sections of the developing spinal cord from the FoxJ1::EGFP mice immunostained for Ki67 in central canal, dorsal funiculus white matter and lateral white matter respectively. Scale bars: 25  $\mu$ m. M) Quantification of proliferating FoxJ1<sup>+</sup> cells in different regions the spinal cord at the developmental stages indicated in the graphs. Quantifications are expressed as average  $\pm$  SEM. N=3-4 animals per analyzed time point and immunostaining. E= Embryonic day; P= Postnatal day after birth; EC= Ependymal cells; LA= Lateral Astrocytes; DA= Dorsal Astrocytes; N= Neurons; FP= Floor Plate.

Figure 7. Li & Floriddia et al., 2017



**Figure 7. FoxJ1 is required for normal proliferation and differentiation of FoxJ1-expressing cells in the developing spinal cord.** A) Schematics of the FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato embryos during spinal cord development at the indicated stages. B-D) Representative confocal images of coronal sections of the developing spinal cord from indicated mouse lines at E17.5. E-G) Representative confocal images of coronal sections of embryonic spinal cord stained for Ki67. H-I) Quantification of the ratio of the total number of reporter<sup>+</sup> cells (H) or reporter<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup> cells (I) in FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP compared to FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mice. J-L) Representative confocal images of FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato ventricular zone of E17.5 spinal cord immunostained for Sox9 (J), Vimentin (K), or Pax2 (L). M-O) Quantification of marker and reporter double positive progenitor cells around the central canal or the spinal cord in FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP and FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mice at the developmental stages indicated in the graphs, for the markers Sox9 (M), Vimentin (N), or Pax2 (O). Dash lines indicate the coronal sectioned spinal cord. Scale bars: 25  $\mu$ m. CC= central canal. TdTom= TdTomato. Vmt= Vimentin. Quantifications are expressed as average  $\pm$  SEM. N=3-4 animals per analyzed time point and marker staining.

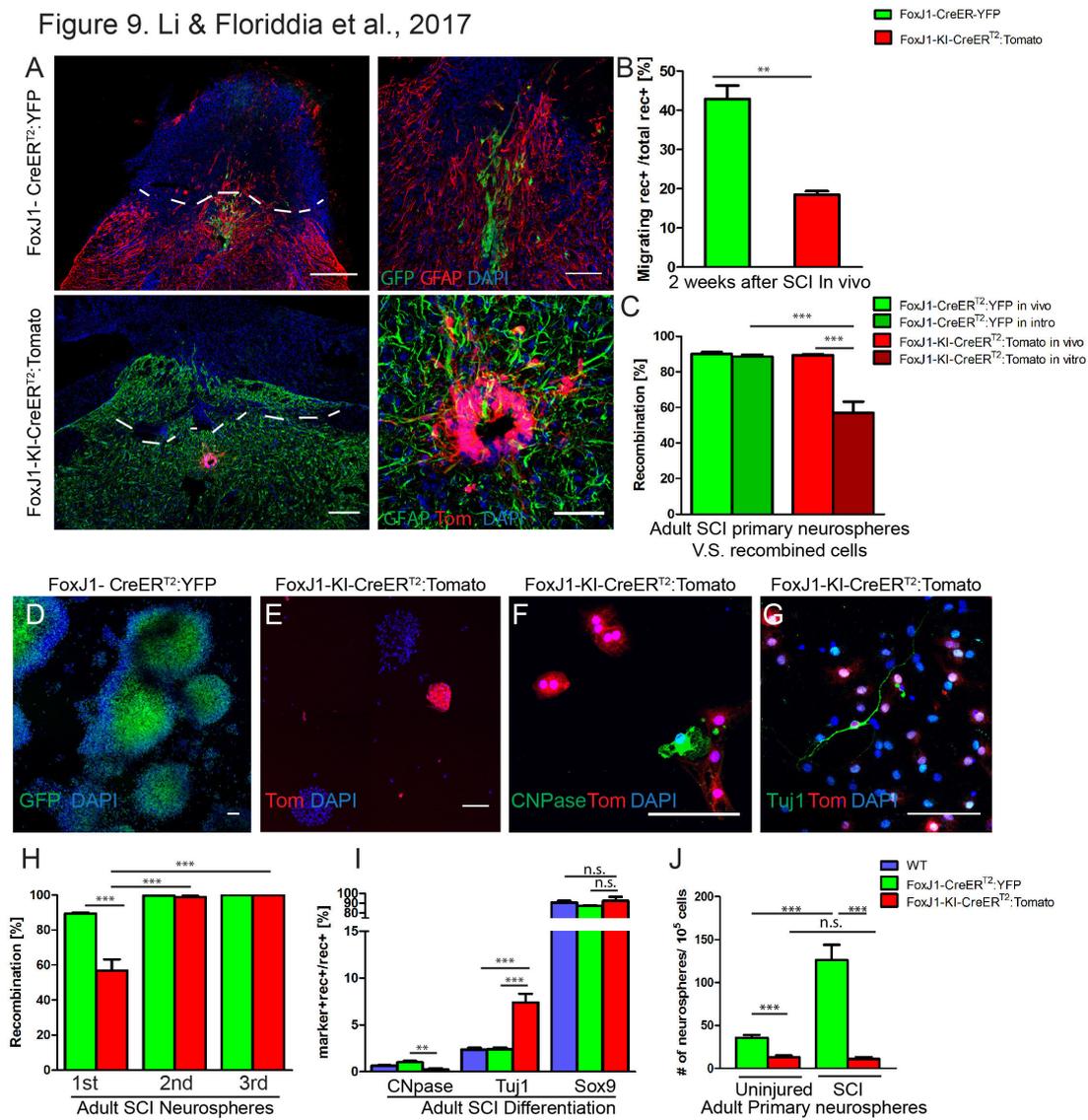
Figure 8. Li & Floriddia et al., 2017



**Figure 8. FoxJ1 is required for maintaining stem cell potential of the spinal cord.**

A) Representative confocal images of neurospheres derived from FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato (FoxJ1<sup>+/-</sup>, upper panel) and FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP P10 spinal cords (lower panel). B-C) Quantification of *in vivo* recombined FoxJ1<sup>+</sup> cells and *in vitro* recombined neurospheres from FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP and FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mice generated from P10 (B) and adult mice (C). D-E) Quantification of the percentage of recombined neurospheres over passages from FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP and FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato from P10 (D) and adult mice (E). F) Quantification of the total number of neurospheres derived from 100,000 cells over passages from WT mice and the number of recombined neurospheres per 100,000 cells from FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP and FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mice at P10. G) Representative confocal images of differentiated cells derived from neurospheres from FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato P10 mice. H-I) Quantification of differentiated cells generated from primary neurospheres of P10 (H) and adult (I) FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP and FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mice. Scale bars: 100 um. CC= central canal. Vmt= Vimentin. TdTom= TdTomato. CNPase= 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase. Quantifications are expressed as average  $\pm$  SEM. N=3-4 animals per analyzed time point and marker staining, where at least two batches of independent culture experiments were performed.

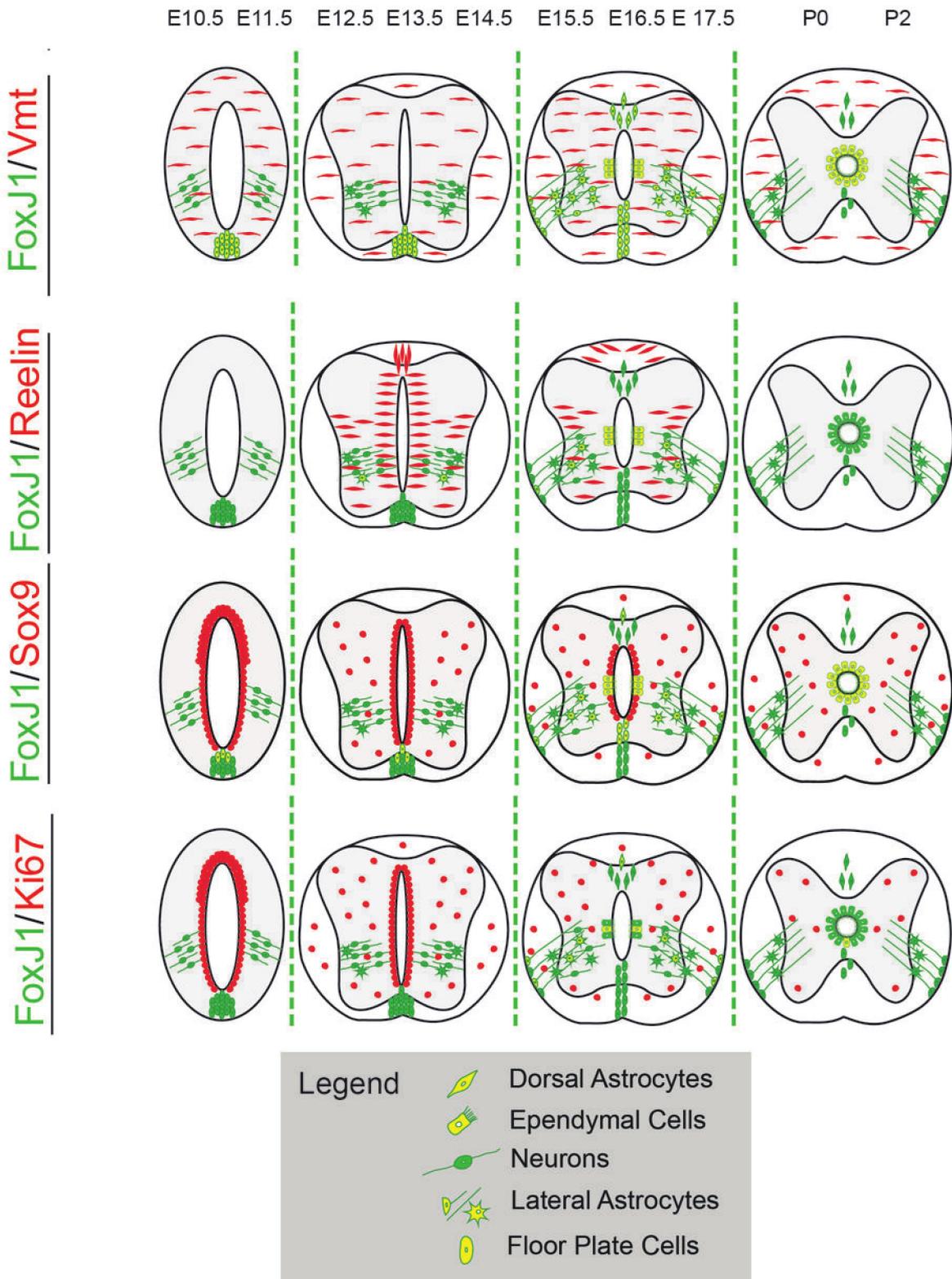
Figure 9. Li & Floriddia et al., 2017



**Figure 9. FoxJ1 is involved in the regulation of ependymal stem cell potential.**

A) Representative confocal images of adult spinal cord 2 weeks after SCI from FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP and FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mice. B) Quantification of migrating recombined cells *in vivo* 2 weeks after SCI. C) Quantification of *in vivo* recombined reporter<sup>+</sup> cells and *in vitro* recombined neurospheres from FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP and FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato adult injured mice. D-E) Representative confocal images of primary cultured recombined neurospheres from FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP and FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato adult injured mice. F-G) Representative confocal images of differentiated cells derived from recombined neurospheres from FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato adult injured mice. H) Quantification of the percentage of recombined neurospheres over passages from FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP and FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato adult mice after SCI. I) Quantification of differentiated cells generated from primary neurospheres of adult WT mice, recombined FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice and recombined FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mice after SCI. J) Quantification of the number of primary neurospheres derived from 100,000 cells over passages from WT mice and recombined neurospheres derived from 100,000 cells from either FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP and FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato adult mice after SCI. Scale bars: 200 um (A) and 100 um (D-G). Dashed lines indicate the lesion area. n.s.= no significance. TdTom= TdTomato. CNPase= 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase. Quantifications are expressed as average  $\pm$  SEM. N=3-4 animals per analysis including at least two independent culture experiments were performed.

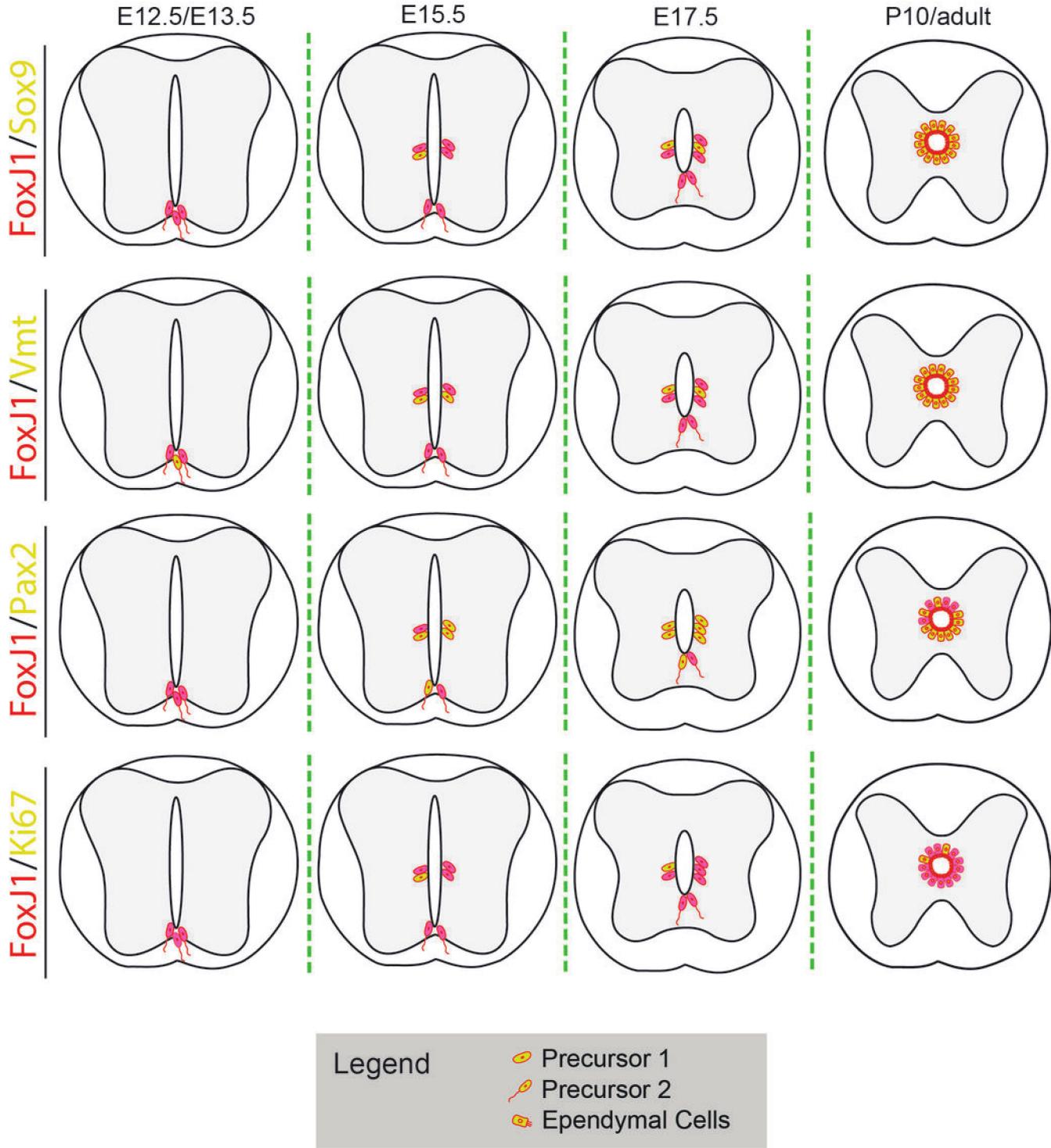
Figure 10. Li & Floriddia et al., 2017



---

**Figure 10. Summary of FoxJ1 expression during spinal cord development.** Schematics of FoxJ1 expression in specific cell types during development, indicating the expression of FoxJ1 in neural cells from E10.5 to P2. Markers are used to label FoxJ1 expression in progenitors (Vimentin and Sox9), a subset of astrocytes (Reelin) and proliferating cells (Ki67). Green cells = FoxJ1<sup>+</sup> cells; red cells = marker<sup>+</sup> cells; yellow cells = co-labeled cells.

Figure 11. Li & Floriddia et al., 2017



---

**Figure 11. Summary of FoxJ1 expression with the deletion effects of FoxJ1 during spinal cord development.** Schematics of FoxJ1 expression in FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato mice during development and the FoxJ1 knockout effects in this mouse line that leads to a dramatic reduction of FoxJ1<sup>+</sup> cells and different cell fate of progenitors. Markers are used to label FoxJ1 expression in progenitors (Vimentin and Sox9), interneurons (Pax2), and proliferating cells (Ki67). Red cells = Tomato<sup>+</sup> cells; yellow cells = co-labeled cells.

**Table 1****Antibody table**

<b>Antibody</b>	<b>Species</b>	<b>Dilution</b>	<b>Company (Catalog number)</b>
GFP	Chicken	1:500	Aves (GFP-1020)
EVX1	Guinea pig	1:200	Gift from Dr.Alessandra Pierani
Pax2	Rabbit	1:300	Life technologies (71-6000)
Chx10	Sheep	1:300	Millipore (AB9016)
Vimentin	Chicken	1:1000	Millipore (AB5733)
Reelin	Mouse	1:200	Millipore (MAB5364)
Sox9	Goat	1:500	R&D Systems (AF3075)
Ki-67	Rabbit	1:500	ThermoScientific (RM-9106)
GFAP	Rabbit	1:500	Millipore (AB5804)
Sox10	Goat	1:500	R&D Systems (AF2864)
NG2	Rabbit	1:500	Millipore (AB5320)
CNPase	Mouse	1:200	Millipore (MAB326R)
Tuj1	Mouse	1:500	Covance (MMS435P)
DAPI		1:10000	Sigma (D9542)
Anti-rabbit cy3 secondary antibody	donkey	1:500	Jackson Immuno Research (711-166-152)
Anti-mouse cy3 secondary antibody	donkey	1:500	Jackson Immuno Research (715-165-140)
Anti-chicken Alexa 488 secondary antibody	donkey	1:500	Jackson Immuno Research (703-545-155)

**Table 1.** Antibody table. Details of sources and dilutions of antibodies used for histo/immunocytochemistry in this study.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. Jonas Friséen for sharing the FoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP transgenic mice line, Dr. H. Troy Ghashghaei for sharing the FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>-TdTomato knock-in mouse line, Dr. Julien Bouvier for intellectual discussion and technical support, Dr. Alessandra Pierani for EVX1 antibody, Ms. Celia Duclos for technical support, and Dr. David Vaudry and Ms. Magali Basille for microdissection and qPCR trials and discussion.

## FUNDING SOURCES

This research was supported by Swedish Foundation for Strategic Research (Stiftelsen för Strategisk Forskning), DBRM (Developmental Biology and Regenerative Medicine) Linnaeus Center, Åke Wibergs stiftelse, Jeansson's Foundation, Christopher and Dana Reeve Foundation, Swedish Childhood Cancer Foundation (Barncancer Fonden), Tore Nilsons Foundation and Swedish Research Council (Vetenskapsrådet) to FBH. KF holds a Canada Research Chair, and KF and SL were financed by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). XL was supported by a Ph.D. studentship from KID funding (Karolinska Institutet). CC and NG are supported by European Union and Normandie Regional Council. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Funds (ERDF).

## CONFLICTS OF INTEREST

We declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Alaynick WA, Jessell TM, Pfaff SL (2011) SnapShot: Spinal Cord Development. *Cell* 146:178–178.e1.
- Anderson MA, Ao Y, Sofroniew MV (2014) Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett* 565:23–29.
- Barnabé-Heider F, Göritz C, Sabelström H, Takebayashi H, Pfrieger FW, Meletis K, Frisén J (2010) Origin of New Glial Cells in Intact and Injured Adult Spinal Cord. *Cell Stem Cell* 7:470–482.
- Bayraktar OA, Fuentealba LC, Alvarez-Buylla A, Rowitch DH (2014) Astrocyte development and heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a020362.
- Charron F, Tessier-Lavigne M (2005) Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance. *Dev Camb Engl* 132:2251–2262.
- Choksi SP, Babu D, Lau D, Yu X, Roy S (2014) Systematic discovery of novel ciliary genes through functional genomics in the zebrafish. *Dev Camb Engl* 141:3410–3419.
- Clevidence DE, Overdier DG, Peterson RS, Porcella A, Ye H, Paulson KE, Costa RH (1994) Members of the HNF-3/forkhead family of transcription factors exhibit distinct cellular expression patterns in lung and regulate the surfactant protein B promoter. *Dev Biol* 166:195–209.
- Deneen B, Ho R, Lukaszewicz A, Hochstim CJ, Gronostajski RM, Anderson DJ (2006) The transcription factor NFIA controls the onset of gliogenesis in the developing spinal cord. *Neuron* 52:953–968.
- Dessaud E, McMahon AP, Briscoe J (2008) Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Dev Camb Engl* 135:2489–2503.
- Diez del Corral R, Storey KG (2001) Markers in vertebrate neurogenesis. *Nat Rev Neurosci* 2:835–839.
- Goulding M (2009) Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction. *Nat Rev Neurosci* 10:507–518.
- Guemez-Gamboa A, Coufal NG, Gleeson JG (2014) Primary cilia in the developing and mature brain. *Neuron* 82:511–521.
- Guérout N, Li X, Barnabé-Heider F (2014) Cell fate control in the developing central nervous system. *Exp Cell Res* 321:77–83.
- Hackett CA, Weller JI (1995) Genetic mapping of quantitative trait loci for traits with ordinal distributions. *Biometrics* 51:1252–1263.
- Helms AW, Johnson JE (2003) Specification of dorsal spinal cord interneurons. *Curr Opin Neurobiol* 13:42–49.
- Hochstim C, Deneen B, Lukaszewicz A, Zhou Q, Anderson DJ (2008) Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain code. *Cell* 133:510–522.
- Jacquet BV, Muthusamy N, Sommerville LJ, Xiao G, Liang H, Zhang Y, Holtzman MJ, Ghashghaei HT (2011) Specification of a Foxj1-dependent lineage in the forebrain is required for embryonic-to-postnatal transition of neurogenesis in the olfactory bulb. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 31:9368–9382.
- Jacquet BV, Salinas-Mondragon R, Liang H, Therit B, Buie JD, Dykstra M, Campbell K, Ostrowski LE, Brody SL, Ghashghaei HT (2009) FoxJ1-dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain. *Dev Camb Engl* 136:4021–4031.
- La Manno G, Gyllborg D, Codeluppi S, Nishimura K, Salto C, Zeisel A, Borm LE, Stott SRW, Toledo EM, Villaescusa JC, Lönnerberg P, Ryge J, Barker RA, Arenas E, Linnarsson S (2016) Molecular Diversity of Midbrain Development in Mouse, Human, and Stem Cells. *Cell* 167:566–580.e19.
- Lake BB et al. (2016) Neuronal subtypes and diversity revealed by single-nucleus RNA sequencing of the human brain. *Science* 352:1586–1590.
- Li X, Floriddia EM, Toskas K, Fernandes KJL, Guérout N, Barnabé-Heider F (2016) Regenerative Potential of Ependymal Cells for Spinal Cord Injuries Over Time. *EBioMedicine* 13:55–65.
- Meletis K, Barnabé-Heider F, Carlén M, Evergren E, Tomilin N, Shupliakov O, Frisén J (2008) Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol* 6:e182.

- Murphy RW, Darevsky IS, MacCulloch RD, Fu J, Kupriyanova LA, Upton DE, Danielyan F (1997) Old age, multiple formations or genetic plasticity? Clonal diversity in the uniparental Caucasian rock lizard, *Lacerta dahli*. *Genetica* 101:125–130.
- Muthusamy N, Vijayakumar A, Cheng G, Ghashghaei HT (2014) A Knock-in Foxj1CreERT2::GFP mouse for recombination in epithelial cells with motile cilia. *genesis* 52:350–358.
- Ostrowski LE, Hutchins JR, Zakel K, O’Neal WK (2003) Targeting expression of a transgene to the airway surface epithelium using a ciliated cell-specific promoter. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 8:637–645.
- Panayiotou E, Malas S (2013) Adult spinal cord ependymal layer: a promising pool of quiescent stem cells to treat spinal cord injury. *Front Physiol* 4:340.
- Panchision DM, Pickel JM, Studer L, Lee SH, Turner PA, Hazel TG, McKay RD (2001) Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. *Genes Dev* 15:2094–2110.
- Pineau I, Lacroix S (2007) Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *J Comp Neurol* 500:267–285.
- Ren Y, Ao Y, O’Shea TM, Burda JE, Bernstein AM, Brumm AJ, Muthusamy N, Ghashghaei HT, Carmichael ST, Cheng L, Sofroniew MV (2017) Ependymal cell contribution to scar formation after spinal cord injury is minimal, local and dependent on direct ependymal injury. *Sci Rep* 7:41122.
- Rowitch DH, Kriegstein AR (2010) Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468:214–222.
- Sabelström H, Stenudd M, Réu P, Dias DO, Elfineh M, Zdunek S, Damberg P, Göritz C, Frisé J (2013) Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science* 342:637–640.
- Shimada IS, Acar M, Burgess RJ, Zhao Z, Morrison SJ (2017) Prdm16 is required for the maintenance of neural stem cells in the postnatal forebrain and their differentiation into ependymal cells. *Genes Dev* 31:1134–1146.
- Stubbs JL, Oishi I, Izpisua Belmonte JC, Kintner C (2008) The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nat Genet* 40:1454–1460.
- Tsai H-H, Li H, Fuentealba LC, Molofsky AV, Taveira-Marques R, Zhuang H, Tenney A, Murnen AT, Fancy SPJ, Merkle F, Kessaris N, Alvarez-Buylla A, Richardson WD, Rowitch DH (2012) Regional astrocyte allocation regulates CNS synaptogenesis and repair. *Science* 337:358–362.
- Yu K, McGlynn S, Matisse MP (2013) Floor plate-derived sonic hedgehog regulates glial and ependymal cell fates in the developing spinal cord. *Dev Camb Engl* 140:1594–1604.
- Yu X, Ng CP, Habacher H, Roy S (2008) Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. *Nat Genet* 40:1445–1453.
- Zeisel A, Muñoz-Manchado AB, Codeluppi S, Lönnerberg P, La Manno G, Juréus A, Marques S, Munguba H, He L, Betsholtz C, Rolny C, Castelo-Branco G, Hjerling-Leffler J, Linnarsson S (2015) Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science* 347:1138–1142.
- Zheng K, Li H, Zhu Y, Zhu Q, Qiu M (2010) MicroRNAs are essential for the developmental switch from neurogenesis to gliogenesis in the developing spinal cord. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30:8245–8250.

## Seconde partie

---



## II. Introduction article II

La mise en évidence d'une population cellulaire présentant des capacités souches dans la moelle spinale après une lésion, attira notre attention. En effet, la technique de *fate-mapping*, très populaire dans le domaine de l'embryogénèse, démontra que les cellules épendymaires bordant le canal central chez la souris hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP, étaient douées *in vitro* des propriétés des NSC. *In vivo*, ces cellules sont capables de proliférer extensivement et de participer activement aux processus de cicatrisation après une LMT en se différenciant en astrocytes et en oligodendrocytes (Barnabe-Heider et al., 2010; Meletis et al., 2008).

La lignée transgénique hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP permet de suivre la prolifération et la progénie des cellules épendymaires. La lignée hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-Rasless permet, après croisement, l'inhibition spécifique du cycle cellulaire sous la dépendance de la recombinaise Cre activée par le Tamoxifène. Disposant de ces deux lignées au sein de notre laboratoire, nous avons décidé de recentrer notre axe de recherche sur l'étude de cette population cellulaire, aux capacités souches, dans le cadre des thérapies cellulaires après lésions médullaires. En effet, notre hypothèse était que les effets bénéfiques observés par les différentes transplantations cellulaires, telles que les CGOs après une LMT, étaient peut-être engendrés par une interaction directe ou indirecte du greffon cellulaire avec les cellules souches endogènes de la moelle spinale. Ce projet, qui me fut confié durant ma thèse, avait pour but de comprendre l'effet d'une transplantation de bCGOs sur les cellules épendymaires et leur progénie après lésion médullaire.

Pour ce faire, j'ai réalisé des cultures primaires de bCGOs issues de bulbes olfactifs de souris C57BL/6, basées sur nos précédentes publications, afin de les préparer en vue d'une transplantation dans la moelle spinale des souris hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP et hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-Rasless durant un protocole de chirurgie standardisé. En parallèle, chaque lignée transgénique utilisée, fut divisée en deux groupes, un groupe « contrôle » recevant uniquement du milieu de culture après une hémisection thoracique en Th4 de la moelle spinale, groupe baptisé DF10S et un groupe traité ayant subi la même intervention chirurgicale mais recevant deux greffes rostro-caudales de bCGOs (50 000 cellules par injection) de part et d'autre du site de lésion, groupe baptisé bOEC. L'activation du système Cre-LoxP et donc la recombinaison des cellules FoxJ1 positives fut réalisée par l'administration, au préalable, de Tamoxifène durant cinq jours, suivie d'une semaine de *clearance* avant de réaliser la chirurgie. Différents temps expérimentaux après la lésion furent préalablement établis (2 semaines, 7

semaines et 14 semaines) afin d'évaluer au cours du temps, l'effet du traitement sur les cellules épendymaires. J'ai par la suite évalué l'effet des CGOs sur le potentiel souche des cellules épendymaires *in vitro* comme décrit dans l'article précédent, par la réalisation de cultures de neurosphères et de tests de différenciation de ces neurosphères à partir des mêmes groupes de souris. Conjointement avec la plateforme Primacen de l'Université de Rouen, nous avons réalisé une étude du profil d'expression des facteurs promoteurs et inhibiteurs de la repousse axonale par PCR quantitative. Le choix de ces facteurs s'appuie sur des travaux publiés en 2016 dans la revue *Nature*. Cet article démontre que les astrocytes, après une lésion médullaire sécrètent différents facteurs inhibiteurs de la repousse axonale, mais, contrairement à ce que l'on pensait, ils pouvaient également sécréter des facteurs promoteurs de la repousse axonale (Anderson et al., 2016).

Les différents résultats obtenus à l'issue de ce projet furent très intéressants et innovants dans le domaine des lésions médullaires. Nous avons constaté que globalement, la transplantation de bCGOs agit sur les cellules épendymaires recombinaisonnées en augmentant leur taux de prolifération *in vivo* chez les souris hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP et également que les transplantations augmentent le potentiel souche endogène médullaire *in vitro*. Le profil de différenciation se trouve également modifié par la transplantation de bCGOs. En culture, les premières neurosphères génèrent des quantités plus importantes de neurones Tuj1 positifs après transplantation de bCGOs dans les moelles lésées. *In vivo*, les analyses histologiques nous révèlent qu'à l'issue du traitement, les cellules épendymaires génèrent plus d'astrocytes et que ces nouveaux astrocytes permettent la création d'un environnement lésionnel favorable à la survie neuronale au cours du temps. En effet, les facteurs inhibiteurs de la repousse axonale chez des souris WT sont diminués significativement lorsque la moelle spinale a reçu une transplantation de bCGOs. Le taux de survie des neurones résidents est également augmenté. Parallèlement, l'apparition de nouveaux neurones non issus des cellules épendymaires après la lésion à deux et quatorze semaines suivant la lésion a été constatée. Tirant profit de la lignée Rasless (inhibition du cycle cellulaire), nous avons montré que le fait de bloquer la prolifération cellulaire dans les cellules épendymaires, ne permettait plus la création d'un environnement favorable à la repousse axonale au sein des souris hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-Rasless. Ceci se traduisait également par une absence de diminution de l'expression des facteurs inhibiteurs de la repousse axonale au niveau de la zone lésionnelle qui conduisait à une diminution du taux de survie des neurones et ce, malgré la transplantation de bCGOs dans ces animaux. La transplantation de bCGOs permettait « uniquement » dans ce modèle, d'un point de vue

histologique, la diminution de la surface lésionnelle envahie par les péricytes et les fibroblastes périphériques au profit d'une augmentation des astrocytes résidents.

En conclusion, les effets bénéfiques de la transplantation de bCGOs issues des bulbes olfactifs peuvent s'expliquer par leur action sur les cellules épendymaires et sur leur progénie. Les CGOs conduisent à une augmentation de la prolifération de ces cellules épendymaires permettant la formation d'un environnement propice à l'établissement d'une neurogenèse chez la souris adulte par la diminution des facteurs inhibiteurs de la repousse axonale.

Ces travaux sont actuellement en cours de finalisation pour une future soumission dont je serais co-premier auteur.



## Article II

## Olfactory ensheathing cells transplantations enhance endogenous stem cells reactivity and induce neurogenesis after spinal cord injury

### Authors:

Axel Honore<sup>1\*</sup>, Xiaofei Li<sup>2\*</sup>, Chaima Chalfouh<sup>1</sup>, Quentin Delarue<sup>1</sup>, Marine Di Giovanni<sup>3</sup>, David Vaudry<sup>3</sup>, Jean-Paul Marie<sup>1</sup>, Fanie Barnabé-Heider<sup>2</sup>, Nicolas Guérout<sup>1, 2</sup>

### Affiliations:

<sup>1</sup>Normandie Univ, UNIROUEN, EA3830-GRHV, 76000 Rouen, France; Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000 Rouen, France.

<sup>2</sup> Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, 17177 Stockholm, Sweden.

<sup>3</sup>Normandie Univ, UNIROUEN, PRIMACEN, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Mont-Saint-Aignan, France.

\*Equal contribution

### Address correspondence to:

[nicolas.guerout@univ-rouen.fr](mailto:nicolas.guerout@univ-rouen.fr)

#Dr. Nicolas Guérout, Normandie Univ, UNIROUEN, EA3830, GRHV, 76000 Rouen, France; Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000 Rouen, France.

Phone number: + 33 6 22 71 72 17.

**ABSTRACT**

Cell therapies have raised great hope for regenerative medicine. It has been shown that endogenous spinal cord stem cells, together with astrocytes and pericytes significantly contribute to the recovery of spinal cord injury (SCI). More recently, clinical data showed olfactory ensheathing cells (OECs) obtained from a patient's olfactory bulb enhanced functional recovery and could be a very attractive therapeutic approach. However, the cellular mechanisms behind the effect of transplanted OECs on spinal cord stem/progenitor cells after SCI is still poorly understood, which leads to the failure of repetition of the clinical treatments. Thus, we further study the effects of transplanted OECs on spinal cord stem/progenitor cells after SCI. Using hFoxJ1-CreERT2::YFP transgenic mice, our primary neurosphere assay showed that upon SCI, ependymal cells have higher self-renewal potential after OECs transplantation, and their capability of differentiation to neurons is also highly up-regulated. Similarly, our in vivo fate-mapping data showed that upon SCI with OEC transplantation, there is higher proliferation and migration to the lesion site of ependymal cells. More interestingly, we unexpectedly discovered enhanced adult neurogenesis after OECs transplantation upon SCI. In addition, we used hFoxJ1-Rasless mice to specifically block the cell cycle of ependymal cells, we found that after transplantation, the spinal cord self-repair capacity by astrocytes is highly recruited compared to vehicle, and the lesion site after transplantation was significantly sealed. Altogether, we here describe the transplanted OECs can better activate endogenous stem cell potential after SCI and promote adult neurogenesis in the spinal cord. Moreover, OECs transplantation promotes the self-repair capacity of endogenous glial cells, which suggests transplantation of OECs to injured spinal cord would be a beneficial therapeutic possibility for the recovery after SCI.

**Key words:**

Ependymal cells, olfactory ensheathing cell, self-renewal, differentiation, neurogenesis, spinal cord injury, neural stem cell, astrocyte reactivity

## INTRODUCTION

Spinal cord injury (SCI) is currently a chronic incurable disease with reported incidences ranging from 9.2 to 246 cases per million of the population a year depending on the area surveyed (Ahuja et al., 2017; Siddiqui et al., 2015). SCI typically results in permanent functional impairment in locomotion and sensation below the injury level, and can also cause neuropathic pain, spasticity and incontinence (Westgren and Levi, 1998). There is currently no therapy to enhance recovery and the only available treatments include surgical intervention to prevent further damage and symptomatic relief of pain and infections in the acute and chronic phase, respectively (Ahuja et al., 2017).

The success of such novel therapies will most likely require a combinatorial approach because the mechanisms of cellular and functional loss upon injury are complex and evolve overtime. The key factors leading to the lack of complete regeneration and recovery of function are the formation of an inhibitory glial environment, neural cell death, demyelination, axonal degeneration and lack of regrowth and inflammatory response (Barnabe-Heider et al., 2008; Gregoire et al., 2015). Therefore, cell transplantation has been proposed as a source to alleviate this cellular loss (Barnabe-Heider et al., 2008). To date, a wide variety of cells has been used as biotherapies to cure SCI in different animal paradigms (Assinck et al., 2017; Barnabe-Heider et al., 2008; Tetzlaff et al., 2011). Specifically, olfactory ensheathing cells (OEC) have been shown to enhance recovery and could be a very attractive therapeutic approach (Mayeur et al., 2013). Indeed, OEC transplantations have been applied to a paraplegic patient in a clinical trial study and have shown beneficial effects (Tabakow et al., 2013). However, in this study no investigation about the contribution of endogenous spinal cord cells in response to the therapy could have been conducted. While, it can be of primary importance to understand the cellular and molecular mechanisms behind this therapy to reproduce and apply it successfully to a larger cohort of patients.

An alternative way will be to recruit and activate endogenous stem cells after SCI (Qin et al., 2015). Recent fate-mapping studies using novel CreER transgenic mouse models, based on *FoxJ1* expression, where transgene expression is restricted to cells with motile cilia and thereby specifically targets ependymal cells in the spinal cord, have shown the presence and confirm the identity of stem cells in adult spinal cord (Barnabe-Heider et al., 2010; Meletis et al., 2008). Around the central canal, ependymal cells, which are in physiological conditions quiescent, express a stem cell potential (Barnabe-Heider et al., 2010; Meletis et al., 2008). These cells can be reactivated *in vivo* after SCI and give rise to neurospheres *in vitro*. Specifically, *in vivo* ependymal cells migrate to the lesion core and can give rise to astrocyte and oligodendrocyte progenies (Barnabe-Heider et al., 2010; Meletis et al., 2008). Moreover, it has been shown recently, using a specific mouse model in which ependymal cells proliferation is blocked upon SCI (hFoxJ1-rasless) that these cells played a major role in the formation of glial scar and exert a neurotrophic effect required for survival of neurons adjacent to the lesion (Sabelstrom et al., 2013). These new studies confirm the fact that ependymal cells are required to maintain the integrity of the injured spinal cord.

Altogether, these reports showed that ependymal cells are the endogenous stem cells in the adult spinal cord and therefore constitute an attractive cell population to further investigate and target in order to treat SCI. However, ependymal cells are an understudied cell population and how ependymal cells, other endogenous cell populations and transplanted OEC used as biotherapy influence each other within SCI is unknown (Park et al., 2012; Xu et al., 2012). Specifically, as ependymal cells significantly contribute to the scar formation, it is of high therapeutic interest to investigate the effect of transplanted cells on their behavior, for example factors secreted by OEC used for biotherapy could modulate the response of the spinal cord stem cells. Thus, functional and histological outcomes observed could be the results of a

differential response of the endogenous spinal cord stem cells related to transplanted cells upon injury.

That is why, taking advantage of inducible *FoxJ1* transgenic mouse lines, we have investigated the response of ependymal cells after SCI and OEC transplantation.

Our experiments demonstrate that OEC can better activate and recruit endogenous ependymal stem cells after SCI. For the first time, we show that neurogenesis can occur in the injured spinal cord due to the complementary contribution of both transplanted OECs and ependymal cells which created a permissive microenvironment by modulating axon-growth-supporting molecules.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

All experiments were conducted in accordance with the guidelines of the French Board of Agriculture. We used two mice lines in this study, including randomized grouped male and female (Suppl Fig 1). Adult mice tamoxifen-inducible hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup> (Jacquet et al., 2009, 2011; Ostrowski et al., 2003), with a C57BL/6 genetic background were crossed with *Rosa26-YFP reporter mice*. hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-Rasless mice were used to specifically delete the N-, K-, H-ras genes to block the proliferation of ependymal cells (Sabelstrom et al., 2013). To induce recombination, we injected 60 mg/kg of body weight once daily for 5 days. Clearance of tamoxifen was allowed for one week before the start of the spinal cord injury experiments.

### Primary olfactory bulbs culture and cell transplant preparation

Olfactory bulb (OB) primary cultures were prepared as described previously by our team with slight modifications (Guerout et al., 2010; Honore et al., 2012). Mice were killed by lethal dose of sodium pentobarbital (150 mg/kg body weight) and decapitated. OB were immediately dissected and placed into Hank's buffered salt solution (HBSS, Invitrogen) after removing meninges. HBSS containing 0.1% of trypsin (Invitrogen) and OB were incubated for 20 min at 37°C. Trypsinization was stopped by adding Dulbecco's Modified Eagle's/Ham's F12 medium (D.M.E.M/F12, Invitrogen), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (F.B.S, Invitrogen) and 0.5% penicillin/streptomycin (Invitrogen) (DF-10S). The tissue was centrifuged at 1,500 RPM for 5 min, resuspended in DF-10S and centrifuged again. Tissue was then triturated using a micropipette, until a homogenous cell suspension was obtained. Cells were plated in DF-10S in 75 cm<sup>2</sup> flasks (SARSTED). The flasks were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. The medium was changed every two days. Ten days after plating, OB primary cultures (bOEC) were confluent. Before surgery, cultures were trypsinized to remove them from the dishes, and the cells were

counted using a hemocytometer. bOEC cultures cells were resuspended in DF-10S at concentration of 25,000 cells/ $\mu$ L. DF-10S was used as control group.

### **Surgical procedure and cell transplantation**

Stereotaxic frame with his micromanipulator arm (World Precision Instrument) was used for surgery to facilitate cells transplantation procedure. Before and after surgery, mice received an intramuscular injection of nabalphine hydrochloride (10 mg/mL, Mylan). Animals were kept under anesthesia with 2% of isofluorane (1000mg/g, Piramal Healthcare UK Limited) and body temperature was maintained during entire surgical intervention. After being shaved and disinfected with betadine, mouse dorsal skin was incised and muscles were dissected to expose laminae T9-T11. Posterior part of vertebrae were countersank in order to create an ample space for lesion and injections. After laminectomy, the dura mater was removed and bOEC transplantations were performed. Cells or medium were injected using 2.5  $\mu$ L Hamilton glass syringe, connected to a 1 mm sterile glass capillary needle and attached to micromanipulator. Injections were delivered on left spinal side at 1 mm depth, 1.5 mm from the midline, 5 mm rostrally and caudally from the lesion site. Each animal received a total of 2 injections ( $2 \times 2$   $\mu$ L), which contained cellular suspension (25 000 cells/  $\mu$ L) or DF-10S. Injectate was slowly delivered within 1 min, followed by holding the needle at the injection site during 2 min and another minute to carefully withdraw the injection needle. Immediately after injections, a dorsal hemisection was performed with 25 Gauges needle.

After surgery, mice were placed back in their home cages. Mice underwent daily checks for general health, mobility within the cage, wounds, swelling or infections. The animals showed neither skin lesions, infection nor autophagy throughout the study. Bladders were manually expressed after operation until needed.

EdU, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (0.075 mg/mL and 1 % of sucrose, life) was administered with drinking water, exchanged every third day and kept in the dark. Following spinal cord injury, EdU was given twice by intraperitoneal injections (1.5 mg/mL in PBS, 100  $\mu$ L per injection) at 6 hours interval, followed by administration in the drinking water for up to 7 days.

### **Neural Stem Cells Cultures**

Animals were sacrificed one week after SCI. Spinal cord cells were dissociated and neurosphere cultures were established as described (Li et al., 2016; Meletis et al., 2008). All cells isolated from one spinal cord were plated in 75 cm<sup>2</sup> culture dishes. First, neurospheres were harvested after 2 weeks in culture and then were dissociated into single cells for passage or differentiation. Approximately 100,000 cells per animal were plated in a 75 cm<sup>2</sup> culture dish for the next generation of neurospheres, and all the new neurospheres (second, third and fourth generations) were harvested after one week in culture. Dissociated primary neurospheres, approximately 70,000 cells/well, were plated in poly-L-lysine-coated chamber slides (Sigma) for differentiation with growth factors-free medium supplemented with 1% fetal bovine serum. Two to four independent experiments per group were performed. After 2 weeks in differentiation condition, immunocytochemistry was performed as described (Suppl Fig 2).

### **Immunohistochemistry**

Animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (150 mg/kg body weight) and perfused transcardially with PBS followed by ice-cold 4% formaldehyde in PBS. Dissected spinal cords were post-fixed overnight at 4°C and cryoprotected in 30% sucrose solution in PBS. The tissues were embedded into OCT (Tissue-Tek<sup>®</sup>, Sakura). Coronal and sagittal 20  $\mu$ m sections were collected alternating on ten (8-10 sections per slide). Sections were incubated with blocking solution (10% Normal Donkey serum, 0.3% Triton-X100), then incubated

overnight at room temperature in a humidified chamber with primary antibodies diluted in blocking solution. The following antibodies were used (Suppl Fig 2). EdU was detected with the Click-iT® EdU Alexa Fluor® 594 imaging kit (Invitrogen) using the Manufacturer's instructions. After washing, antibody staining was revealed using species-specific fluorophore-conjugated (Cy3, Cy5 or Alexa 488 from Jackson Immuno Research) secondary antibodies. Sections were counterstained with DAPI (1µg/mL) and sections were coverslipped with Vectashield mounting media (Vector Labs). Pictures were taken using a Zeiss LMS700 microscope. Image processing and assembly was performed in ImageJ or Photoshop.

### **Image acquisition analysis**

Confocal representative images of the spinal cord were acquired using the Zeiss LMS700 microscope set up. Quantification of the number of cells were performed using the Zeiss Apotome2 microscope set up.

### **Real time PCR:**

Real time PCR (qPCR) experiments were performed to evaluate the level of mRNA expression of the axon growth inhibitory and axon growth permissive molecules and also neurotrophic factors (Anderson et al., 2016; Sabelstrom et al., 2013). Mice were killed 2 weeks after SCI and spinal cord were immediately dissected on dry ice. Total RNAs from these tissues samples were extracted using Tri-reagent (Sigma) and Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. From each sample, 1.5µg of total RNA was converted into single stranded cDNA using the ImPromII reverse transcriptase kit (Promega) with random primers (0.5µg/ml). Real time PCR experiments were performed and monitored by ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Life Technologies). The primer pairs used for

the different genes analyses have been previously described (Anderson et al., 2016; Sabelstrom et al., 2013).

Mouse glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA was used as control. Relative expression between a given sample and a reference sample was calculated using the  $2^{-\Delta Ct}$  method, where  $\Delta Ct$  is the difference in the Ct values for the target gene and the reference gene.

### **Statistical analysis**

Statistic were run with Student's T-test for comparing two groups and Student's T-test with Bonferroni's correction for more than two groups' comparisons. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ . For each experimental group and staining, 3-9 animals minimum were analyzed.

## RESULTS

### **boEC transplantation increases ependymal cells proliferation.**

Before studying the effect of OEC transplantations on ependymal cells, we wanted to check their survival over time in the injured spinal cord. To do so, we transplanted GFP positive cells obtained from GFP mice into wild type (WT) animals. As previously described by other groups, transplanted cells did not survive after 2 weeks post injury (Data not shown) (Khankan et al., 2016).

We wanted to make sure about the innocuity of the injection procedure, for that we performed DF-10S injections into uninjured hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice. We observed that the DF-10S injections per se did not induce any cellular response into the uninjured spinal cord. Indeed, DF-10S injections do not result in ependymal cell proliferation or astrocyte reactivity (Data not shown).

It has been shown that in intact spinal cord ependymal cells around central canal are rarely dividing but after SCI they start dividing vigorously (Barnabe-Heider et al., 2010; Meletis et al., 2008). We decided to demonstrate if boEC transplantations after SCI affect ependymal cell proliferation both *in vivo* and *in vitro*. To do this, we transplanted boEC from WT mice into hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice after tamoxifen injection and proliferative cell marker EdU administration via drinking water during 1 week. Two weeks, after transplantation, SCI lead to a strong incorporation of EdU into recombined ependymal cells around the central canal for both groups (Fig 1A). We compared the percentage of recombined YFP cells expressing EdU between controls and transplanted animals (Fig 1B). Transection analysis of the spinal cord revealed that about 83.07 % ( $\pm 0.913$ ) of YFP positive cells for the transplanted groups are labelled by EdU compare to 72.5 % ( $\pm 1.745$ ) in the control group (Fig 1B) (\*\* $P < 0.01$ ).

boEC transplantations after SCI enhance the proliferative potential of ependymal cells *in vivo*.

The same experiments were performed without injury, with and without bOEC transplantations, in these specific conditions bOEC transplantations do not induce ependymal cells proliferation (Data not shown).

We next assessed the spinal cord self-renewing potential after OEC transplantation *in vitro*. We used the same surgical protocol as described before. Neurosphere assay was performed in WT animals. We quantified and compared the total number of generated neurospheres for each passage with or without SCI and with or without bOEC transplantations (Fig 1D1-D4). The neurosphere assay shows that, in both conditions with and without injury bOEC transplantations increase the number of first ( $***P<0.001$  and  $**P<0.01$ , respectively) and second neurospheres ( $***P<0.001$  and  $**P<0.01$ , respectively) (Fig 1D1 and D2). More interestingly, the number of generated first neurospheres without injury with bOEC transplantation is comparable to the one in SCI condition (Fig 1D1), and even higher for second neurospheres (Fig 1D2) ( $**P<0.01$ ). As previously described, self-renewing potential becomes constant over passages regardless of the paradigm tested (Fig 1D3 and D4) (Barnabe-Heider et al., 2010; Li et al., 2016).

It has been proved that the stem cells potential is confined to ependymal cells *in vitro* (Barnabe-Heider et al., 2010). To confirm that bOEC transplantations do not change this potential, we performed neurosphere assay in hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP. After tamoxifen injection and surgical procedure, dissociated spinal cord were cultured to produce neurospheres (Fig 1C). For all the groups, the recombination pattern was the same for first, second and third neurospheres (Fig 1E and F). Moreover, 100% of the second and third neurospheres were YFP positive meaning that the stem cell potential is confined to ependymal cells in all groups and conditions tested (Fig 1E and F). These recombination patterns are similar to the ones previously described in uninjured and injured animals without bOEC transplantation (Barnabe-Heider et al., 2010; Li et al., 2016).

Altogether, these *in vivo* and *in vitro* data indicate that bOEC transplantations in spinal cord can highly enhance the self-renewal potential of ependymal cells.

### **bOEC transplantation changes ependymal cell progeny**

It has been described that after SCI, proliferative ependymal cells leave the central canal and migrate to the lesion site. During their migration, ependymal cells differentiate into glial cell lineage (Barnabe-Heider et al., 2010; Meletis et al., 2008; Sabelstrom et al., 2013). We investigated the effects of bOEC transplantations on the fate of ependymal progeny after spinal cord dorsal thoracic hemisection spared central canal. hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mouse were used to fate map the ependymal cells and follow the activation, migration and differentiation of their progeny after SCI *in vivo*. Two weeks and fourteen weeks after surgery, animal were sacrificed to perform immunohistochemistry analyses. At 2 weeks, the central canal is fully recombined and proliferative as described before (Fig 2A and B), ependymal cells start to leave the dorsal part of the canal and migrate to the lesion site (Fig 2A1 and A2). The increasing proportion of recombined ependymal cells after SCI was confirmed by the expression of specific marker Sox9 but no difference between the transplanted group and control group was observed at 2 weeks post-injury (Fig 2E). At 14 weeks, a higher proportion of YFP+Sox9+ cells was observed in transplanted group in comparison to control group (Fig 2F) (\* $P < 0.05$ ). GFAP and Olig2 staining were performed in order to respectively measure the proportion of astrocytes and OPC generated by ependymal cells after SCI (Fig 2C and D). For OPC staining, at 2 and 14 weeks no difference could be observed between groups, the proportion of newly formed OPC stays under 3% of total recombined cells (Fig 2C, E and F). These results are similar with what was observed by other groups upon SCI (Barnabe-Heider et al., 2010; Meletis et al., 2008). In contrast, we observed, 2 weeks after SCI that bOEC transplantation strongly induces an astrocytic differentiation (Fig 2D and E). Indeed, after bOEC transplantation upon SCI, 45%

( $\pm 4.534$ ) of the YFP+ cells were GFAP+ (Fig 2E). At the same time, as previously described, the percentage of GFAP+/YFP+ cells was around 15.46% ( $\pm 1.916$ ) (Fig 2E) (\*\* $P < 0.01$ ) (Barnabe-Heider et al., 2010). 14 weeks after SCI, no difference was observed between groups (Fig 2F).

Then, we measured if bOEC transplantation can affect stem cell differentiation *in vitro*. In order to answer this question, we performed neurosphere differentiation assay as described before from primary neurospheres (Meletis et al., 2008). Neurospheres from spinal cord have been described to be multipotent which mean that they can give rise to astrocyte, oligodendrocyte and neuron lineages *in vitro*. After differentiation of the primary neurospheres, we used the specific antibody CNPase to identify oligodendrocyte lineage and the Tuj-1 antibody for neuronal lineage. As previously described, adult spinal cord neurospheres generate a low proportion of CNPase+ cells (Fig 2G1 and H) (Li et al., 2016), which is increased by SCI (Fig 2H) (\* $P < 0.05$ ) (Li et al., 2016), regardless of bOEC transplantations. Conversely, neurosphere differentiation assay showed that bOEC transplantations increase the proportion of Tuj1+ cells compare to the control groups in both injured and uninjured conditions (Fig 2G3 and I) (\*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  respectively).

We demonstrate here that OEC transplantation changes the ependymal cell differentiation fate.

### **OEC transplantation modifies ependymal cells derived astrocytes and the scar environment**

Following SCI, it has been thought that astrocytes become reactive and contribute to the inhibitory glia scar by assembling and secreting a large amount of chondroitin sulfate proteoglycans (CSPG) that act as the major barrier for regenerating axons (Cregg et al., 2014; O'Shea et al., 2017). It has been also described that ependymal cells derived astrocytes do not

contribute to the production of axonal growth-inhibiting CSPG (Meletis et al., 2008). According to our results, bOEC transplantation increases the differentiation of ependymal cells progeny to astrocytes (Fig 2D and E). Thus, we assessed if these ependymal cells derived astrocytes after bOEC transplantations are CSPG producing astrocytes. For that, we analyzed the expression of one major inhibitory produced CSPG upon SCI; neurocan. At 2 weeks post-SCI, labelling of YFP+GFAP+ cells with neurocan antibody in the lesion core revealed that in bOEC transplanted animals, ependymal cells derived astrocytes are mainly neurocan negative in comparison to the control animals (Fig 3A-D). To confirm that bOEC transplantation puts in place a more permissive micro-environment by modulating scar formation we performed real-time PCR (qPCR) experiments. Indeed, recently, it was revealed by RNA sequencing that scar-forming astrocytes and non-astrocytes cells upon SCI secrete axon growth inhibitory and also axon growth permissive molecules (Anderson et al., 2016) (Suppl Fig 3). Taking advantage of this axon growth permissive and axon growth inhibitory genes list we performed qPCR experiments on lesioned WT animals 2 weeks after SCI with and without bOEC transplantations and we compared to uninjured WT animals used as control (dashed lines) (Suppl Fig 3) (Anderson et al., 2016). It appears as previously described that SCI induces an increase of both axon growth permissive and axon growth inhibitory genes (Anderson et al., 2016) (Fig 3E and F, Suppl Fig 4A-B). These experiments show also, that upon SCI, bOEC transplantations do not obviously change the expression of the axon growth permissive genes (Fig 3E and Suppl Fig 4A), but at the same time decrease the expression of the axon growth inhibitory genes (Fig 3F and Suppl Fig 4B). Indeed, nine out of 10 genes from the top 10 axon growth inhibitory genes list are significantly down regulated in bOEC group (Fig 3F), moreover 8 of these genes have an expression level comparable to uninjured animals (Fig 3F).

Finally, to demonstrate if this modified micro-environment enhances neuronal survival, we counted surviving neurons based on NeuN staining, 2 and 14 weeks after SCI. These

experiments demonstrate that bOEC transplantations increase neuronal survival at 14 weeks after injury (Fig 3G) (\* $P < 0.05$ ).

Taking together, these results demonstrate that bOEC transplantation induces a permissive environment by modulating scar formation.

### **bOEC transplantation upon SCI induces neurogenesis**

Basically spinal cord is classically viewed as non-neurogenic tissue. However, recently, it has been demonstrated that uninjured adult spinal cord generates newborn neurons (Habib et al., 2016). In this study researchers have developed Div-Seq, which combines scalable single-nucleus RNA-Seq with pulse labeling of proliferating cells by EdU to profile individual dividing cells. Moreover, we have shown in Figure 2 that bOEC can enhance neuronal differentiation *in vitro*. Based on these results we have conducted experiments in order to demonstrate if bOEC treatment upon SCI can induce neurogenesis. For this, we combined EdU treatment and specific antibodies as Doublecortin (DCX) and NeuN, to stain immature and mature newborn neurons respectively. DF-10S and bOEC animals were sacrificed and fixed 2, 7 and 14 weeks after SCI. As previously reported by other labs, injured spinal cord are not a neurogenic tissue, indeed in DF-10S no EdU+/DCX+ or EdU+/NeuN+ cells could be found (Fig 4A1'-5', B1'-5' and C) (Su et al., 2014). Conversely, in bOEC group at 2 weeks after injury we found EdU+/DCX+ immature newborn neurons into the injured area (Fig 4A1-5 and C). The number of these DCX+/EdU+ cells decrease at 7 weeks after SCI (Fig 4C). However, more interestingly, at 7 weeks and 14 weeks after SCI, for the first time, we found mature NeuN+/EdU+ newborn neurons into the lesion core (Fig 4B1-5 and D).

All these experiments have been performed using hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice, however we did not find any YFP+/EdU+/DCX+ or YFP+/EdU+/NeuN+ (Fig 4A5 and B5) cells, indicating that ependymal cells are not giving rise to these newborn neurons in this paradigm.

Altogether, our results demonstrate for the time that injured spinal cord can generate newborn mature neurons after bOEC transplantation which are not ependymal cells derived.

### **bOEC transplantation per se fails to induce neurogenesis in hFoxJ1-rasless mouse model**

Previously, we have demonstrated that bOEC transplantation increases ependymal cell proliferation, changes ependymal cells differentiation profile, enhances neuronal survival and induces neurogenesis by modulating axon growth inhibitory microenvironment.

Then, we would to investigate the role played by bOEC transplantation per se in a model in which ependymal cells cannot proliferate in response to injury and/or transplantation. To do so, we have taken advantage of the transgenic mouse model hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-rasless to specifically ablate proliferation of ependymal cells and thereby block the generation of ependymal cell progeny upon injury (Sabelstrom et al., 2013).

In this model, bOEC fails to induce neurogenesis. Indeed, at 2 and 14 weeks after SCI we could not find any DCX+/EdU+ or NeuN+/EdU+ cells (Data not shown).

We, then, have investigated neuronal survival in hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP -rasless animals after bOEC transplantations at 2 and 14 weeks after SCI (Fig 5A) and we compared to neuronal survival in hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP animals after bOEC transplantations. It appears that the number of surviving neurons in hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-rasless animals (Fig 5B) is drastically decreased in comparison to hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP animals (Fig 5B) at 2 and 14 weeks after SCI (\*\* $P < 0.01$  and \* $P < 0.05$  respectively) (Fig 5B).

In order to demonstrate the role played by bOEC transplantation on spinal cord microenvironment, we took advantage of the axon growth permissive and axon growth inhibitory genes list previously described and we performed qPCR experiments on lesioned hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-rasless animals 2 weeks after SCI with and without bOEC transplantations and we compared to uninjured WT animals used as control (dashed lines) (Fig

5C and D). As described previously for hFoxj1-CreER<sup>T2</sup>::YFP animals (Fig 3E and F, Suppl Fig 4A and B), SCI induces an increase RNA of both axon growth permissive and axon growth inhibitory molecules in hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-rasless animals (Fig 5C and D, Suppl Fig 4C and D). Interestingly, in this mouse model, bOEC transplantation fails to modulate axon growth inhibitory genes (Fig 5D, Suppl Fig 4C).

Altogether, the results demonstrate that bOEC transplantation per se fails to induce neurogenesis, neuronal survival and modulation of axon growth inhibitory microenvironment. These results shed light the main role played by ependymal cells in all the processes previously described.

### **bOEC transplantation per se modulates scar formation upon SCI in hFoxJ1-rasless mouse model**

We would to assess if bOEC transplantations per se can modulate scar formation after SCI in hFoxJ1-rasless mice. For this purpose, we performed SCI in hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-rasless animals with and without bOEC transplantation. Then, 4 weeks after SCI, mice have been fixed and on longitudinal sections, astrocytic and fibrotic scar compartments were measured based on GFAP and PDGFRbeta staining respectively (Fig 6A and B). Our results indicate that in bOEC animals the astrocytic component of the scar is increased and the fibrotic component is decreased in comparison to DF-10S animals (\*\* $P < 0.01$ ) (Fig 6C and D).

These results demonstrate that bOEC transplantation per se modulates astrocytic and fibrotic scar recruitment regardless ependymal cells proliferation.

## DISCUSSION

Therapeutically, several regenerative approaches have been tested to cure SCI, in particular cell transplantation. Among those, OEC transplantation is a one of the most promising therapy. Indeed, OEC have been applied in different injury paradigms in rodents and countless studies have reported beneficial effects (Assinck et al., 2017; Watzlawick et al., 2016). Recently, OEC transplantation has been applied to a paraplegic patient in a clinical trial study and have shown functional recovery (Tabakow et al., 2013). Indeed, this patient is reported as the first person to verifiably recover sensory and motor functions after a complete SCI. However, in this study no investigation about the contribution of endogenous spinal cord stem cells/progenitors in response to the therapy could have been conducted while, recent discoveries have demonstrated that spinal cord possesses an endogenous plasticity confined to ependymal cells around the central canal. Nevertheless, it can be of primary importance to understand the cellular and molecular mechanisms behind this therapy to reproduce and apply it successfully to a larger cohort of patients.

That is why we have investigated the response of ependymal cells after SCI and OEC transplantation. Our results demonstrate for the first time that OEC can better activate and recruit endogenous ependymal stem cells after SCI and can promote neurogenesis in the injured spinal cord.

Several studies have underlined that ependymal layer reacts within SCI by proliferating, thereby it has been hypothesized that the central canal may be a stem cell niche (Hamilton et al., 2009). Recently, fate mapping experiments using novel transgenic mouse models have shown the presence and confirm the identity of stem cells in adult spinal cord. Around the central canal, ependymal cells, which are in physiological conditions quiescent, express a stem cell potential (Barnabe-Heider et al., 2010; Meletis et al., 2008). These cells which can be reactivated after SCI, participate to the formation of the glial scar and can give rise to astrocyte

and oligodendrocyte progenies (Barnabe-Heider et al., 2010; Li et al., 2016; Meletis et al., 2008; Sabelstrom et al., 2013). In our study, taking advantage of these mouse lines we have investigated the response of ependymal cells after SCI and OEC transplantation.

Some studies have previously worked on that direction and have highlighted indirectly that ependymal cells can be activated or stimulated by biotherapies (Park et al., 2012; Xu et al., 2012). However, no direct evidences have been shown due to the fact that these studies have been performed using WT animals. Nevertheless, immunohistochemistry stainings show a higher reactivity in ependymal cells after cellular transplantations using different lesion and transplant paradigms (Park et al., 2012; Xu et al., 2012). In our study, it appears that OEC transplantations increase ependymal cells proliferation *in vivo* based on EdU staining and increase the self-renewing stem cell potential *in vitro* (Fig 1). Moreover, our *in vitro* results demonstrate that bOEC transplantation can increase self-renewing stem cell potential even without injury. In fact, bOEC transplantation can enhance the number of first and second neurospheres without injury but fails to do so *in vivo*. It has been previously reported by several groups that ependymal cells proliferate *in vivo* only in response to traumatic injury but not in demyelinating diseases (Guo et al., 2011; Lacroix et al., 2014). It can be of primary importance to understand the mechanisms leading to ependymal cells recruitment *in vivo* after traumatic injuries, in order to use them as a non-invasive therapy in context of demyelinating diseases.

Most of the time, success of cellular transplantation within SCI is measured by GFAP staining, assuming that decreasing in the intensity of this staining reflects a decrease of astrocytic hyperactivity (Khankan et al., 2016; Mayeur et al., 2013). However, it has been reported that after SCI the glial scar component is constituted by astrocytes derived astrocytes and by ependymal cells derived astrocytes (Barnabe-Heider et al., 2010; Meletis et al., 2008; Sabelstrom et al., 2013). In particular, it has been shown that ependymal cells derived astrocytes express lower level of GFAP in comparison to astrocytes derived astrocytes (Barnabe-Heider

et al., 2010). Our results demonstrate here that OEC transplantations change the differentiation profile of ependymal cells into astrocytes, *in vivo*, 2 weeks after SCI (Fig 2). Moreover, these newly formed astrocytes are mainly neurocan negative astrocytes (Fig 3). Thereby, we have hypothesized that these specific ependymal cells differentiation profile after bOEC transplantation could put in place a less inhibitory glial scar. Recently, it has been shown that the glial scar, mainly composed of astrocytes, secretes both inhibitory and promoting axonal regrowth factors after SCI (Anderson et al., 2016). Based on this axonal regrowth modulating factors list, we have investigated the specific role played by OEC transplantation. Our results demonstrate that OEC transplantation modulates the axonal growth factors expression (Fig 3). In fact, bOEC transplantation decreases the expression of the axonal growth inhibitory molecules to an injured expression level (Fig 3). To correlate, this RNA expression to neuronal survival, we measured the number of NeuN+ positive surviving neurons at the lesion site after SCI. This analysis demonstrates that bOEC transplantation increases neuronal survival at the lesion site 14 weeks after SCI (Fig 3). To resume our results show here that bOEC transplantation increases ependymal cells differentiation into low CSPG secreting astrocytes *in vivo*, putting in place a less inhibitory glial scar microenvironment leading to neuronal survival.

Then, using neurosphere differentiation assays we would to assess the differentiation profile of first neurospheres *in vitro*. As previously described by our team, SCI induces an increase of oligodendrocytes differentiation regardless of bOEC transplantation (Li et al., 2016). More interestingly, differentiation assays demonstrate that bOEC transplantation induces neuronal differentiation regardless SCI (Fig 3).

Basically spinal cord is viewed as non-regenerative tissue with limited plasticity. Thereby the establishment of the glial scar which appears within SCI is mainly described as a hermetic barrier for axon regeneration. However, recent discoveries shed new lights on *intrinsic functional plasticity and endogenous recovery potential of the spinal cord*. Indeed, Zhang lab,

Broad Institute of MIT/Harvard, USA has demonstrated that uninjured adult spinal cord generates newborn neurons (Habib et al., 2016). They have developed Div-Seq, which combines scalable single-nucleus RNA-Seq with pulse labeling of proliferating cells by to profile individual dividing cells. However, the identity of the progenitor which gives rise to these newborn neurons is still unknown.

Based on this recent discovery and on our *in vitro* results, we assessed if neurogenesis can take place into lesioned spinal cord after bOEC transplantation. For the first time, we report that neurogenesis can occur into lesioned spinal cord (Fig 4). Our immunohistological results reveal that bOEC transplantation induces generation of EdU+ newborn neurons. Two weeks after SCI immature DCX+/EdU+ and more interestingly, 14 weeks after SCI mature NeuN+/EdU+ newborn neurons could be found into spinal cord parenchyma around the central canal after bOEC transplantation. Surprisingly, none of these neurons were YFP+ indicating that they were not ependymal cells derived, meaning that there is into the spinal cord an unknown progenitor which gives rise to newborn neurons after SCI and bOEC transplantation. It has been previously shown that the *in vitro* stem cell potential is confined to ependymal cells (Barnabe-Heider et al., 2010). However, one study has demonstrated, using hGFAP-CreER<sup>T2</sup> mouse line, that around the central canal it exists a multipotent progenitor showing limited self-renewal properties (Fiorelli et al., 2013). More interestingly, they have demonstrated that this progenitor showed limited self-renewal properties even after SCI but that the recombined first neurospheres obtained can give rise to a high amount of neurons after differentiation *in vitro* (Fiorelli et al., 2013). More investigations should be lead in order to determine the identity of the neurogenic progenitor giving rise to newborn neurons into the injured spinal cord. Such a discovery could open a new way of thinking for designing innovative therapy to cure SCI.

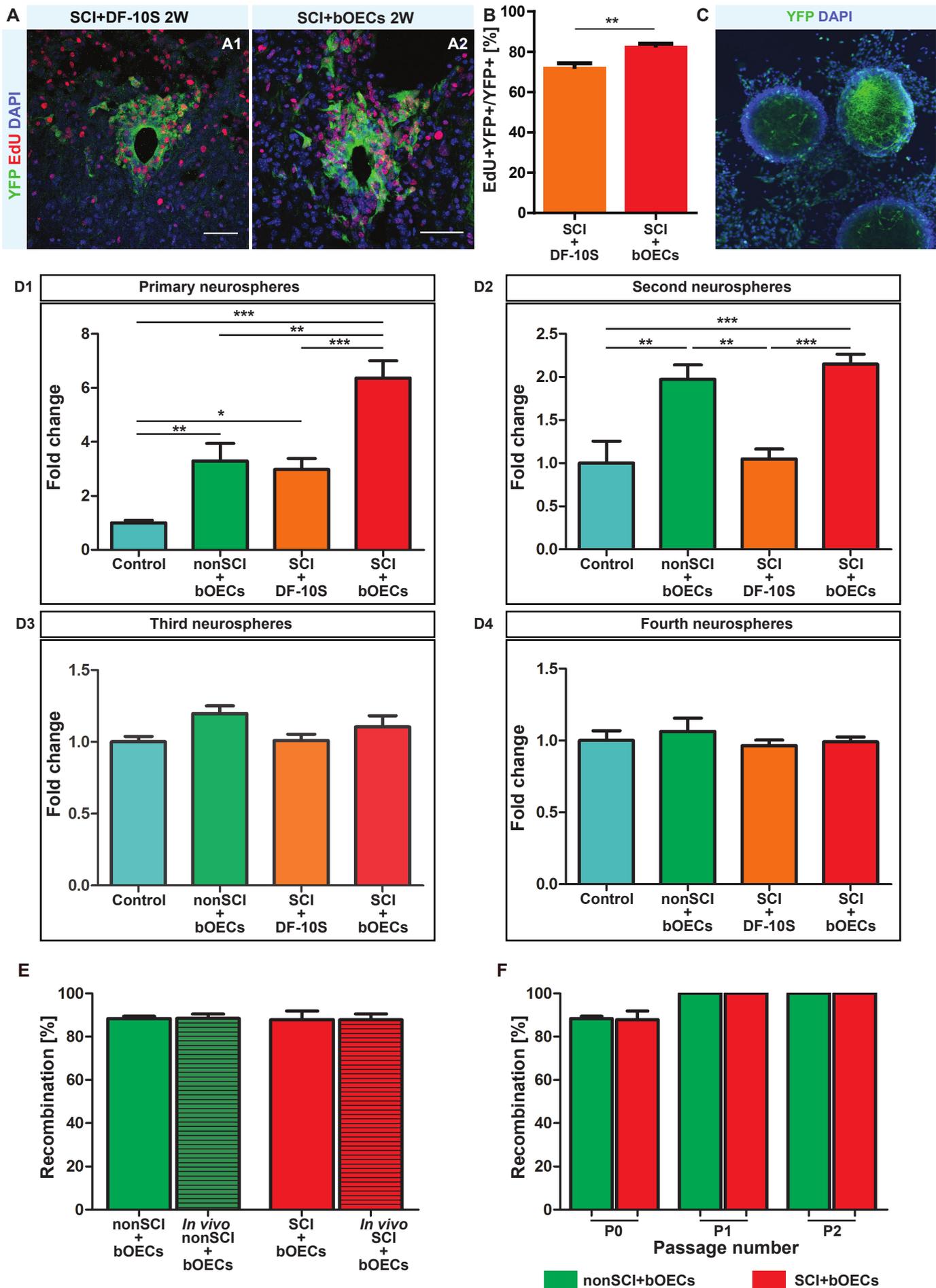
Assessing the direct and specific roles and contributions played by both endogenous spinal cord stem cells and transplanted cells after SCI is challenging. To do so, taking advantage of

the unique hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-rasless mouse line, we have investigated the specific role played by bOEC in a model in which ependymal cells progeny is ablated.

In this paradigm, it appears that OEC transplantation effects are mainly mediated by ependymal cells (Fig 5 and 6). In fact, after blocking ependymal cells proliferation we show that OEC transplantations per se fail to induce neurogenesis and to modulate spinal cord microenvironment. Indeed, no newborn DCX+/EdU+ or NeuN+/EdU+ neurons could be found in hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-rasless animals (data not shown). It appears also, that in this mouse line, bOEC transplantation fails to modulate axonal growth inhibitor molecules leading to a decrease of the surviving neurons at 2 and 14 weeks after SCI (Fig 5). Nevertheless, our results reveal that bOEC transplantation per se can modulate scar formation by increasing the astrocytic component and decreasing the fibrotic component of the spinal scar (Fig 6).

Altogether our study reveals, for the first time, that bOEC transplantation induces mainly its benefits by indirect effects mediated by activation of ependymal cells. Our study highlights the fact that spinal cord possesses an underestimated endogenous plasticity which represents an understudied therapeutic resource for the treatment of spinal cord injuries. Our study is paving the way of a new concept in biotherapy field focusing on activation, recruitment and modulation of endogenous spinal cord stem/progenitor cells.

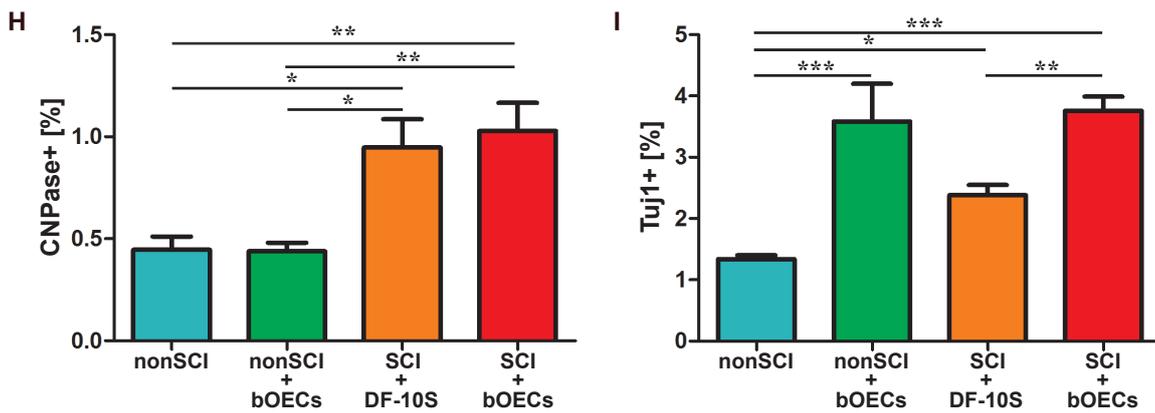
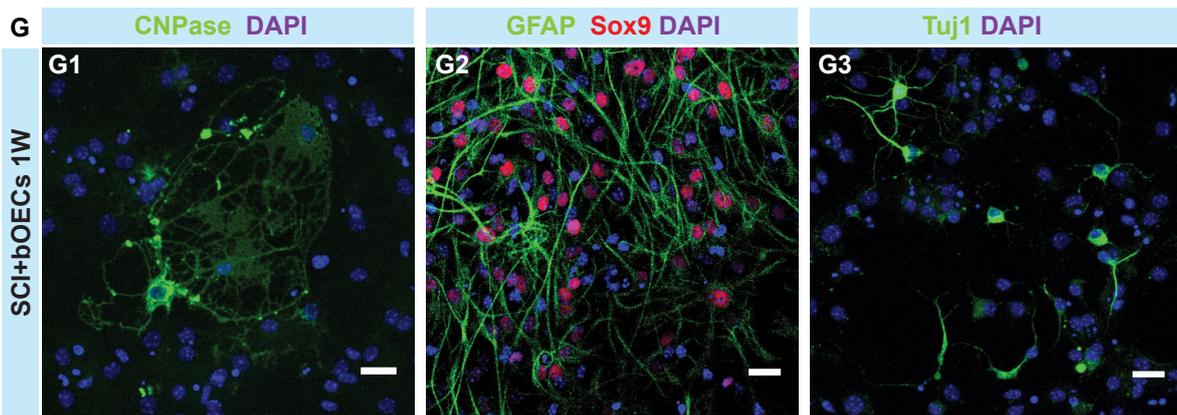
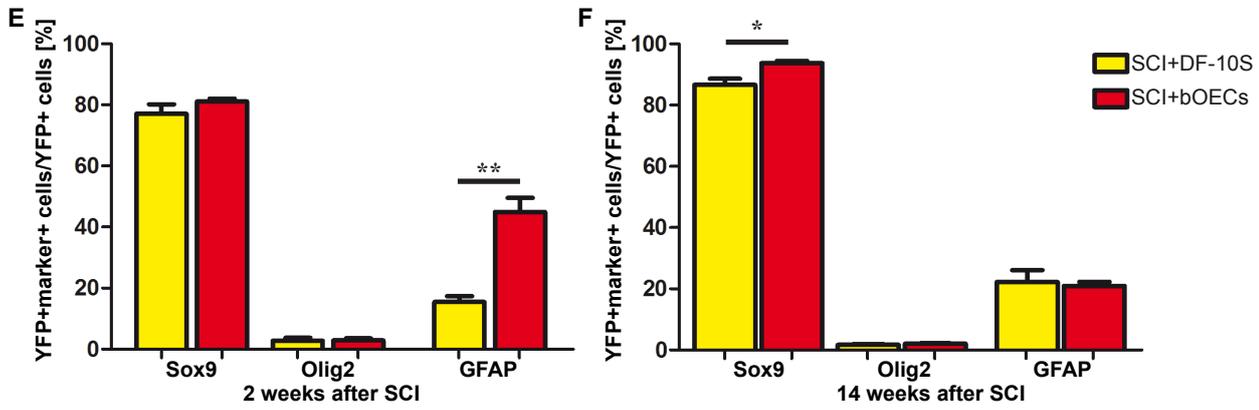
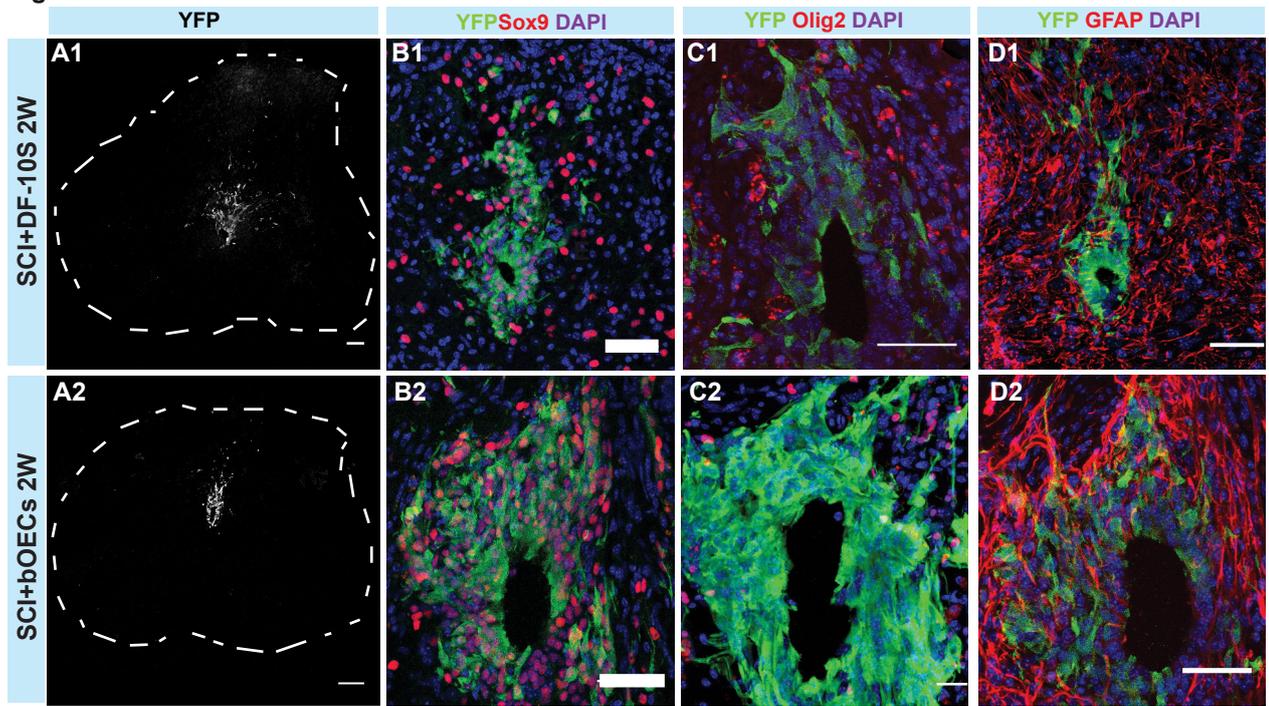
Figure 1



**FIGURE LEGENDS**

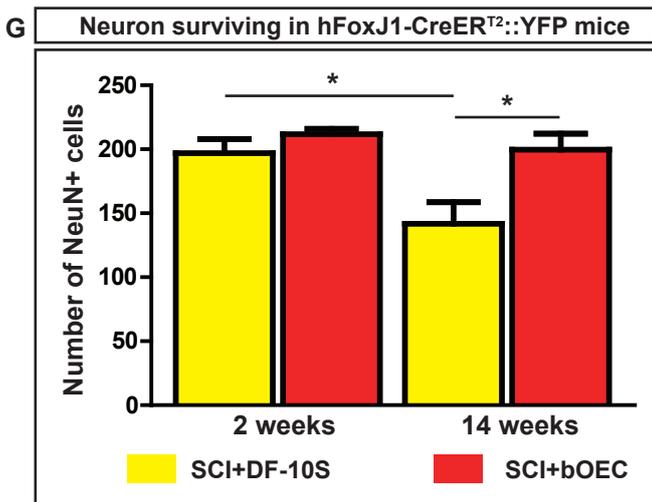
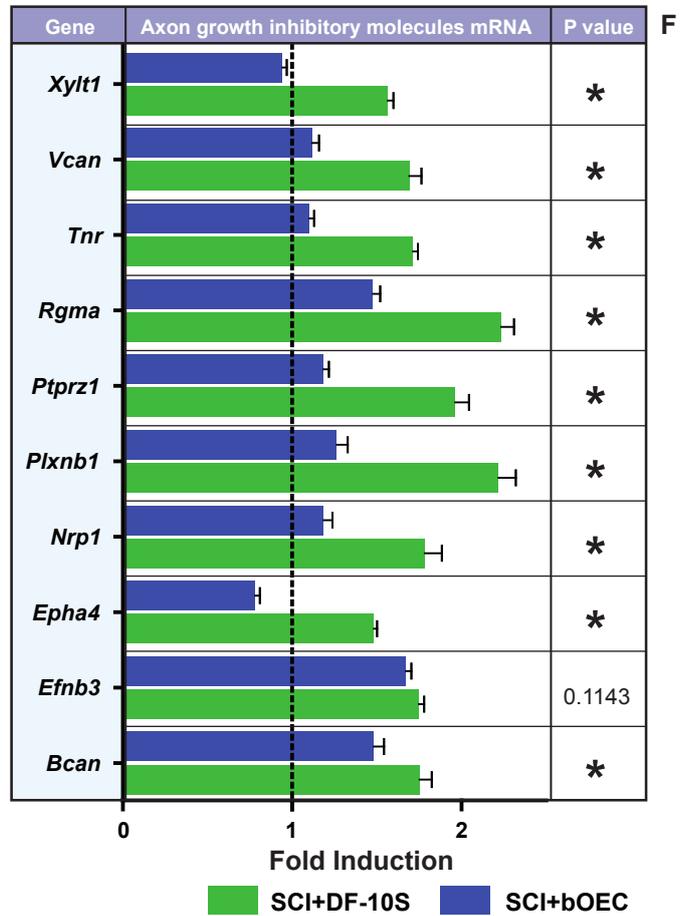
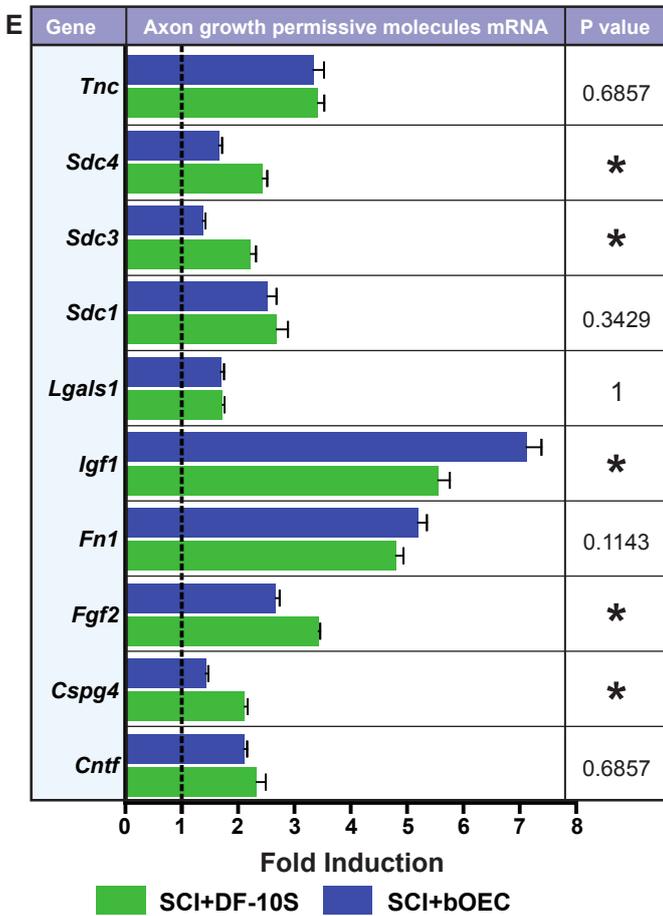
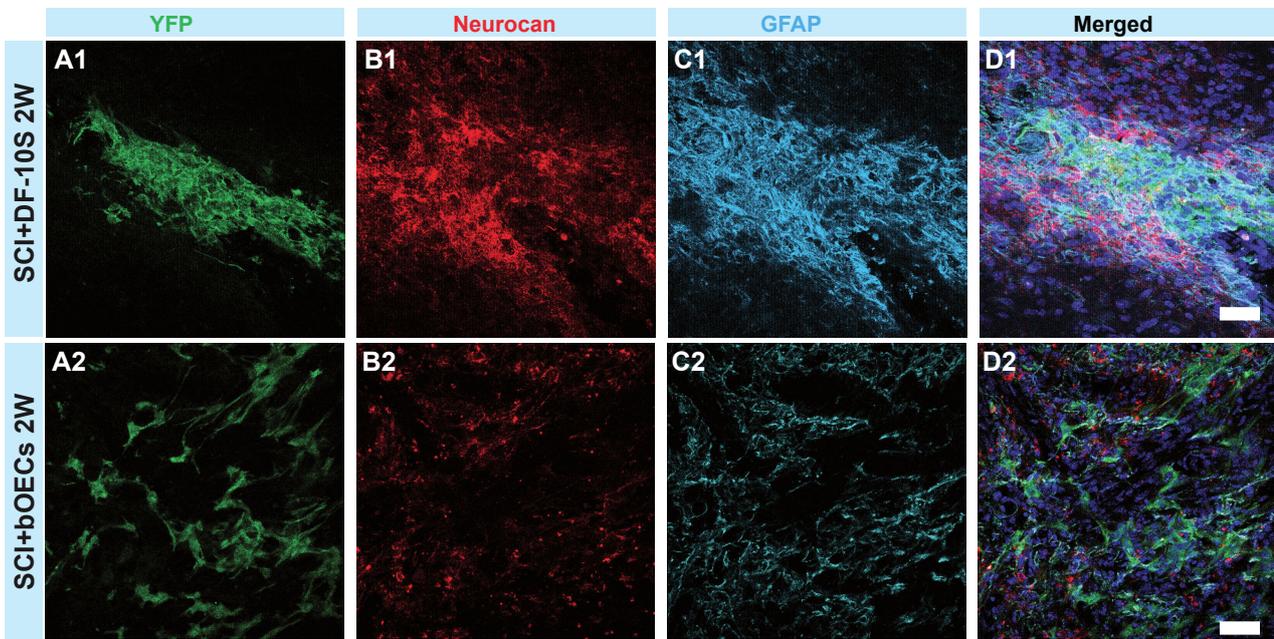
**Figure 1. bOECs transplantation increase ependymal cells ability to proliferate *in vivo* and *in vitro*.** A) Representative confocal images of coronal section of adult lesioned spinal cord from hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice 2 weeks after SCI of DF-10S (A1) and bOECs mice (A2). Scale bar: 25µm. B) Quantification of proliferating EdU positive/YFP positive recombined cells *in vivo* 2 weeks after SCI. Quantifications are expressed as average ± SEM. N=5 animals. C) Representative confocal image of primary cultured recombined neurospheres from hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP injured mice. D1-4) Quantification of the total number of neurospheres derived from 100,000 cell over passages from lesioned or unlesioned WT mice that received DF-10S or bOECs 1 week after injury. Quantifications are expressed as average ± SEM. N=3-4 animals per analysis including at least two independent culture experiments were performed. E) Quantification of *in vivo* recombined reporter+ cells and *in vitro* recombined neurospheres from hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice after bOECs transplantation from non-SCI and SCI mice. F) Comparative quantification of recombined neurospheres over passages from hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice after bOECs transplantation from non-SCI and SCI mice. Quantifications are expressed as average ± SEM. N=3-4 animals per analysis including at least two independent culture experiments were performed. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, and \*\*\**P*<0.001.

Figure 2



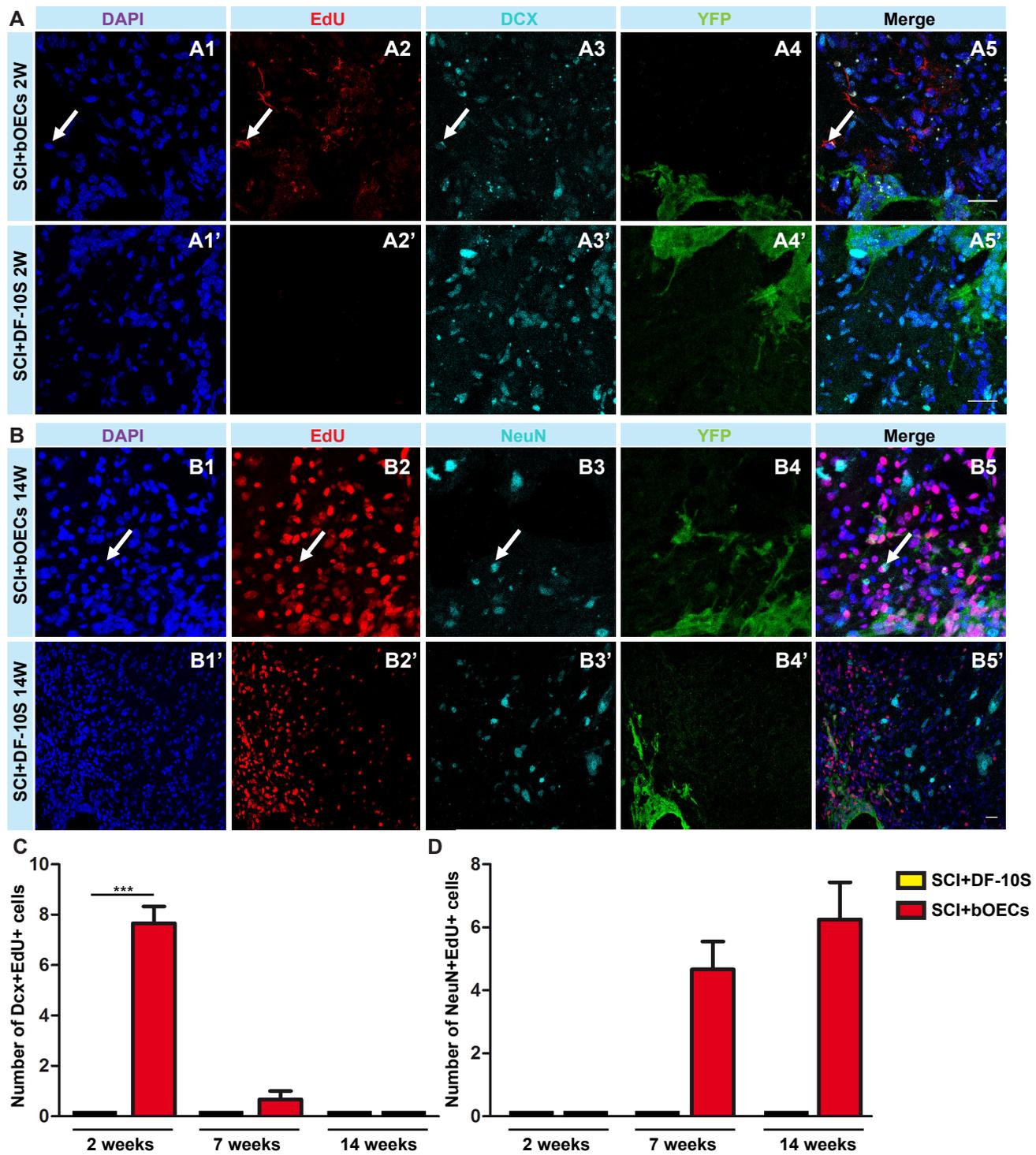
**Figure 2. bOECs transplantation changes ependymal cell progeny *in vivo* and *in vitro*.** A-D) Representative confocal images of coronal section of adult lesioned spinal cord from hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice 2 weeks after SCI of DF-10S (A1-D1) and bOECs mice (A2-D2). Scale bar: 200 $\mu$ m and 50 $\mu$ m. Identification of newly generated cells from YFP positive recombined ependymal cells were identified by Sox9 (ependymal cells around central canal) (B1-B2), Olig2 (oligodendrocyte) (C1-C2) and GFAP (astrocyte) (D1-D2). E) Quantification of double positive recombined cells into the spinal cord 2 weeks after SCI. F) Quantification of double positive recombined cells into the spinal cord 14 weeks after SCI. Quantifications are expressed as average  $\pm$  SEM. N=5 animals per marker staining. G) Representative confocal images of differentiated cells derived from primary neurospheres from WT adult mice one week after SCI from bOECs mice. Scale bar: 25 $\mu$ m. H) Quantification of CNPase<sup>+</sup> differentiated cells generated from primary neurospheres of adult WT mice from non SCI, non SCI+bOECs, SCI and SCI+bOECs mice. I) Quantification of Tuj1<sup>+</sup> differentiated cells generated from primary neurospheres of adult WT mice from non SCI, non SCI+bOECs, SCI and SCI+bOECs mice. Quantifications are expressed as average  $\pm$  SEM. N=3-4 animals per analysis including at least two independent culture experiments were performed. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, and \*\*\* $P$ <0.001.

Figure 3



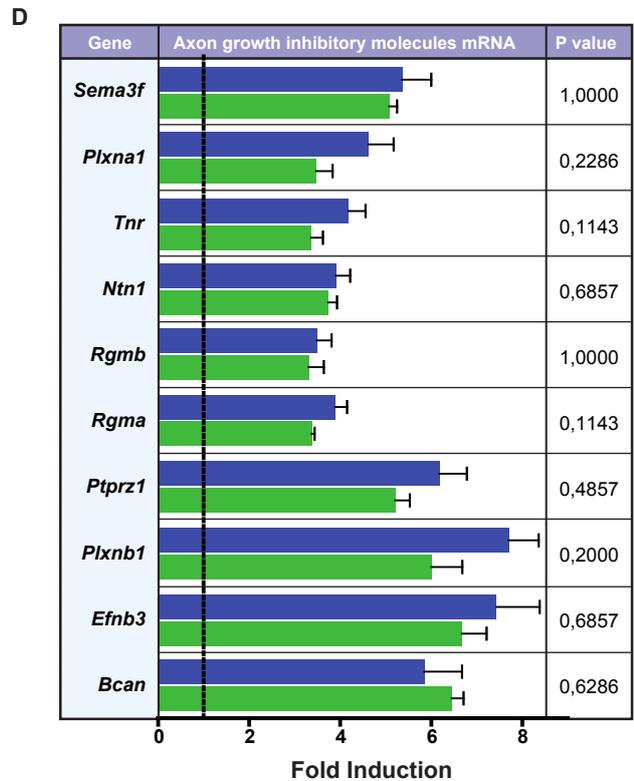
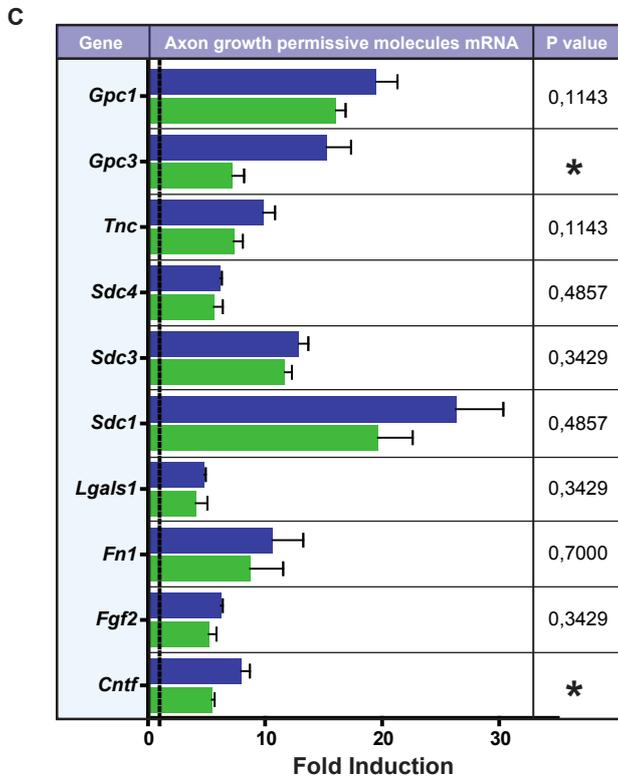
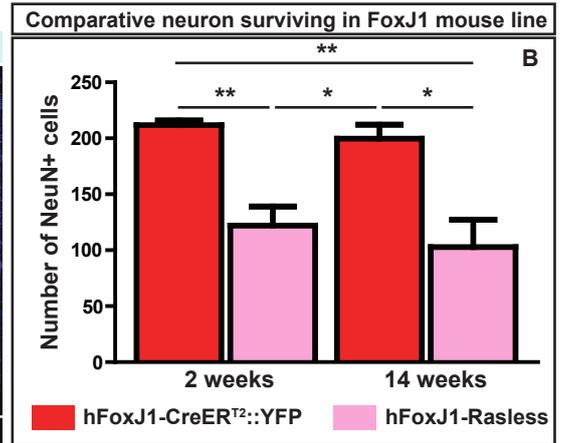
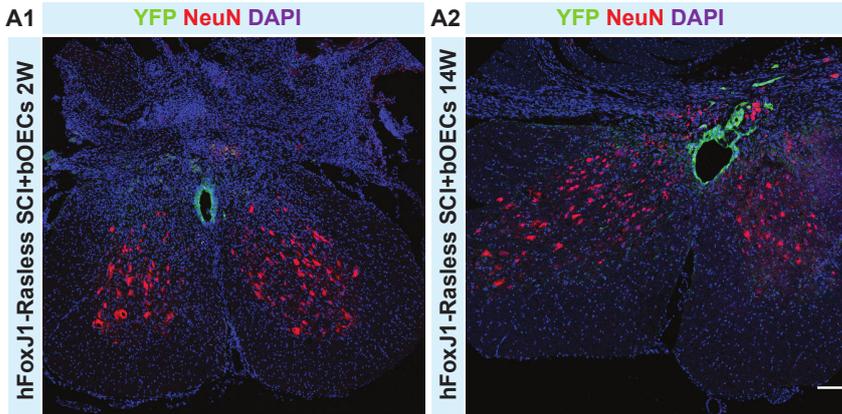
**Figure 3. bOECs transplantation modify endymal cells derived astrocytes and the scar environment.** A-D) Representative confocal images of coronal section of adult lesioned spinal cord from hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice 2 weeks after SCI of DF-10S (A1-D1) and bOECs mice (A2-D2). Identification of neurocan positive cells from recombined YFP positive/GFAP positive derived endymal cells. Scale bar: 25µm. E) Histogram of total RNA expression of WT spinal cord of axon-growth permissive molecules after SCI. Asterisks indicate significant differences between SCI+DF-10S (green) and SCI+bOECs (blue) groups. \* $P < 0.05$ , P-value column is the result of non-parametric t-test for comparison of the two groups. F) Histogram of total RNA expression of WT spinal cord of axon-growth inhibitory molecules after SCI. Asterisks indicate significant differences between SCI+DF-10S (green) and SCI+bOECs (blue) groups. \* $P < 0.05$ , P-value column is the result of non-parametric test for comparison of the two groups. Dashed line correspond to total RNA expression from uninjured control WT mice G) Quantification of the number of surviving NeuN positive neurons of adult lesioned spinal cord from hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice 2 and 14 weeks after SCI of DF-10S and bOECs mice. Quantifications are expressed as average  $\pm$  SEM. N=5 animals. \* $P < 0.05$ .

Figure 4



**Figure 4. bOECs transplantation upon SCI induces neurogenesis.** A-B) Representative confocal images of sagittal section of adult lesioned spinal cord from hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice 2 weeks (A) and 14 weeks (B) after SCI in bOECs (A1-5 and B1-5) and in DF-10S (A1'-5' and B1'-5') mice. Scale bar: 25µm. C) Quantification of the EdU positive/DCX positive cells from hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice 2 weeks, 7 weeks and 14 weeks after SCI of DF-10S and bOECs mice. D) Quantification of the EdU positive/NeuN positive cells from hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP mice 2 weeks, 7 weeks and 14 weeks after SCI of DF-10S and bOECs mice. Quantifications are expressed as average  $\pm$  SEM. N=5 animals per marker staining. \*\*\* $P$ <0.001.

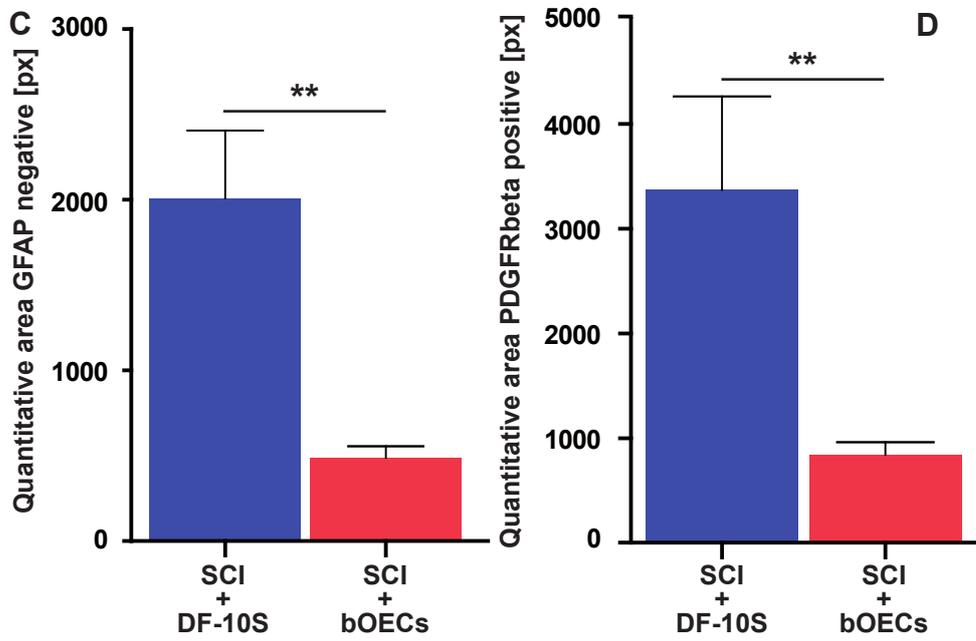
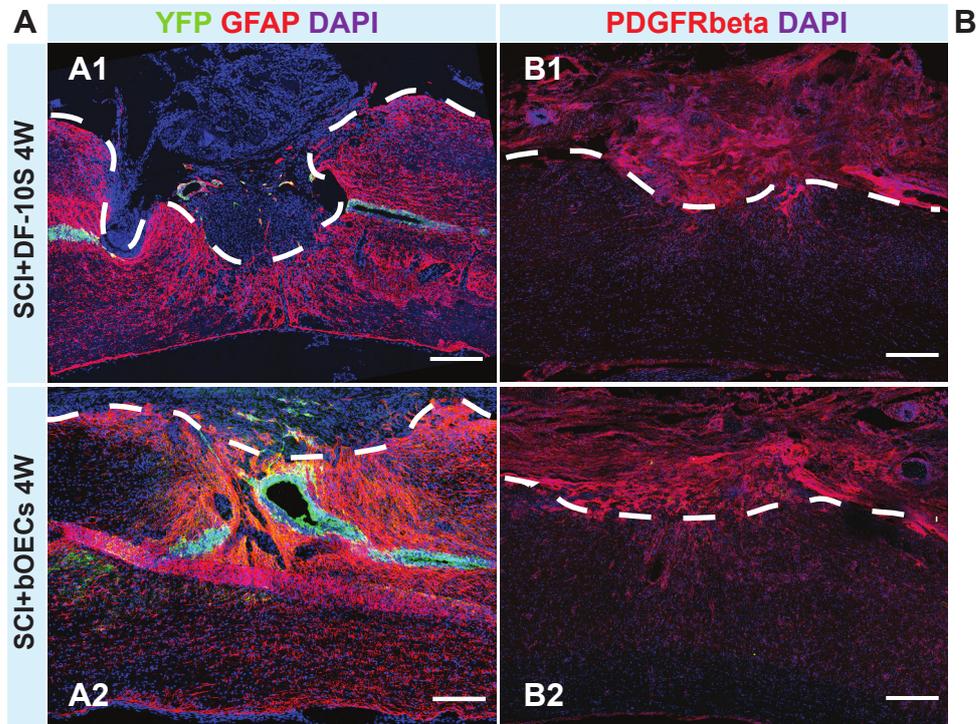
Figure 5



SCI+DF-10S hFoxJ1-Rasless    SCI+bOEC hFoxJ1-Rasless

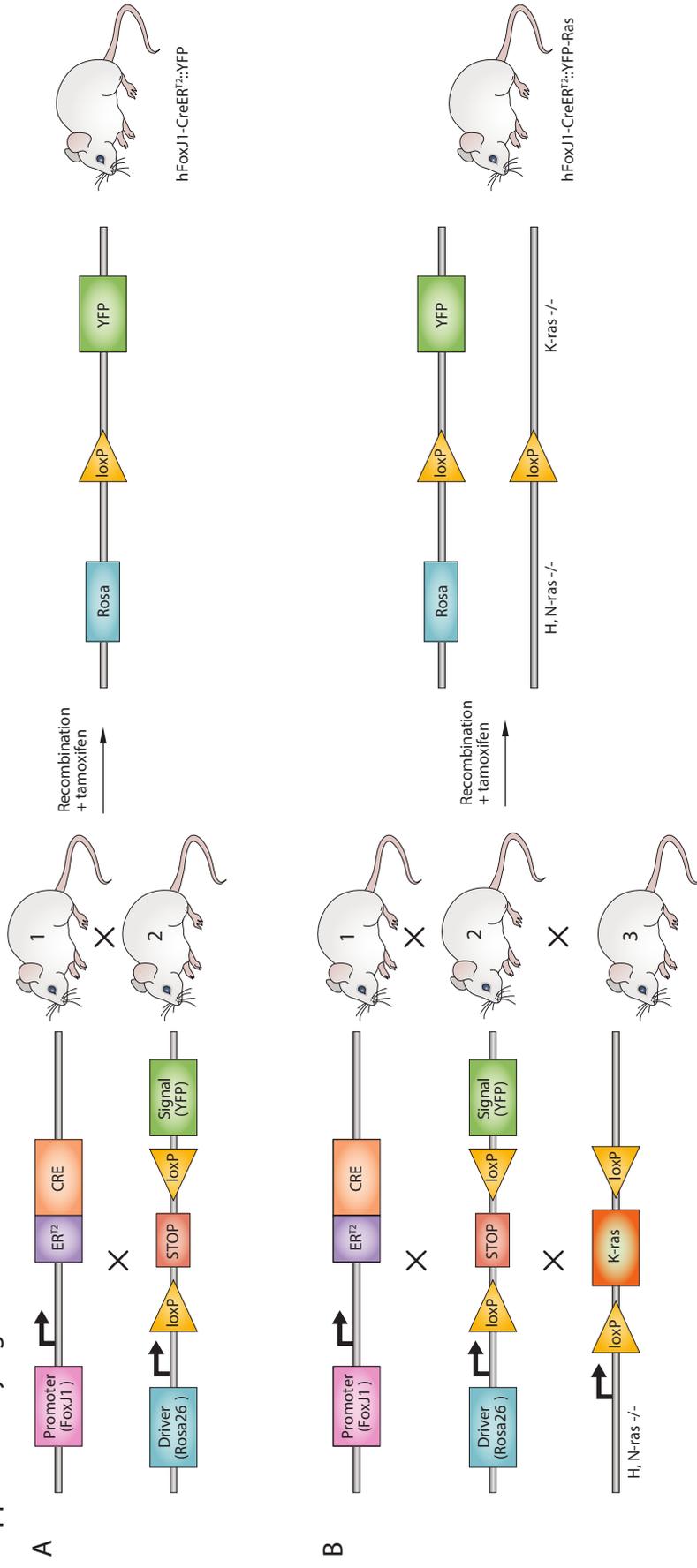
**Figure 5. bOECs transplantation per se fails to induce neurogenesis in hFoxJ1-rasless mouse model.** A) Representative confocal images of coronal section of adult lesioned spinal cord from hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-rasless 2 weeks (A1) and 14 weeks (A2) after SCI in bOECs mice. B) Quantification of the number of surviving NeuN positive neurons of adult lesioned spinal cord from hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP and hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-rasless mice 2 and 14 weeks after SCI of bOECs mice. Quantifications are expressed as average  $\pm$  SEM. N=5 animals. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01. C) Histogram of total RNA expression of hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-rasless spinal cord of axon-growth permissive molecules after SCI. Asterisks indicate significant differences between SCI+DF-10S (green) and SCI+bOECs (blue) groups. \* $P$ <0.05, P-value column is the result of non-parametric test for comparison of the two groups. D) Histogram of total RNA expression of hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-rasless spinal cord of axon-growth inhibitory molecules after SCI. P-value column is the result of non-parametric test for comparison of the two groups. Dashed lined correspond to total RNA expression from uninjured control WT mice.

Figure 6



**Figure 6. bOEC transplantation per se modulates scar formation upon SCI in hFoxJ1-rasless mouse model.** A-B) Representative confocal images of sagittal section of adult lesioned spinal cord from hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-rasless mice 4 weeks after SCI in DF-10S (A1-B1) and bOECs (B1-B2) mice. Scale bar: 200µm. Dashed lined correspond to lesion site border. C-D) Quantification of the GFAP negative area (C) and PDGFRbeta positive area (D) of adult lesioned spinal cord from hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-rasless mice 4 weeks after SCI of DF-10S and bOECs mice. Quantifications are expressed in pixels [px] as average ± SEM. N=5 animals per marker staining. \*\**P*<0.01.

Supplementary Figure 1



**Supplementary Figure 1. Schematic summary of transgenic lines used in this study.**

Schematic genetic illustration of the two different transgenic mouse models used, including A) tamoxifene-dependence inducible hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup> mice (line 1) (Barnabe-Heider et al., 2010) backcrossed with gene reporter mouse R26R-YFP (line 2) to generate hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP. B) hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP were crossed to a conditional Ras knockout mouse line (line 3) (Sabelstrom et al., 2013). The mouse is homozygous for H-ras and N-ras null alleles and K-ras is flanked by two loxP sites that upon Cre-mediated recombination will excise the K-ras gene to get a hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP -rasless mouse line.

Supplementary Figure 2

<b>Antibody table</b>			
<b>Antibody</b>	<b>Species</b>	<b>Dilution</b>	<b>Company (Catalog number)</b>
GFP	Chicken	1:500	Aves (GFP-1020)
Sox9	Goat	1:500	R&D Systems (AF3075)
Ki-67	Rabbit	1:500	ThermoScientific (RM-9106)
GFAP	Rabbit	1:500	Millipore (AB5804)
CNPase	Mouse	1:200	Millipore (MAB326R)
Tuj1	Mouse	1:500	Covance (MMS435P)
Neurocan	Mouse	1:500	Millipore (MAB5212)
DCX	Goat	1:500	Santa Cruz Biotechnology(sc-8066)
NeuN	Mouse	1:500	Millipore (MAB377)
PDGFR $\beta$	Rabbit	1:500	Abcam (ab32570)
Click-it <sup>®</sup> Plus EdU			Molecular probes by Life (C10638)
DAPI		1:10000	Sigma (D9542)
Anti-rabbit cy3 secondary antibody	Donkey	1:500	Jackson Immuno Research (711-166-152)
Anti-mouse cy3 secondary antibody	Donkey	1:500	Jackson Immuno Research (715-165-140)
Anti-chicken Alexa 488 secondary antibody	Donkey	1:500	Jackson Immuno Research (703-545-155)

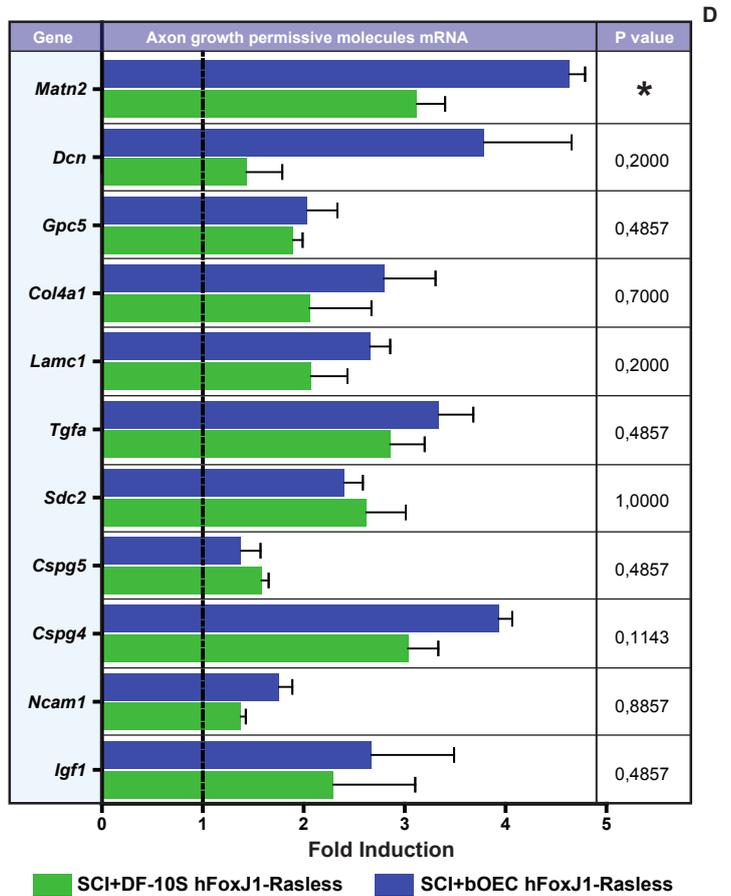
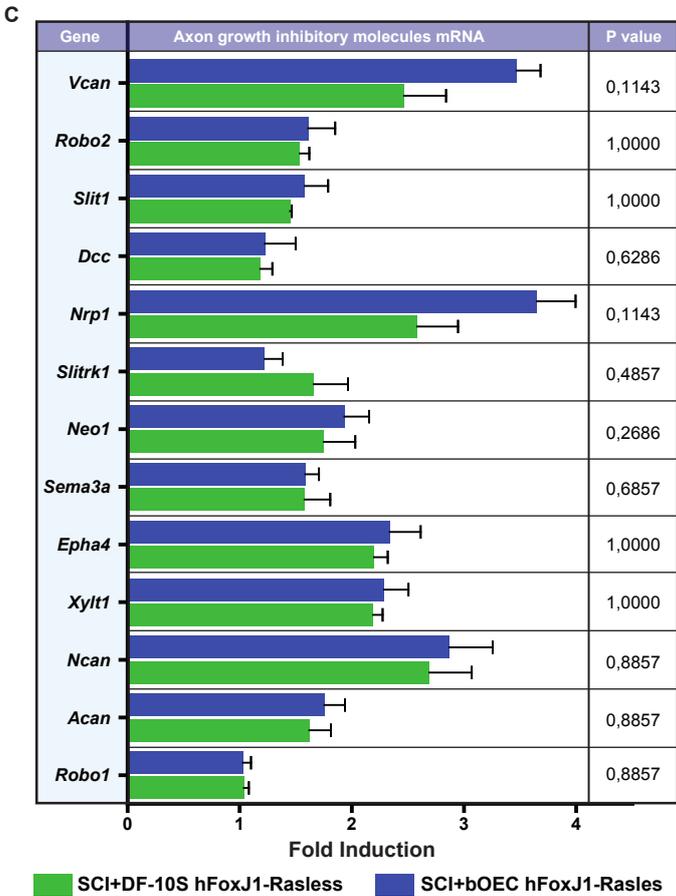
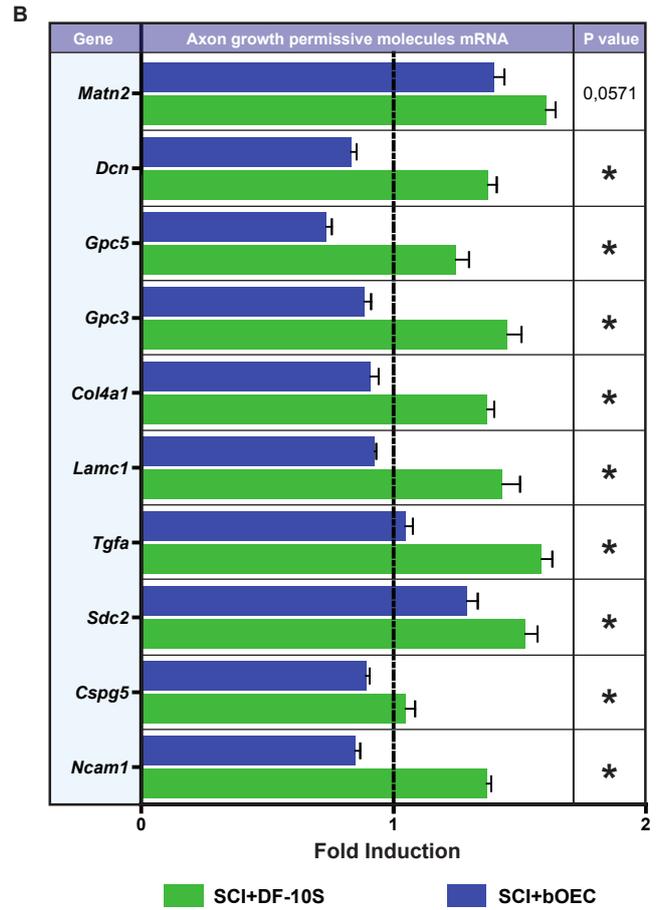
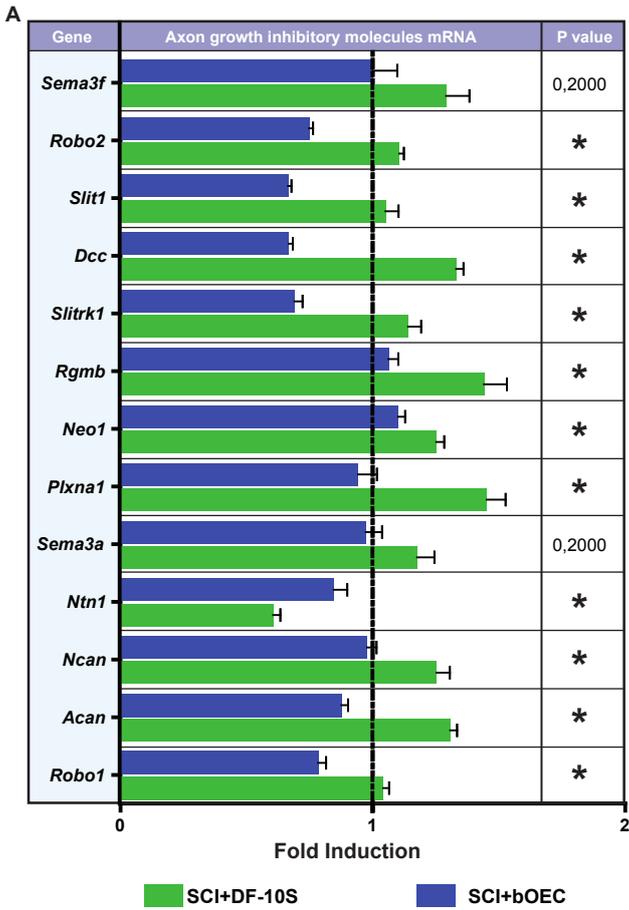
**Supplementary Figure 2.** Antibody table. Details of sources and dilutions of antibodies used for histo/immunocytochemistry in this study.

Supplementary Figure 3

	Gene abbreviation	Molecule name		Gene abbreviation	Molecule name
Axon growth inhibitory molecules	<i>Acan</i>	Aggrecan	Axon growth permissive molecules	<i>Cspg4</i>	NG2
	<i>Bcan</i>	Brevican		<i>Cspg5</i>	Neuroglycan C
	<i>Ncan</i>	Neurocan		<i>Tnc</i>	Tenascin C
	<i>Vcan</i>	Versican		<i>Sdc1</i>	Syndecan 1
	<i>Ptprz1</i>	Phosphacan		<i>Sdc2</i>	Syndecan 2
	<i>Xylt1</i>	Xylosyltransferase 1		<i>Sdc3</i>	Syndecan 3
	<i>Tnr</i>	Tenascin R		<i>Sdc4</i>	Syndecan 4
	<i>Epha4</i>	Ephrin A4		<i>Cntf</i>	Ciliary neurotrophic factor
	<i>Efnb3</i>	Ephrin B3		<i>Igf1</i>	Insulin-like growth factor-1
	<i>Ntn1</i>	Netrin 1		<i>Fgf2</i>	Fibroblast growth factor 2
	<i>Sema3a</i>	Semaphorin 3a		<i>Tgfa</i>	Transforming growth factor alpha
	<i>Sema3f</i>	Semaphorin 3f		<i>Lamc1</i>	Laminin C1
	<i>Plxna1</i>	Plexin A1		<i>Col4a1</i>	Collagen 4a1
	<i>Plxnb1</i>	Plexin B1		<i>Fn1</i>	Fibronectin 1
	<i>Nrp1</i>	Neuropilin 1		<i>Gpc3</i>	Glypican 3
	<i>Dcc</i>	Deleted in Colorectal Cancer		<i>Gpc5</i>	Glypican 5
	<i>Neo1</i>	Neogenin 1		<i>Dcn</i>	Decorin
	<i>Rgma</i>	Repulsive guidance molecule A		<i>Lgals1</i>	Galectin 1
	<i>Rgmb</i>	Repulsive guidance molecule B		<i>Ncam1</i>	Neural cell adhesion molecule 1
	<i>Slit1</i>	Slit 1		<i>Matn2</i>	Matrilin
<i>Slitrk1</i>	SLIT and NTRK-like family, member 1				
<i>Robo1</i>	Robo 1				
<i>Robo2</i>	Robo 2				

**Supplementary Figure 3. Table of genes for axon growth inhibitory and axon growth permissive molecules analyzed by qPCR.** This table lists the genes abbreviation and full name of 43 axon-growth-modulating molecules for which gene expression levels were analyzed in this study (Anderson et al., 2016; Sabelstrom et al., 2013).

Supplementary Figure 4



**Supplementary Figure 4. Histogram of non-significant level expression of axon-growth-inhibitory or permissive molecules from two different hFoxJ1 transgenic mice line at 2 weeks post-injury.** A) Histogram of control DF-10S (green) and bOECs (blue) transplanted WT total RNA expression of axon-growth inhibitory molecules by qPCR 2 weeks post-injury. B) Histogram of control DF-10S (green) and bOECs (blue) transplanted WT total RNA expression of axon-growth permissive molecules by qPCR 2 weeks post-injury. C) Histogram of control DF-10S (green) and bOECs (blue) transplanted hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-rasless total RNA expression of axon-growth inhibitory molecules by qPCR 2 weeks post-injury. D) Histogram of control DF-10S (green) and bOECs (blue) transplanted hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-rasless total RNA expression of axon-growth permissive molecules by qPCR 2 weeks post-injury. qPCR results are the mean  $\pm$ SEM ( $\geq 4$  animals per group). P-value column is the result of non-parametric test for comparison of the two groups. Dashed lined correspond to total RNA expression from uninjured control WT mice.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to Dr. Jonas Friséen for sharing the hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP transgenic mouse line and Célia Duclos for her technical support.

## **FUNDING SOURCES**

This research was supported by ADIR association, Fondation de l'Avenir and IRME association. XL was supported by a Ph.D. studentship from KID funding (Karolinska Institutet). CC and NG are supported by European Union and Normandie Regional Council. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Funds (ERDF).

## **CONFLICTS OF INTEREST**

We declare no conflict of interest.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

F.B.H. and N.G. conceptualized the project.

A.H., X.L. and N.G. designed the experiments.

A.H., X.L., C.C., Q.D. and M.D.G. performed the experiments.

A.H., X.L. and N.G. analyzed the results.

D.V. and J.P.M. provided reagents, techniques and scientific input.

A.H., X.L., F.B.H. and N.G. wrote the article.

## REFERENCES

- Ahuja, C.S., Wilson, J.R., Nori, S., Kotter, M.R.N., Druschel, C., Curt, A., and Fehlings, M.G. (2017). Traumatic spinal cord injury. *Nat Rev Primer* 3, 17018.
- Anderson, M.A., Burda, J.E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T.M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B.S., Deming, T.J., and Sofroniew, M.V. (2016). Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 532, 195–200.
- Assinck, P., Duncan, G.J., Hilton, B.J., Plemel, J.R., and Tetzlaff, W. (2017). Cell transplantation therapy for spinal cord injury. *Nat Neurosci* 20, 637–647.
- Barnabe-Heider, F., Meletis, K., Eriksson, M., Bergmann, O., Sabelstrom, H., Harvey, M.A., Mikkers, H., and Frisen, J. (2008). Genetic manipulation of adult mouse neurogenic niches by in vivo electroporation. *Nat Methods* 5, 189–196.
- Barnabe-Heider, F., Goritz, C., Sabelstrom, H., Takebayashi, H., Pfrieger, F.W., Meletis, K., and Frisen, J. (2010). Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell* 7, 470–482.
- Cregg, J.M., DePaul, M.A., Filous, A.R., Lang, B.T., Tran, A., and Silver, J. (2014). Functional regeneration beyond the glial scar. *Exp Neurol* 253, 197–207.
- Fiorelli, R., Cebrian-Silla, A., Garcia-Verdugo, J.M., and Raineteau, O. (2013). The adult spinal cord harbors a population of GFAP-positive progenitors with limited self-renewal potential. *Glia* 61, 2100–2113.
- Gregoire, C.A., Goldenstein, B.L., Floriddia, E.M., Barnabe-Heider, F., and Fernandes, K.J. (2015). Endogenous neural stem cell responses to stroke and spinal cord injury. *Glia* 63, 1469–1482.
- Guerout, N., Derambure, C., Drouot, L., Bon-Mardion, N., Duclos, C., Boyer, O., and Marie, J.P. (2010). Comparative gene expression profiling of olfactory ensheathing cells from olfactory bulb and olfactory mucosa. *Glia* 58, 1570–1580.
- Guo, F., Maeda, Y., Ma, J., Delgado, M., Sohn, J., Miers, L., Ko, E.M., Bannerman, P., Xu, J., Wang, Y., et al. (2011). Macrogial Plasticity and the Origins of Reactive Astroglia in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Neurosci.* 31, 11914.
- Habib, N., Li, Y., Heidenreich, M., Swiech, L., Avraham-Davidi, I., Trombetta, J.J., Hession, C., Zhang, F., and Regev, A. (2016). Div-Seq: Single-nucleus RNA-Seq reveals dynamics of rare adult newborn neurons. *Science* 353, 925–928.
- Hamilton, L.K., Truong, M.K., Bednarczyk, M.R., Aumont, A., and Fernandes, K.J. (2009). Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord. *Neuroscience* 164, 1044–1056.
- Honore, A., Le Corre, S., Derambure, C., Normand, R., Duclos, C., Boyer, O., Marie, J.P., and Guerout, N. (2012). Isolation, characterization, and genetic profiling of subpopulations of olfactory ensheathing cells from the olfactory bulb. *Glia* 60, 404–413.
- Jacquet, B.V., Salinas-Mondragon, R., Liang, H., Therit, B., Buie, J.D., Dykstra, M., Campbell, K., Ostrowski, L.E., Brody, S.L., and Ghashghaei, H.T. (2009). FoxJ1-dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain. *Development* 136, 4021–4031.
- Jacquet, B.V., Muthusamy, N., Sommerville, L.J., Xiao, G., Liang, H., Zhang, Y., Holtzman, M.J., and Ghashghaei, H.T. (2011). Specification of a Foxj1-dependent lineage in the forebrain is required for embryonic-to-postnatal transition of neurogenesis in the olfactory bulb. *J Neurosci* 31, 9368–9382.
- Khankan, R.R., Griffis, K.G., Haggerty-Skeans, J.R., Zhong, H., Roy, R.R., Edgerton, V.R., and Phelps, P.E. (2016). Olfactory Ensheathing Cell Transplantation after a Complete Spinal Cord Transection Mediates Neuroprotective and Immunomodulatory Mechanisms to Facilitate Regeneration. *J Neurosci* 36, 6269–6286.
- Lacroix, S., Hamilton, L.K., Vaugeois, A., Beaudoin, S., Breault-Dugas, C., Pineau, I., Levesque, S.A., Gregoire, C.A., and Fernandes, K.J. (2014). Central canal ependymal cells proliferate extensively in response to traumatic spinal cord injury but not demyelinating lesions. *PLoS One* 9, e85916.
- Li, X., Floriddia, E.M., Toskas, K., Fernandes, K.J., Guerout, N., and Barnabe-Heider, F. (2016). Regenerative Potential of Ependymal Cells for Spinal Cord Injuries Over Time. *EBioMedicine* 13, 55–65.

- Mayeur, A., Duclos, C., Honore, A., Gauberti, M., Drouot, L., do Rego, J.C., Bon-Mardion, N., Jean, L., Verin, E., Emery, E., et al. (2013). Potential of olfactory ensheathing cells from different sources for spinal cord repair. *PLoS One* 8, e62860.
- Meletis, K., Barnabe-Heider, F., Carlen, M., Evergren, E., Tomilin, N., Shupliakov, O., and Frisen, J. (2008). Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol* 6, e182.
- O'Shea, T.M., Burda, J.E., and Sofroniew, M.V. (2017). Cell biology of spinal cord injury and repair. *J Clin Invest* 127, 3259–3270.
- Ostrowski, L.E., Hutchins, J.R., Zakel, K., and O'Neal, W.K. (2003). Targeting expression of a transgene to the airway surface epithelium using a ciliated cell-specific promoter. *Mol Ther* 8, 637–645.
- Park, S.I., Lim, J.Y., Jeong, C.H., Kim, S.M., Jun, J.A., Jeun, S.S., and Oh, W.I. (2012). Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell therapy promotes functional recovery of contused rat spinal cord through enhancement of endogenous cell proliferation and oligogenesis. *J Biomed Biotechnol* 2012, 362473.
- Qin, Y., Zhang, W., and Yang, P. (2015). Current states of endogenous stem cells in adult spinal cord. *J Neurosci Res* 93, 391–398.
- Sabelstrom, H., Stenudd, M., Reu, P., Dias, D.O., Elfineh, M., Zdunek, S., Damberg, P., Goritz, C., and Frisen, J. (2013). Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science* 342, 637–640.
- Siddiqui, A.M., Khazaei, M., and Fehlings, M.G. (2015). Translating mechanisms of neuroprotection, regeneration, and repair to treatment of spinal cord injury. *Prog Brain Res* 218, 15–54.
- Su, Z., Niu, W., Liu, M.L., Zou, Y., and Zhang, C.L. (2014). In vivo conversion of astrocytes to neurons in the injured adult spinal cord. *Nat Commun* 5, 3338.
- Tabakow, P., Jarmundowicz, W., Czapiga, B., Fortuna, W., Miedzybrodzki, R., Czyz, M., Huber, J., Szarek, D., Okurowski, S., Szewczyk, P., et al. (2013). Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury. *Cell Transpl.* 22, 1591–1612.
- Tetzlaff, W., Okon, E.B., Karimi-Abdolrezaee, S., Hill, C.E., Sparling, J.S., Plemel, J.R., Plunet, W.T., Tsai, E.C., Baptiste, D., Smithson, L.J., et al. (2011). A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury. *J Neurotrauma* 28, 1611–1682.
- Watzlawick, R., Rind, J., Sena, E.S., Brommer, B., Zhang, T., Kopp, M.A., Dirnagl, U., Macleod, M.R., Howells, D.W., and Schwab, J.M. (2016). Olfactory Ensheathing Cell Transplantation in Experimental Spinal Cord Injury: Effect size and Reporting Bias of 62 Experimental Treatments: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Biol* 14, e1002468.
- Westgren, N., and Levi, R. (1998). Quality of life and traumatic spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 79, 1433–1439.
- Xu, L., Mahairaki, V., and Koliatsos, V.E. (2012). Host induction by transplanted neural stem cells in the spinal cord: further evidence for an adult spinal cord neurogenic niche. *Regen Med* 7, 785–797.

# **DISCUSSION**



# Première partie

---



## I. Discussion article I

L'objectif de ce projet était d'étudier la gliogenèse du tube neural au cours du développement embryonnaire et plus particulièrement, l'apparition des cellules épendymaires composant les parois du canal central. L'équipe du Dr Barnabé-Heider a longtemps étudié la génération des différentes populations cellulaires durant le développement de la moelle spinale (Guerout et al., 2014a; Li et al., 2016b). C'est ainsi qu'en 2016, ils déterminèrent pour la première fois, que les cellules épendymaires émergeaient au niveau des domaines progéniteurs pMN et p2 au moment du stade E15,5 du développement embryonnaire de la souris (Li et al., 2016b). Pour ce faire, ils utilisèrent deux lignées transgéniques murines permettant un suivi de l'expression du facteur de transcription FoxJ1, la lignée non inductible hFoxJ1::EGFP et la lignée inductible hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP. Le facteur FoxJ1 fut décrit précédemment comme étant impliqué dans le processus de formation des cils motiles et il est donc exprimé spécifiquement par des cellules multi-ciliées présentes chez les mammifères, tel que les testicules, l'épithélium pulmonaire, le plexus choroïde et le SNC (Clevidence et al., 1994; Yu et al., 2008). La lignée FoxJ1::EGFP, qui exprime la GFP sous la dépendance de l'expression du facteur FoxJ1 permet donc de déterminer que vers E15,5 les cellules bordant le canal central étaient recombinaisons, donc qu'elles exprimaient le facteur de transcription. Cette observation fut confirmée par l'utilisation de la seconde lignée transgénique hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP, qui montra que l'expression de FoxJ1 restait confinée aux cellules bordant le canal central et ce, même après la naissance. En corrélation avec l'analyse de l'expression des marqueurs spécifiques Sox9 et Vimentine, il fut confirmé que ces cellules étaient bien des cellules épendymaires. A E15,5, les cellules épendymaires FoxJ1 positives émergent donc des domaines progéniteurs pMN et p2 et restent pour former les parois du canal central de la moelle spinale durant toute la vie de l'animal (Li et al., 2016b). Durant cette étude, Li et ses collègues se sont également aperçus de la présence de cellules recombinaisons en dehors du canal central et ce, dès la phase de la neurogenèse. Récemment, il fut constaté qu'au niveau du cerveau, FoxJ1 participait au processus de différenciation des cellules de la glie radiaire en cellules épendymaires mais étonnement, il participe également à la différenciation des cellules de la glie radiaire en un sous-type d'astrocytes (Jacquet et al., 2009). Celui-ci fut également décrit comme étant impliqué dans la neurogenèse des bulbes olfactifs après la naissance. Il permet la transition des progéniteurs neuraux en neurones matures peuplant les bulbes olfactifs (Jacquet et al., 2011). Ces travaux démontrent que le rôle du gène *FoxJ1* n'est pas seulement cantonner à la régulation du programme de formation des cils motiles du SNC, mais également qu'il participe

à la génération de types cellulaires, telles les cellules épendymaires, durant le développement mais pas seulement. L'analyse par hybridation *in situ* de l'ARNm de FoxJ1 pendant le développement montre une large expression de celui-ci le long de la zone ventriculaire dès E11,5. Entre E10,5 et 14,5, avant le déclenchement de la gliogenèse et l'apparition des premières cellules épendymaires, l'activation du promoteur FoxJ1 est observée au sein de la substance grise et de la plaque du plancher de la moelle spinale des embryons hFoxJ1::EGFP. Ces cellules recombinées furent caractérisées comme étant des interneurons du fait de leur expression des marqueurs PAX2 et CHOX10 spécifiques des interneurons V1 et V2. Ces observations sont cohérentes avec les travaux précédents qui montrent que FoxJ1 est indispensable à la génération d'une partie des neurones innervant les bulbes olfactifs au moment de la naissance. L'absence de *FoxJ1* conduit, chez l'animal, à une altération du processus de neurogène au niveau des bulbes, se caractérisant par une diminution du nombre de neurones matures NeuN positifs. Jacquet et al démontrèrent que seulement 3% des neurones matures présents dans les bulbes olfactifs sont issus de cellules FoxJ1 positives. De façon surprenante, la délétion du gène entraîne une diminution de 65% du nombre total de neurones matures dans les bulbes olfactifs murins (Jacquet et al., 2011). Selon l'auteur, cette diminution s'expliquerait par une action paracrine des neurones dérivés des cellules FoxJ1 durant la neurogenèse des bulbes olfactifs. De plus, entre E13,5 et E15,5, FoxJ1 est identifié comme étant exprimé par des sous-populations d'astrocytes dans les parties latérales de la substance blanche et au niveau dorsal. Cette expression par les astrocytes est surprenante mais pas inintéressante car elle confirme que les observations faites niveau du SVZ où FoxJ1 permettraient la génération d'un sous-type d'astrocytes FoxJ1<sup>+</sup> S100β<sup>+</sup> GFAP<sup>+</sup> à partir des cellules de la glie radiaire après la naissance (Jacquet et al., 2009). De plus, Hochstim et al montrent que durant le développement, les sous-populations astrocytaires VA1, VA2 et VA3 émergent depuis des progéniteurs qui migrent latéralement depuis la zone ventriculaire du tube neural (Hochstim et al., 2008). Les astrocytes VA1 et VA2 sont décrits comme émergeant des mêmes domaines progéniteurs que les interneurons V1 et V2 et migrant sous l'influence des mêmes facteurs, tel que la protéine Reeline. Les astrocytes constituent la population cellulaire la plus importante et la plus hétérogène de la moelle spinale, mais leur origine embryonnaire reste encore méconnue. Le manque de spécificité des marqueurs des facteurs de transcription utilisés dans leur identification et leur suivi dans les protocoles de développement embryonnaire explique cette incompréhension des mécanismes de formation des astrocytes médullaires. La découverte d'une expression transitoire de hFoxJ1 dans les deux modèles de souris transgéniques pourrait constituer un nouvel outil dans l'étude des astrocytes durant le développement. En effet,

l'observation de cellules recombinées FoxJ1<sup>+</sup> GFAP<sup>+</sup> dans la partie dorsale n'a pour l'instant pas été prouvée. Récemment, il fut néanmoins démontré une expression spécifique du facteur de transcription Ascl1 par des progéniteurs gliaux en partie dorsale qui sont à l'origine de la génération des astrocytes fibreux et protoplasmiques de la partie dorsale de la moelle spinale (Vue et al., 2014).

Des doutes demeurent quant à la spécificité des résultats obtenus avec ces souris transgéniques. En effet, le modèle de souris hFoxJ1::EGFP fut construit afin d'identifier les cellules ciliées du système respiratoire dans le cadre d'études sur la mucoviscidose (Ostrowski et al., 2003). Pour cela, un fragment de la séquence du promoteur FoxJ1 humain commandant l'expression de la protéine GFP a été introduit aléatoirement dans le génome d'une souris C57bl/6. A l'époque, les auteurs reconnaissaient ce problème d'introduction non spécifique de leur construction dans le génome, mais concluaient que l'expression spécifique de la GFP par l'ensemble des cellules ciliées présentes le long du système respiratoire ainsi qu'au niveau des testicules, de l'oviducte et des cellules épendymaires bordant les ventricules cérébraux, réfutait ce problème (Ostrowski et al., 2003). Cette activité spécifique du promoteur humain de *FoxJ1* fut confirmée par hybridation *in situ* pour l'ARNm de FoxJ1 dans le cerveau. Il fut constaté une co-localisation de la GFP et des sondes anti-FoxJ1 au niveau du SVZ, du RMS et des bulbes olfactifs chez le rongeur. Ce modèle permit de démontrer par la suite l'importance de l'expression de FoxJ1 dans les cellules de la glie radiaire pour générer la population de cellules épendymaires et également une sous-population d'astrocytes au niveau des ventricules latéraux (Jacquet et al., 2009). Par la suite, cette construction du promoteur *FoxJ1* développée par Ostroski et al, fut réutilisée afin de générer un modèle transgénique inductible utilisant la technologie Cre-LoxP, la lignée hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP (Carlen et al., 2009; Meletis et al., 2008).

La séquence du promoteur de *FoxJ1* est identique, mais la séquence du gène rapporteur GFP a été remplacée par une séquence CreER<sup>T2</sup> codant pour une recombinaison chimérique Cre arborant un domaine muté du récepteur aux œstrogènes (ER). Quant au gène rapporteur YFP, il est sous la dépendance de l'expression du promoteur fort R26R inséré dans le locus ROSA26 et sa séquence est précédée d'un codon stop flanqué de sites LoxP. La particularité de ce modèle est que l'expression de ce gène rapporteur est sous la dépendance de l'excision du codon stop-LoxP par une recombinaison. L'activation du promoteur *FoxJ1* au sein de la cellule va entraîner l'expression et la synthèse spécifique de CreER<sup>T2</sup>. Une fois produite, la recombinaison reste cantonnée au niveau du cytoplasme où elle forme un complexe avec la protéine chaperonne

*Heat Shock Protein 90* (HSP90), l'empêchant d'aller dans le noyau pour exciser les séquences LoxP. La migration de Cre n'est rendue possible que par la fixation de la 4-hydroxytamoxifene (4-OHT) sur le récepteur aux œstrogènes ER<sup>T2</sup> chimériques insensibles aux œstrogènes endogènes. Ceci conduit à la rupture du complexe CreERT2/HSP90 et permet la migration de la recombinaise dans le noyau où elle excise les séquences loxP et ainsi libère l'expression de la YFP. Mais tout ce mécanisme n'est possible que par l'administration de Tamoxifene à l'animal, qui lui permet de synthétiser de la 4-hydroxytamoxifene (Feil et al., 2009). Ce modèle a permis de démontrer l'apparition des cellules épendymaires à E15,5 et également leur participation à la formation du canal central de la moelle spinale (Li et al., 2016b). De plus, il fut démontré que ces cellules épendymaires FoxJ1 du canal central participaient, après une lésion, à l'établissement de la cicatrice médullaire par une augmentation de leur prolifération et par la génération de nouveaux astrocytes (Barnabe-Heider et al., 2010; Johansson et al., 1999; Meletis et al., 2008). Ce même phénomène fut constaté à la suite d'une lésion dans le cortex où les cellules épendymaires FoxJ1 prolifèrent et génèrent des astrocytes et des neurones à la suite d'un accident vasculaire cérébral (Carlen et al., 2009). L'équipe démontra que le potentiel souche était restreint aux seules cellules épendymaires FoxJ1 dans la moelle qui génèrent des neurosphères (Barnabe-Heider et al., 2010; Meletis et al., 2008). Leur inhibition par le blocage de leur cycle cellulaire grâce au modèle murin Ras entraine une disparition de la cicatrice gliale au détriment d'une invasion massive de fibroblastes et de péricytes (Sabelstrom et al., 2013). Différentes études font état de problèmes quant à l'utilisation du système Cre-LoxP et surtout aux effets délétères du Tamoxifene (Forni et al., 2011; McLellan et al., 2017).

Le système de Cre-LoxP est un formidable outil dans le domaine de l'étude de la génomique et de la biologie cellulaire des mammifères. Depuis sa découverte en 1981 par Sternberg and Hamilton, le système cre-loxP a permis d'examiner les fonctions de gènes spécifiques dans des populations cellulaires aux origines tissulaires variées et dans différents contextes physiologiques (Sternberg and Hamilton, 1981; Sternberg et al., 1981). Tout ceci a débouché sur une amélioration profonde de nos connaissances fondamentales de la biologie des mammifères et mais également dans les mécanismes physiopathologiques. Ce système présente néanmoins quelques limitations quant à son utilisation dans l'étude d'expression génique. En effet, l'utilisation du Tamoxifene comme activateur de la recombinaise Cre nécessite de nombreuses précautions regardant son utilisation chez l'animal. Le Tamoxifene est une molécule antagoniste de l'œstrogène, développé dans l'années 60, dans le cadre du traitement du cancer du sein. Une fois dans l'organisme, le Tamoxifene est métabolisé au niveau du foie

par l'action du cytochrome P450 en 4-OHT et mais aussi en plusieurs métabolites, tel que le *N-desmethyltamoxifen*, l'*endoxifen* et le norendoxifen (Jordan, 2007). Bien que le 4-OHT soit le métabolite présentant le plus d'affinités avec le récepteur ER<sup>T2</sup>, certains de ces autres métabolites ont été décrits comme pouvant également interagir avec ce récepteur et donc, activer la recombinaison Cre chez la souris (Valny et al., 2016). La principale contrainte du Tamoxifene repose sur le temps de dégradation différentiel de ces différents métabolites chez la souris. En effet, il fut constaté au niveau du cerveau de souris, que l'effet du Tamoxifen persistait au minimum 8 jours par rapport à la date de la dernière injection (Valny et al., 2016). De plus, cette étude démontra des différences quant à la dégradation des métabolites en fonction de l'âge de l'animal, également quant à la dose de Tamoxifene administrée. La capacité à dégrader le tamoxifene diminue par rapport à l'âge de la souris et l'utilisation de forte quantité de Tamoxifen prolonge ce temps d'élimination des métabolites de l'organisme (Valny et al., 2016). Pour l'utilisation d'une lignée Cre-LoxP dans le cadre d'études du développement embryonnaire, certains scientifiques conseillent l'utilisation de la 4-OHT plutôt que du Tamoxifene, du fait de sa rapidité d'activation et de dégradation de la recombinaison (Felker et al., 2016). Dans le modèle hFoxJ1-CreERT2 ::YFP, nous avons respecté en concordance avec les travaux de Meletis, un délai de carence en Tamoxifene d'un minimum de 7 jours après la dernière injection avant d'utiliser les animaux. Meletis, dans son étude, justifie une dégradation du Tamoxifene et de la 4-OHT dans les 12 heures qui suivent la dernière injection. Mais afin d'être sûr de ne pas avoir d'effets secondaires du Tamoxifene, il applique un délai de carence de 6 jours avant d'utiliser l'animal (Meletis et al., 2008). Il confirme la spécificité de son modèle en démontrant une absence totale de recombinaison Cre dans le noyau des cellules recombinées 6 jours après la dernière injection (Meletis et al., 2008).

L'apparition en 2014 d'un nouveau modèle de souris transgéniques inductibles permettant l'observation des cellules épendymaires attira notre attention. En effet, l'intérêt de ce modèle FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> est de s'éloigner des contraintes liées à l'utilisation du promoteur humain de FoxJ1. Pour cela, Muthusamy et al insérèrent la séquence codante CreER<sup>T2</sup> par la technique du *knock-in* au sein de l'exon 2 du gène murin de *FoxJ1* (Muthusamy et al., 2014). Ils conservèrent l'insertion d'un rapporteur (tomato dans ce cas) au sein du locus Rosa26. Cette stratégie d'utiliser le promoteur endogène de *FoxJ1* comme initiateur de la transcription de CreER<sup>T2</sup> est très intéressante du point de la spécificité de l'expression de la construction. Ainsi, ce modèle permet de recombiner les cellules FoxJ1 positives en fonction de l'activation endogène du promoteur murin et non en fonction d'une possible activation non spécifique du

promoteur humain. Dans le but d'observer, le rôle de l'expression de FoxJ1 durant le développement embryonnaire chez la souris, nous avons utilisé au sein du laboratoire cette lignée FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>. Après administration par gavage des femelles au temps E10-11, E11-12, E13-14 et E15-16, comme réalisé précédemment avec la souris hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP et hFoxJ1::EGFP, nous avons constaté de façon surprenante une restriction de l'expression de FoxJ1 au seul canal central et à la plaque du plancher. De plus, la quantité de cellules recombinées était cinq fois inférieure à celle comptabilisée dans les autres modèles. L'analyse comparative du taux de prolifération de ces cellules recombinées au cours du développement chez des animaux FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> homozygotes, hétérozygotes ou sauvages, démontra une diminution de ce taux en corrélation avec le nombre d'allèles comportant la séquence CreER<sup>T2</sup>. Bien que ces différences, quant aux cellules recombinées, observées dans les différents modèles de souris Foxj1 disparaissent au moment de la naissance, ces résultats nous conduisirent à nous interroger sur ce modèle FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>. En effet, il semblerait que l'insertion de la séquence CreER<sup>T2</sup> dans l'exon 2 du gène *Foxj1* ne soit pas sans effet quant à son expression endogène au cours du développement. La présence de la séquence CreER<sup>T2</sup> dans le locus de *FoxJ1* s'apparenterait à une inhibition du gène. Ceci est cohérent avec les observations faites par Muthusamy dans son article. En effet, au moment de l'élaboration de son modèle, il avait constaté que la séquence introduite dans le génome de la souris se traduisait phénotypiquement chez les homozygotes par des effets similaires à ceux observés dans une lignée de souris FoxJ1 KO. Les FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> homozygotes présentaient des problèmes quant à l'emplacement des viscères dans l'abdomen et développaient des hydrocéphalies conduisant à la mort des souris au moment de la naissance (Muthusamy et al., 2014). Tous ces phénotypes sont typiques d'une altération de l'établissement du programme de ciliogenèse conduit par le gène *FoxJ1* au niveau des organes comportant des cellules ciliées motiles (Brody et al., 2000). Mais il défendit son modèle en indiquant que ces effets délétères disparaissaient chez les souris hétérozygotes dont le développement se déroulait normalement. Selon l'auteur, l'utilisation de souris FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> hétérozygotes est un formidable outil dans l'étude de l'activité transcriptionnelle de FoxJ1 au niveau de différents tissus, des mécanismes de différenciation des cellules FoxJ1 positives et dans la biologie de la formation des cils motiles (Muthusamy et al., 2014). Néanmoins, nous avons constaté au sein du laboratoire que même chez des souris hétérozygotes, des anomalies développementales demeuraient et ce même après la naissance. Nos résultats obtenus chez les souris hétérozygotes et homozygotes durant le développement ne sont pas cohérents avec ceux observés par les deux autres modèles de souris transgéniques pour le gène *FoxJ1*. L'absence de *FoxJ1* sur un ou deux allèles semble limiter la prolifération

et la migration des cellules progénitrices de la moelle spinale durant le développement. Ces résultats semblent confirmer les observations précédentes quant à l'importance de l'expression de FoxJ1 dans la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices durant le développement dans le cerveau. Une altération de son expression conduit à une dysgénésie des bulbes olfactifs après la naissance et des hydrocéphalies (Jacquet et al., 2011).

A suite de ces résultats, nous avons voulu évaluer l'effet d'une altération de l'expression de *FoxJ1* sur le potentiel souche de la moelle spinale décrit précédemment comme étant la spécificité des cellules épendymaires FoxJ1 positives (Barnabe-Heider et al., 2010; Meletis et al., 2008). L'analyse du nombre de premières neurosphères issues de moelle spinale saine des souris P10 et adultes FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> hétérozygotes démontre un taux de recombinaison nettement inférieur à celui observé chez les souris hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP. De façon plus surprenante, la délétion de *FoxJ1* sur un allèle diminue fondamentalement le nombre total de premières neurosphères obtenues en comparaison avec les souris hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP, mais surtout avec les souris sauvages. Ces résultats sont cohérents avec ceux publiés par Jacquet et al en 2011, où il montre que le nombre de neurosphères générés à partir du cerveau est dramatiquement diminué chez les souris *FoxJ1* KO à P0 et P21 (Jacquet et al., 2011). La capacité d'auto-renouvellement des moelles spinales des souris FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> est altérée par la présence de la séquence de CreERT2 au sein de l'exon 2 du gène *FoxJ1*. L'essai de différenciation de ces premières neurosphères démontre également des altérations quant à la proportion des types cellulaires générés après différenciation. En effet, une plus grande proportion de neurones Tuj1 positifs est générée chez les souris FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> hétérozygotes, au détriment de la proportion d'astrocytes (Sox9<sup>+</sup>) et d'oligodendrocytes (CNPase<sup>+</sup>) en comparaison avec les lignées sauvages ou hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP. Ceci semble démontrer que la modification du gène FoxJ1 pourrait avoir une influence sur la voie de différenciation des cellules progénitrices dans le SNC.

Le modèle FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> est décrit par ses créateurs comme étant physiologiquement normal quand la construction est présente seulement sur un seul allèle de l'animal (Muthusamy et al., 2014). Après une lésion médullaire, les cellules épendymaires du canal central exprimant le facteur FoxJ1, prolifèrent intensément et quittent le canal central pour se différencier en cellules gliales afin de participer à l'établissement de la cicatrice gliale (Barnabe-Heider et al., 2010; Li et al., 2016b; Meletis et al., 2008; Sabelstrom et al., 2013). La lésion médullaire conduit également à une augmentation de l'auto-renouvellement de ces cellules épendymaires FoxJ1 positives *in vitro*. L'analyse comparative de la réponse cellulaire

entre les modèles FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> et hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP après une lésion du *dorsal funiculus*, montre également de nombreuses différences. Comme décrit dans la littérature, les cellules épendymaires du canal central recombinaisons de la souris hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP, prolifèrent et migrent vers la lésion deux semaines après celle-ci (Barnabe-Heider et al., 2010; Li et al., 2016b; Meletis et al., 2008; Sabelstrom et al., 2013). Bien que présentant des taux de recombinaison des cellules épendymaires similaires sans lésion, aux hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP, seules quelques cellules épendymaires montrent des signes de migration à deux semaines après la lésion chez les FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>. Ces résultats sont très intéressants et ils sont en adéquation avec une étude surprenante sortie en 2017. En effet, Ren et al démontrent par l'utilisation du modèle FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> que la participation des cellules épendymaires à la formation des nouvelles cellules après lésion médullaire est minimale, locale et dépendante de la lésion. De plus, ils affirment que les cellules épendymaires ne constituent pas les cellules souches de la moelle et donc ne permettent pas la génération d'astrocytes hyporéactifs au niveau de la cicatrice gliale (Ren et al., 2017). Cette étude est très importante, car elle remettrait en cause plus de dix années d'études sur le potentiel souche des cellules épendymaires et leur rôle majeur dans la lésion médullaire. Dans cet article, leurs résultats sont similaires à ceux que nous avons obtenus chez les souris FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>, à savoir une faible proportion de cellules épendymaires recombinaisons, migrant vers le site de lésion. Néanmoins, des interrogations subsistent à la lecture de cet article. En effet, les auteurs ne mentionnent à aucun moment les contraintes rencontrées quant à l'utilisation de cette lignée. A aucun moment, l'effet de l'insertion de la séquence CreER<sup>T2</sup> dans l'exon 2 du gène *FoxJ1* endogène, (décrit par ces créateurs également cosignataires de l'article) pouvant conduire à un phénotype FoxJ1 KO-like, ayant des conséquences sur le comportement cellulaire de la souris, n'est abordé par les auteurs. Les auteurs justifient la véracité de leurs résultats novateurs quant à la spécificité de l'expression du gène rapporteur Tomato par le promoteur endogène de FoxJ1 et réfutent les résultats antérieurs obtenus avec la lignée hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP par un manque de spécificité du promoteur humain (Ren et al., 2017). Ils s'appuient sur les observations faites par d'autres équipes sur la réactivité des cellules épendymaires après lésion du SNC qui, à vrai dire, soulèvent quelques interrogations (Sachewsky et al., 2014; Zukor et al., 2013). Zukor et al observèrent après un écrasement médullaire en T8 chez la même souris Nestin-CreER, identique à celle employée par Meletis, une faible proportion de dérivés des cellules Nestine présentes au niveau de la lésion 1 mois après celle-ci (Zukor et al., 2013). Néanmoins, ils expliquent la divergence des résultats obtenus du fait de la nature de la lésion employée dans son étude et celle de Méletis, ne conduisant pas aux mêmes réactions physiopathologiques.

Quant à Sachewsky et al, ils démontrent la présence d'une population primitive de NSC au niveau du cerveau, qui donne naissance à d'autres NSC réagissant en cas de lésion et n'exprimant pas les marqueurs spécifiques des cellules épendymaires décrits précédemment (Carlen et al., 2009; Sachewsky et al., 2014). Ces travaux remettent donc en cause le potentiel souche des cellules épendymaires.

Or pour confirmer qu'une cellule présente des propriétés souches, la réalisation de culture de neurosphère *in vitro* à partir d'un tissu est la méthode unanimement employée. Barnabé-Heider avait confirmé par cette technique, la restriction du potentiel souche neural aux seules cellules épendymaires de la moelle spinale, en réalisant différentes cultures de neurosphères issues de trois lignées transgéniques spécifiques d'un type cellulaire peuplant la moelle : la lignée hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP (spécifique des cellules épendymaires), la lignée Cx30-Cre (spécifique du type astrocytaire) et la lignée Olig2-Cre (spécifique du type oligodendrocytaire) (Barnabe-Heider et al., 2010). Jacquet utilisa également cette technique afin de prouver l'importance du gène *FoxJ1* dans la prolifération des progéniteurs neuraux issus du cortex (Jacquet et al., 2011). Étonnement, Ren, dans son article sur la participation des cellules épendymaires à la formation des nouvelles cellules consécutives à une lésion médullaire grâce à cette nouvelle lignée FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>, n'a pas réalisé ce genre de test (Ren et al., 2017). À l'heure actuelle, aucune étude ne fait état du profil souche des moelles spinales issues des souris FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> après lésion. Nous avons vu, et son créateur le confirme, que l'insertion de la séquence CreERT2 dans le locus de *FoxJ1* conduit à des altérations de la prolifération et de la migration des cellules épendymaires *in vivo* et *in vitro*, similaire à celle observée dans des souris FoxJ1 KO (Muthusamy et al., 2014). À la vue de ces résultats, nous pouvons nous interroger sur l'effet de cette construction sur le potentiel souche après une lésion. Nous avons constaté que la quantité de premières neurosphères générées par les moelles spinales des souris FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> était nettement inférieure à celle générée par les moelles spinales des souris hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP. Mais surtout, comme précédemment, la comparaison avec des souris sauvages démontre que basiquement, la délétion de *FoxJ1* sur un allèle modifie le potentiel souche des moelles spinales après une lésion médullaire. La différenciation de ces premières neurosphères confirme également une altération de la voie de différenciation des neurosphères issues de souris FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup>, qui génèrent plus de neurones.

En conclusion, nous avons démontré par l'utilisation de deux modèles de souris transgéniques que, le gène *FoxJ1* était exprimé très tôt durant le développement au niveau de

la moelle spinale. Son expression transitoire est importante dans la détermination des voies de différenciation empruntées par les différentes cellules progénitrices présentes dans la moelle au cours de la neurogenèse et la gliogenèse. L'utilisation de la lignée FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> a permis de constater qu'une altération du gène *FoxJ1* sur au moins un allèle entraîne des perturbations dans la prolifération des progéniteurs embryonnaires, mais également sur les propriétés souches de la moelle spinale. La souris FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> démontre également que l'intégrité du gène *FoxJ1* quant à la réponse physiologique des cellules épendymaires de la moelle spinale après une lésion médullaire est nécessaire. Les lignées hFoxJ1::EGFP et hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP, qui utilisent la séquence du promoteur humain de *FoxJ1*, souffrent de nombreuses contraintes quant à leur utilisation dans l'étude de FoxJ1. Elles ne représentent pas le meilleur modèle, surtout durant le développement et nécessitent une optimisation et la mise en place de contrôles afin de valider avec certitude les résultats observés. Ces modèles ont cependant démontré, malgré une insertion aléatoire de la séquence hFoxJ1 dans le génome des souris, que celle-ci n'entraînait pas d'altération du gène *FoxJ1* murin ou des propriétés souches du tissu nerveux. A l'avenir, l'étude de l'expression du gène *FoxJ1* dans les cellules épendymaires nécessite la réalisation ou l'optimisation des modèles murins, afin de garantir une spécificité quant à l'expression du gène d'intérêt, tout en garantissant une non altération des fonctions physiologiques de l'animal.

## Seconde partie

---



## II. Discussion article II

La seconde partie de mes travaux de thèse s'inscrit directement dans la continuité des projets menés au sein du laboratoire. Depuis plusieurs années, le laboratoire GRHV EA3830 de l'université de Rouen s'est attelé à l'étude des réhabilitations des lésions du système nerveux périphérique et central. L'objectif du laboratoire était de trouver de nouvelles thérapies cellulaires capables d'améliorer de manière significative les atteintes neurologiques inhérentes aux lésions du SNP. Pour cela, notre laboratoire décida de se concentrer sur l'utilisation des propriétés neurogéniques des CGOs afin d'améliorer la réhabilitation des lésions périphériques. Après plusieurs années de travail, il fut démontré l'effet bénéfique de l'utilisation de CGO bulbaires plutôt qu'issues de la muqueuse olfactive dans différents modèles expérimentaux de lésions du nerf périphérique (Guerout et al., 2011; Guerout et al., 2014b; Paviot et al., 2011). Bien que contraignante d'un point de vue clinique, l'utilisation des CGOs bulbaires montrent de formidables opportunités thérapeutiques pour le traitement des lésions nerveuses. Ces propriétés peuvent s'expliquer par leur hétérogénéité cellulaire au sein des bulbes olfactifs. En effet, notre laboratoire démontra pour la première fois, l'existence de sous-populations de CGO au niveau des bulbes olfactifs, jouant des fonctions variées durant le mécanisme de la neurogenèse du système olfactif chez le rongeur. Ces travaux constituent une partie de mes résultats de master et de la première moitié de ma thèse, qui débouchèrent sur leur publication en 2012 dans la revue *GLIA* (Honore et al., 2012) (**Annexe I**). Nous décidâmes d'appliquer ces résultats dans le cadre des lésions médullaires. Comme précédemment, l'utilisation d'une culture primaire de CGOs bulbaires dans un modèle murin de lésion médullaire démontra un bénéfice supérieur des cultures de bulbes olfactifs par rapport à des cultures primaires de muqueuses olfactives d'un point de vue neuro régénératif. Ces travaux débouchèrent également sur une publication dans la revue *PlosOne* en 2013 (Mayeur et al., 2013) (**Annexe II**).

Mais de nombreuses questions restaient en suspens. En effet, nombreuses sont les publications faisant état d'une amélioration des signes cliniques consécutifs à l'utilisation de CGOs dans le cadre des lésions médullaires. La greffe de CGOs permet, en effet, la stimulation d'une repousse axonale, de l'établissement d'une néo-angiogenèse au niveau du site de lésion, d'une remyélinisation axonale et d'une préservation cellulaire au niveau du tissu lésé par leur action immuno-modulatrice (Franssen et al., 2007). Tous ces mécanismes permettent d'observer, à terme, une amélioration globale du comportement de l'animal après traitement. Même si ces résultats sont significatifs par rapport à des animaux non traités, ces effets

bénéfiques restent dépendants du type de lésion et sont généralement insuffisants pour conduire à une réhabilitation pleinement fonctionnelle.

Les lésions médullaires sont des atteintes de la moelle épinière fréquentes chez l'Homme, surtout dans les pays industrialisés. Elles représentent un enjeu majeur pour ces sociétés, car les avancées dans la prise en charge clinique de ces patients ont permis d'améliorer significativement l'espérance de vie de ces personnes, sans toutefois conduire à une récupération complète des fonctions neurologiques.

L'analyse bibliographique des recherches menées sur le traitement des lésions médullaires est multiple et fait appel à des domaines d'activité très variés. Les traitements par thérapies cellulaires en font l'un des domaines d'étude les plus importants. De nombreuses thérapies cellulaires ont été développées et beaucoup ont pu démontrer des résultats probants, dont notamment l'utilisation de CGOs. Malheureusement, jusqu'à aujourd'hui, la reproductibilité de ces protocoles est rendue difficile du fait de la variabilité des modèles lésionnels utilisés. Qui plus est, peu de travaux se sont attelés à la compréhension des mécanismes induits suite aux transplantations cellulaires. En effet, la difficulté de trouver des thérapies cellulaires efficaces repose en partie sur la complexité même de la lésion médullaire. Chaque lésion est unique et conduit à un *timing* de cascades réactionnelles physiopathologiques qui lui est propre. De plus, à la lumière de ces données, nous constatâmes que la plupart de ces études ainsi que les nôtres, se concentraient sur l'évaluation des effets neurorégénératifs ou immunomodulateurs engendrés par la transplantation cellulaire après lésion médullaire. Or, peu d'études s'attardent sur l'analyse de la réactivité des cellules endogènes et leur prolifération après une lésion médullaire.

Afin d'étudier l'effet des thérapies cellulaires sur les cellules épendymaires de la moelle spinale, nous avons choisi d'utiliser une culture primaire de bulbes olfactifs. C'est dans les bulbes olfactifs que se trouve la plus grande portion de CGOs de l'organisme, et ce, chez de nombreuses espèces (Lazzari et al., 2014). En effet, nous avons montré précédemment dans le cadre des lésions médullaires que, la transplantation de CGOs issues des bulbes olfactifs avec leur microenvironnement améliorait significativement la récupération des fonctions motrices par une diminution de la réactivité astrocytaire et une augmentation de la repousse axonale (Mayeur et al., 2013) (**Annexe II**). A l'inverse, nous avons établi que ces effets étaient moindres dès lors que les CGOs des bulbes olfactifs étaient isolés de leur microenvironnement après purification par la méthode de Nash. Une culture primaire de bulbes olfactifs contient de grandes proportions de CGOs mais également des fibroblastes (Nash et al., 2001). Plusieurs

études ont démontré l'intérêt de ces fibroblastes sur les effets bénéfiques des CGOs lorsqu'ils sont transplantés après LMT. Il fut démontré que l'addition de fibroblastes méningés bulbaires à une culture purifiée de CGOs permettait d'améliorer significativement la remyélinisation axonale par les CGOs dans le SNC (Lakatos et al., 2003b). De plus, une étude clinique sur la transplantation cellulaire chez l'Homme montre des résultats spectaculaires, via l'utilisation d'une culture primaire de bulbes olfactifs couplée à une greffe de nerfs périphériques (Tabakow et al., 2014). L'utilisation de CGOs issues de la muqueuse olfactive est plus aisée et optimale pour l'élaboration d'une greffe autologue de CGOs en clinique humaine (Feron et al., 2005). Cependant, la muqueuse contient des proportions moindres de CGOs et la caractérisation précise des différentes populations de cellules composant la muqueuse olfactive est encore controversée. Notre étude montre d'ailleurs que la transplantation de cultures primaires de muqueuse olfactive donnait des résultats moins satisfaisants dès lors que les cellules étaient transplantées dans la moelle spinale après lésion (Mayeur et al., 2013) (**Annexe II**). Certaines équipes ont essayé de transplanter des cultures primaires de muqueuse olfactive ou directement des explants de muqueuse dans des lésions médullaires chez l'Homme. Les résultats obtenus furent peu concluants et certains d'entre eux rapportèrent des effets délétères de la transplantation, comme l'apparition de masses au niveau de la lésion, constituées de cellules olfactives (Dlouhy et al., 2014; Tabakow et al., 2013). Une méta-analyse de la bibliographie concernant l'utilisation des CGOs dans le cadre des lésions médullaires, confirma ce choix de l'utilisation des CGOs bulbaire quant à l'étude de leurs effets sur la population endogène de la moelle spinale (Watzlawick et al., 2016). En effet, c'est grâce à cette étude que les différents paramètres de notre protocole de transplantation furent établis. Dans cet article, les auteurs définissent les paramètres les plus significatifs quant à l'élaboration d'un protocole de transplantation en fonction des résultats obtenus en récupération fonctionnelle chez l'animal, par une technique de méta-régression de différentes données publiées sur les CGOs. Nous avons donc choisi de transplanter 100 000 cellules au total, en deux points d'injection de part et d'autre de la lésion, aussitôt après la lésion. La plupart des travaux réalisés sur l'étude du comportement des cellules épendymaires après une lésion médullaire, furent effectués à partir d'une lésion dorsale de la moelle spinale (Barnabe-Heider et al., 2010; Goritz et al., 2011; Li et al., 2016b; Meletis et al., 2008; Sabelstrom et al., 2013). Il est vrai que le type de lésion médullaire cause de nombreux débats quant à l'interprétation de la réactivité des cellules épendymaires et de leur participation au processus cicatriciel après lésion. Sofroniew, dans son étude sur les cellules épendymaires chez la souris FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> reproche que les données obtenues précédemment sur les cellules épendymaires avec une hémisection dorsale de la

moelle spinale soient extrapolées et ne reflètent pas la réalité des mécanismes cellulaires mis en place après une LMT, surtout chez l'Homme (Ren et al., 2017). Il considère que ce modèle de lésion médullaire ne constitue pas un modèle fiable quant à l'interprétation des mécanismes cellulaires activés par les LMT. Mais le but de notre étude n'était pas d'évaluer le potentiel thérapeutique de transplantations cellulaires sur la réhabilitation après lésion médullaire. La quantité de données sur l'effet de la transplantation des CGOs après lésion médullaire est suffisante et démontre l'apport bénéfique de ces cellules quant à la réhabilitation des fonctions motrices. Nous avons pour objectif d'étudier, pour la première fois, l'action du greffon sur les cellules souches endogènes et sur les différentes cellules générées après une lésion médullaire. Par conséquent, afin de pouvoir comparer nos résultats avec ceux de la littérature, nous avons choisi d'effectuer une hémisection dorsale de la moelle spinale sans endommager le canal central. Une hémisection permet ainsi d'endommager simultanément la substance grise et la substance blanche de la moelle spinale, mais également d'entraîner une rupture de la méninge, donnant une vue d'ensemble des différentes réactions cellulaires endogènes opérantes en fonction de leur localisation. Cette lésion a également pour avantage de n'endommager que la partie sensitive de la moelle spinale tout en épargnant la partie motrice, ce qui éthiquement est plus convenable pour l'animal, surtout pour les groupes étudiés durant de longues semaines. Il serait néanmoins intéressant, à la suite de ce projet, de réaliser ces mêmes analyses dans un modèle beaucoup proche de la clinique humaine, comme un modèle de contusion spinale. Ceci permettrait de confirmer les différents résultats obtenus par l'hémisection dorsale afin d'expliquer les mécanismes cellulaires déclenchés par les lésions médullaires et par la transplantation cellulaire.

### **Effet des CGOs bulbaire sur cellules épendymaires**

Dans l'article II, nous décrivons pour la première fois, l'effet d'une transplantation de CGOs bulbaires sur les cellules épendymaires du canal central et leur progénie après une lésion médullaire. En condition physiologique, il a été démontré que les cellules épendymaires bordant le canal central, ne prolifèrent pas ou peu (Barnabe-Heider et al., 2010; Hamilton et al., 2009). Il est suspecté que ces rares cellules prolifératives servent principalement à régénérer le *pool* de cellules autour du canal central (Hamilton et al., 2009). Dans notre étude, nous avons constaté le même phénomène. La transplantation cellulaire n'entraîne pas d'augmentation significative du taux de prolifération des cellules épendymaires chez la souris hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP *in vivo* en condition physiologique. Il en est de même pour le groupe « contrôle », ce qui démontre que

la composition du milieu de culture des bCGOs, le DF10S contenant du SVF, n'engendre aucune réactivité cellulaire autour du canal central. Plusieurs articles décrivent (indépendamment du type de lésion) une augmentation du taux de prolifération autour du canal central après une lésion médullaire (Barnabe-Heider et al., 2010; Horky et al., 2006; Johansson et al., 1999; Kojima and Tator, 2002; Li et al., 2016b; Meletis et al., 2008). Selon certaines données, ce taux augmente jusqu'à 50 fois plus par rapport aux conditions physiologiques (Meletis et al., 2008). *In vitro*, la lésion conduit à une augmentation des capacités d'auto-renouvellement des cellules épendymaires, qui se traduit par une élévation du nombre de premières neurosphères obtenues à partir des moelles lésées. Notre étude démontre que la transplantation de bCGOs permet d'augmenter le taux de prolifération des cellules épendymaires *in vivo* après une lésion. De plus, la mise en culture de ces moelles lésées transplantées démontre également une augmentation significative du nombre de première et de seconde neurosphères obtenues en comparaison avec des souris contrôles. La transplantation de CGOs après une lésion semble donc agir directement sur les cellules épendymaires. Les mécanismes exacts, responsables de l'activation de la prolifération des cellules épendymaires, après une lésion médullaire, restent encore méconnus. Selon certaines études, la cause probable de l'augmentation du taux de prolifération autour du canal central pourrait provenir des facteurs sécrétés par les cellules endogènes activées par la lésion, tels que les astrocytes et les cellules du système immunitaire. La réponse des cellules du système immunitaire pourrait être à l'origine de cette activation des cellules épendymaires. En effet, dans une lésion médullaire traumatique, il y a une activation précoce et intense des cellules immunitaires résidentes et une invasion massive des cellules de la périphérie du fait de la rupture de la barrière hémato-médullaire. Ces cellules produisent en grande quantité des cytokines pro- et anti-inflammatoires (Pineau and Lacroix, 2007). Différentes études ont montré que l'activation des cellules immunitaires pouvait influencer négativement ou positivement la survie des cellules souches, leur auto-renouvellement, leur migration et leur prolifération (Qin et al., 2015). En effet, il fut démontré, dans un modèle d'ischémie cérébrale par occlusion de l'artère cérébrale moyenne, qu'une inhibition des macrophages par traitement immunosuppresseur permettait d'augmenter la population de nouveaux neurones observés au niveau de l'hippocampe (Liu et al., 2007). De plus, l'inhibition du récepteur au TNF $\alpha$  chez la souris conduit à une élévation significative de la prolifération cellulaire au niveau du gyrus dentelé et à un accroissement du nombre de nouveaux neurones au niveau de la zone granulaire (Iosif et al., 2006). Il semblerait donc que certaines cellules ou facteurs produits par les cellules immunitaires du SNC inhibent la réactivité des cellules souches endogènes. Mais à l'inverse, certaines données montrent que les

cellules immunitaires peuvent, sous certaines conditions, permettre l'activation, la prolifération et la migration des cellules souches endogènes (Butovsky et al., 2006; Kang and Kang, 2008; Yaguchi et al., 2008). Il fut démontré que les cellules microgliales et leur milieu conditionné permettaient *in vitro* d'augmenter la prolifération des cellules souches neurales de la SVZ après lésion cérébrale traumatique (Deierborg et al., 2010). Cette étude montre qu'une lésion cérébrale entraîne une activation des cellules microgliales, qui vont conditionner les cellules de la SVZ à proliférer vigoureusement une fois en culture. De plus, la simple adjonction de milieu conditionné de cellules microgliales activées permet d'augmenter la quantité de neurosphères obtenues à partir de la SVZ d'un cerveau sain. Ces observations furent également décrites dans d'autres travaux (Aarum et al., 2003; Walton et al., 2006). D'autres études ont d'ailleurs démontré qu'une inflammation aigüe était indispensable et suffisante pour activer les cellules souches endogènes chez le zebrafish (Becker and Becker, 2001; Kyritsis et al., 2012).

Le type de lésion semble également jouer un rôle important quant à l'activation de la prolifération des cellules du canal central. Une étude comparative de la prolifération cellulaire autour du canal central entre un modèle de contusion médullaire et deux modèles de démyélinisation chronique par activation du système immunitaire, a mis en évidence des différences quant à la réactivité des cellules épendymaires chez la souris. Cette étude montre que les cellules épendymaires prolifèrent seulement en réponse à une lésion traumatique aigüe du tissu nerveux et non à une démyélinisation axonale induite par une réaction inflammatoire (Lacroix et al., 2014). Lacroix, dans son article explique ce phénomène par des différences quant à la réponse astrocytaire engendrée par la lésion et également par les facteurs produits par ces cellules durant la période qui suit la lésion. En effet, les astrocytes réactifs ne permettent pas seulement la formation de la cicatrice gliale, mais ils participent également au nettoyage des débris, des molécules neurotoxiques (glutamate) et des ions (potassium). Ils produisent également de nombreux facteurs trophiques comme NT-3, IGF, GDNF, NGF et  $\beta$ FGF ce qui permet de stimuler la revascularisation, le rétablissement de la barrière hémato-médullaire et donc de limiter la propagation de l'inflammation (Gregoire et al., 2015). Ces facteurs produits par les astrocytes réactifs pourraient donc permettre de stimuler l'activation des cellules épendymaires après lésion médullaire. Dans le cadre des modèles de démyélinisation, cette réponse astrocytaire est plus limitée, ce qui pourrait expliquer l'absence de réactivité observée chez les cellules épendymaires. Ce même phénomène fut constaté dans le cerveau où seule une lésion de type invasive, comme l'insertion d'une aiguille, une incision tissulaire au laser ou une ischémie cérébrale entraîne une réactivité des astrocytes corticaux (Sirko et al., 2013). Dans

cette étude, il fut démontré que cette activation était induite par la présence du facteur Shh dans le liquide cébrospinal dont la concentration augmente après une lésion invasive. Ces études laissent à penser que les cellules souches neurales deviennent réactives après une lésion du fait de leurs interactions avec les éléments qui les entourent. En effet, de par leur contact intime avec le liquide cébro-spinal, les cellules épendymaires peuvent être sensibles aux nombreuses molécules circulant dans ce liquide après une lésion. L'identification de l'expression de certains récepteurs purinergiques, comme P2X7 au niveau des cellules épendymaires du ventricule latéral pourrait être responsable de leur activation par l'influx de calcium extracellulaire libéré durant une lésion traumatique (Genzen et al., 2009). De plus, il fut démontré récemment, au niveau du cerveau, après une ischémie, que les astrocytes pouvaient activer les cellules souches de la SVZ et leur prolifération, par l'intermédiaire d'un signal sous la forme de vagues calciques (Kraft et al., 2017). On note également la présence de certains récepteurs TLR au niveau de la SVZ, qui furent décrits comme pouvant influencer la neurogenèse au niveau du cerveau (Carpentier and Palmer, 2009; Rolls et al., 2007).

Etonnement, durant notre étude, nous avons également constaté que les bCGO augmentent le potentiel souche endogène *in vitro* et ce, même en l'absence de lésion. En effet, le nombre de premières neurosphères générées était significativement supérieur à celui d'une moelle spinale saine et d'un niveau comparable à celui obtenu après une lésion médullaire. Dans ce cas de figure, la réactivité astrocytaire ou du système immunitaire ne peut expliquer cette augmentation de l'activité des cellules épendymaires *in vitro* du fait de l'absence de lésion. Il semblerait donc que les cellules présentes dans la culture primaire de bulbes olfactifs entraînent un conditionnement des cellules épendymaires par la sécrétion de facteurs mimant les effets d'une lésion médullaire. Dans notre étude, nous n'avons constaté aucune migration des CGOs au sein des moelles spinales lésées vers le site de lésion comme précédemment décrit (Khankan et al., 2016). Les moelles spinales utilisées pour la réalisation des cultures, ont été en présence de CGOs pendant une semaine uniquement, ce qui réduit encore l'hypothèse d'une interaction cellulaire entre les cellules du canal central et les CGOs transplantées. Il semblerait donc que l'action qu'exercent les CGOs soit due à la sécrétion de facteurs. Depuis de nombreuses années, un très grand nombre de publications fait l'état des propriétés bénéfiques des facteurs produits par les CGOs dans différents modèles pathologiques du système nerveux. En effet, les CGOs produisent de grandes variétés de facteurs de croissance, comme le NT-3, le BDNF, le NGF, le CNTF, le GDNF (Lipson et al., 2003; Woodhall et al., 2001). Il existe cependant peu d'études se concentrant sur l'effet direct des CGOs sur les cellules souches

neurales et les résultats de ces dernières sont parfois contradictoires. En effet, l'étude de Zhang montre que le milieu conditionné permet de maintenir les cellules souches dans un état indifférencié (par le biais de l'activation de Notch) et permet une augmentation de la prolifération (Zhang et al., 2008). Alors qu'à l'inverse, Sethi montre une inhibition *in vitro* de la prolifération cellulaire par les CGOs et leur milieu conditionné (Sethi et al., 2014). Ceci peut être dû au fait de l'hétérogénéité même des cultures de CGOs utilisées. En effet, de nombreuses équipes utilisent des cultures purifiées de CGOs dont les méthodes de purification diffèrent, ce qui peut modifier le type de facteurs produits par les cellules. Dans notre étude, nous avons utilisé une culture primaire de bulbes olfactifs. Bien que les CGOs soient la population majoritaire, on ne peut écarter l'effet des fibroblastes méningés présents dans la culture. Il fut constaté que les fibroblastes présents dans les cultures primaires de bulbes olfactifs pouvaient produire également du bFGF *in vitro*, qui participerait à la prolifération des CGOs au niveau des bulbes olfactifs et rentrerait dans la composition du milieu de culture des neurosphères (Chuah and Teague, 1999; Yui et al., 2011). Il serait donc intéressant, à la suite de ces travaux, d'analyser les différents types de facteurs présents dans le milieu de culture et d'identifier les protéines sécrétées par les cellules de la culture primaire de bulbes olfactifs. Ceci permettrait de mieux caractériser les facteurs qui permettent la stimulation des cellules épendymaires après une lésion médullaire chez la souris.

Nos travaux montrent également que la transplantation de bCGOs modifie la voie de différenciation des cellules épendymaires après une lésion médullaire *in vivo* et *in vitro*. En effet, nous avons constaté que les premières neurosphères ayant reçues des CGOs génèrent des quantités plus importantes de neurones Tuj1+ et ce, même en l'absence de lésion. La transplantation de CGOs dans la moelle semble agir sur le devenir des cellules souches endogènes vers une différenciation en type neuronal *in vitro*. Ces résultats sont très intéressants car ils démontreraient que la transplantation cellulaire influencerait directement la voie de différenciation des cellules souches endogènes vers un type neuronal. Ces résultats sont cohérents avec des études qui démontrent que le milieu conditionné de CGOs favorise la différenciation des cellules souches vers un type préférentiellement neuronal (Sethi et al., 2014; Wang et al., 2010). Les auteurs expliquent cet effet par la possible sécrétion par les CGOs de facteurs solubles, comme SPARC, Shh, MMP2 et d'autres molécules dans le milieu extracellulaire. Ces facteurs ont été décrits précédemment comme pouvant stimuler le mécanisme de différenciation des cellules souches neurales vers un type neuronal et ils

permettent également d'augmenter l'extension neuritique des neurones en culture (Au et al., 2007; Sethi et al., 2014; Wang et al., 2006; Zhang et al., 2006).

Deux semaines après la transplantation, nous avons également constaté *in vivo*, que les cellules épendymaires se différenciaient préférentiellement en astrocytes lorsqu'elles sont en présence bCGO après lésion médullaire. En effet, le nombre d'astrocytes issus des cellules épendymaires chez la souris hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP est plus de deux fois supérieur à celui dénombré chez les souris du groupe contrôle. Très précocement, la proportion d'astrocytes issus des cellules FoxJ1 est significativement augmentée par la présence de CGOs par rapport au groupe contrôle. À 14 semaines, les proportions d'astrocytes issues de cellules épendymaires sont similaires entre les deux groupes. Dès la seconde semaine, les souris possèdent déjà leur quantité maximale d'astrocytes issus des cellules épendymaires au niveau du site de lésion. Il fut démontré précédemment qu'après une LMT, les cellules épendymaires se différencient majoritairement en astrocytes afin de participer à la cicatrice médullaire (Barnabe-Heider et al., 2010; Li et al., 2016b; Meletis et al., 2008; Sabelstrom et al., 2013). Nous constatons ici que la greffe de CGOs ne modifie pas le programme d'astrogenèse opéré chez les cellules épendymaires, mais elle la déclenche beaucoup plus précocement. Ceci pourrait s'expliquer par la production de certains facteurs décrits précédemment comme stimulant la prolifération astrocytaires. O'Toole montre une augmentation de la prolifération des astrocytes corticaux en co-culture avec des CGOs et ce, même quand les cellules sont séparées par une membrane poreuse (O'Toole et al., 2007). Il explique ce phénomène par la possible expression de bFGF et PDGF-B par les CGOs, connue comme étant mitogène pour les astrocytes (Biesiada et al., 1996; Luo and Miller, 1999). Il est difficile d'expliquer par quel type de mécanismes et sous l'influence de quel facteur les cellules épendymaires se différencient préférentiellement vers un type astrocytaire après une lésion, du fait de la grande variété de facteurs produits durant cette période. L'analyse par PCR quantitative de gènes connus comme étant promoteurs de la repousse axonale, montre chez la souris hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-Rasless, une augmentation de la quantité d'ARNm codant pour le facteur CNTF chez les souris transplantées avec des CGOs. Le CNTF est un facteur de la famille des interleukines 6 (IL-6) décrit dans la littérature comme étant surexprimé par les astrocytes après lésion médullaire (Albrecht et al., 2002). Ce facteur est également produit par les CGOs au niveau des bulbes olfactifs (Langenhan 2006 Lipson 2003). Il fut démontré précédemment que l'adjonction de facteurs tels que BMP2, de l'hormone thyroïdienne 3 et de CNTF à des cultures de cellules souches neurales postnatales ou adultes issues induisait leur différenciation en astrocytes GFAP positifs (Johe et al., 1996; Okano-

Uchida et al., 2013). Bien que les facteurs décrits pour induire une différenciation des cellules souches neurales vers un type astrocytaire soient variés, il semble que le CNTF soit le facteur indispensable à cette différenciation. Il fut d'ailleurs démontré que le répresseur de transcription N-CoR (*nuclear receptor co-repressor 1*) maintient les NSC à l'état indifférencié quand il se localise dans le noyau, mais en présence de CNTF, il se retrouve au niveau du cytoplasme, ce qui active la voie AKT1 et permet la différenciation vers un type astrocytaire (Hermanson et al., 2002; Setoguchi and Kondo, 2004). Beaucoup d'hypothèses peuvent être formulées quant aux mécanismes d'induction des voies de différenciation des cellules souches neurales *in vivo*. Ceci est en partie dû à la complexité des facteurs produits après une lésion médullaire par les nombreux types cellulaires présents au sein du tissu nerveux. Néanmoins, une certitude demeure quant à l'effet direct de l'environnement tissulaire sur les cellules souches endogènes après lésion médullaire. Il fut démontré que la transplantation de NSC issues d'un tissu nerveux sain au sein d'une moelle spinale lésée conduisait inévitablement à une différenciation de cellules vers un type principalement glial et ce même au niveau du cerveau après lésion (Lukovic et al., 2015; Pallini et al., 2005). En effet, la transplantation de neuroblastes issues de la SVZ, qui de manière physiologique se différencient en nouveaux neurones fonctionnels au sein du bulbe olfactif, entraîne la production d'astrocytes lorsque ces neuroblastes sont implantés dans le parenchyme cérébral lésé d'un animal adulte (Dimou and Gotz, 2014; Seidenfaden et al., 2006; Shihabuddin et al., 2000). L'environnement cicatriciel semble être un élément déterminant dans le succès d'une thérapie cellulaire.

### **Modification de l'environnement médullaire après transplantation de CGOs bulbaires**

Durant notre étude, nous avons également constaté une modification de l'environnement cicatriciel après lésion médullaire par la transplantation de bCGOs. Il est maintenant bien établi dans la littérature que les CGOs permettent une amélioration des conséquences du traumatisme primaire lorsqu'elles sont présentes dans une moelle lésée. Les CGOs ne sont pas seulement décrites comme activant la repousse axonale au niveau de la moelle spinale lésée, mais elles possèdent également des fonctions immuno-régulatrices. Au niveau du système olfactif, les CGOs permettent la phagocytose des débris des neurones olfactifs lors du renouvellement de ceux-ci. Les macrophages sont très largement exclus du système olfactif. Donc, même en cas de lésion importante des nerfs olfactifs, ce sont les CGOs qui éliminent, par phagocytose, les différents débris cellulaires présents le long du système olfactif (Nazareth et al., 2015). Les CGOs assurent également l'élimination des différentes bactéries pouvant envahir le système

olfactif afin d'éviter toute invasion du SNC via l'expression de certains récepteurs TLR, tel que TLR4 (Leung et al., 2008; Panni et al., 2013). Au sein du système olfactif, les CGOs assurent la clairance des agents pathogènes présents au niveau du SNP afin d'éviter leur passage jusqu'au SNC. Ces cellules n'ont pas seulement pour fonction de phagocyter les débris présents, mais elles sont également capables d'exclure l'invasion des cellules immunitaires après une lésion médullaire. Après une lésion médullaire, la réponse inflammatoire et les lésions secondaires exacerbent les dommages tissulaires et augmentent au cours du temps la zone lésionnelle. Les CGOs sont connues pour leur effet immuno-modulateur du fait de l'expression de différentes chimiokines et de leurs récepteurs (Franssen et al., 2008; Pastrana et al., 2007; Vincent et al., 2005a). Il fut démontré par *microarray* l'expression par les CGOs des chimiokines comme CXCL1, CCL2, CX3CL1, CXCL12 et ainsi que de leurs récepteurs, connus pour faciliter le recrutement des neutrophiles et de différents leucocytes (Vincent et al., 2005a). Nous avons d'ailleurs démontré au niveau des bulbes olfactifs, la surexpression par une sous-population de CGOs, de certains gènes impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire, comme *Aif1*, *Arrb2*, *Sirpa* (CD172a), *Timp2*, *Cfh*, and *Fcgr2a* (CD32) (Honore et al., 2012) (**Annexe I**). Tous ces éléments tendent à démontrer la capacité d'interactions des CGOs avec les cellules immunitaires entraînant ainsi une régulation de l'inflammation. Les mécanismes par lesquels les CGOs modulent la réponse inflammatoire au niveau de la moelle spinale ne sont pas encore très clairs. Mais leur capacité à phagocyter rapidement les différents débris cellulaires générés par les traumatismes permettrait un nettoyage plus rapide de la zone de lésion, atténuant le recrutement des cellules immunitaires et l'activation des cellules résidentes, ce qui, par conséquent diminuerait les dommages tissulaires secondaires (Ekberg and St John, 2015). Il fut démontré qu'après transplantation, les CGOs interagissaient directement sur la réponse immunitaire dans la moelle spinale de rat. Etonnement, une fois transplantées, les CGOs augmenteraient la production d'IL-1 $\beta$  et d'iNOS au niveau de la zone de lésion durant la première semaine suivant le traumatisme initial. Ceci entraîne une augmentation rapide du recrutement et de l'activation des cellules immunitaires (macrophages/microglie), ainsi que des astrocytes. Cette sur-activation des cellules immunitaires et des astrocytes permet une accélération de l'élimination des débris cellulaires et la formation rapide de la cicatrice médullaire. A terme, ceci conduit à une diminution de la réponse inflammatoire et de la réponse astrocytaire au niveau de la lésion, du fait de la cicatrisation rapide, du rétablissement de l'homéostasie et de l'intégrité tissulaire (Lopez-Vales et al., 2004). Nous avons vu précédemment qu'après une lésion médullaire, il y avait une augmentation massive de la réactivité des astrocytes résidents au niveau du site de lésion. Après

une LMT, les astrocytes s'hypertrophient et commencent à surexprimer la GFAP. Ces astrocytes réactifs permettent la formation de la cicatrice gliale autour du tissu nerveux endommagé, ce qui va contenir les cellules immunitaires et rétablir la barrière hémato-médullaire (Burda and Sofroniew, 2014; O'Shea et al., 2017). Depuis plusieurs années, la cicatrice gliale formée par les astrocytes hyper-réactifs est décrite comme une barrière physique quant à la repousse axonale, du fait de la sécrétion de nombreuses molécules inhibitrices, telles que les CSPGs (Silver and Miller, 2004). Cette famille de molécules de la matrice extracellulaire comporte plusieurs membres, comme Aggrecan, Brevican, Neurocan, NG2, Phosphacan et Versican. Elles participent grandement à la création d'un environnement inhibiteur au niveau de la zone de lésion. Nous avons décidé durant notre étude d'analyser la production de Neurocan, l'une des CSPGs décrite comme la plus inhibitrice pour la repousse axonale produite par les astrocytes résidents, après une transplantation de CGOs. Nous avons constaté une diminution de la production de Neurocan au sein des moelles spinales ayant reçues une greffe de CGOs au cours du temps. Ces résultats concordent avec les données de la littérature. En effet, il fut démontré précédemment que les CGOs pouvaient inhiber ou dégrader certaines des molécules inhibitrices constituant la cicatrice gliale par la synthèse de molécules, comme la *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4* (ADAMTS4) ou MMP-2 (Mayeur et al., 2013; Yui et al., 2011) (**Annexe II**). Ces résultats s'expliquent également par la capacité des CGOs à interagir librement avec les astrocytes sans entraîner d'hyperréactivité de leur part. En effet, il est maintenant bien établi que les CGOs, contrairement aux cellules de Schwann, s'entremêlent librement avec les astrocytes, tant *in vitro* qu'*in vivo*, en déclenchant des réactions astrocytaires nettement moins importantes que les cellules de Schwann (Lakatos et al., 2000). *In vivo*, les CGOs peuvent traverser librement la cicatrice gliale dans laquelle se trouve une concentration importante d'astrocytes et migrent facilement sans déclencher une surexpression de GFAP et une augmentation de la production de CSPGs (Khankan et al., 2016; Lakatos et al., 2003a; Lakatos et al., 2000). De façon étonnante, nous avons surtout constaté dans le groupe des souris hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP transplantées, que les astrocytes nouvellement générés par les cellules épendymaires étaient faiblement producteurs de Neurocan au niveau de la moelle spinale. Chez les souris contrôles, ces nouveaux astrocytes produisent d'importante quantité de Neurocan au niveau du site de lésion. Bien que nous n'ayons pas décelé de différences quant à l'expression de la GFAP par ces nouveaux astrocytes, il semblerait que ces nouveaux astrocytes soient moins hyper-réactifs, comme il le fut décrit précédemment (Meletis et al., 2008). Par conséquent, nous avons voulu confirmer que la transplantation de CGOs bulbaires après une lésion médullaire entraînait

l'établissement d'un environnement propice à une repousse axonale et pouvait favoriser l'établissement d'une neurogène après lésion médullaire. Pour ce faire, nous avons analysé par QPCR l'expression des facteurs décrits précédemment comme étant inhibiteurs ou promoteurs de la repousse axonale. Cette analyse de gènes repose sur des données récemment publiées (Anderson et al., 2016). En effet, l'équipe de Sofroniew démontra que contrairement à ce qui était pensé, les astrocytes formant la cicatrice gliale après une lésion médullaire ne constituent pas seulement un frein à la repousse axonale. Ils ont démontré, qu'au contraire, ces astrocytes présentaient des capacités à sécréter des facteurs inhibiteurs, mais également des facteurs promoteurs de la repousse axonale (Anderson et al., 2016). Partant de ce constat, nous décidâmes d'analyser par PCR quantitative l'expression de ces différents gènes inhibiteurs et permissifs de la repousse axonale parmi nos différents groupes d'étude. Nos résultats montrent que la transplantation de CGOs n'entraîne pas d'augmentation significative de gènes promoteurs de la repousse axonale après lésion. En effet, parmi les gènes les plus exprimés, aucun profil d'expression clair ne se dessine ; certains gènes sont surexprimés dans le groupe contrôle et d'autres se trouvent surexprimés dans le groupe transplanté. A l'opposé, de façon surprenante, nous avons constaté une diminution significative des taux d'expression pour les gènes des facteurs inhibiteurs pour le groupe de souris ayant reçu une greffe de CGOs. Cette diminution est telle, que le niveau de 8 des 10 gènes les plus exprimés chez les souris lésées est comparable à celui enregistré pour les souris sauvages sans lésion. Ces données pourraient expliquer la raison pour laquelle la transplantation de CGOs au niveau des moelles spinales lésées se traduit par une amélioration de la repousse axonale, de la survie neuronale et par une augmentation des fonctions motrices. Cette même étude, réalisée chez les souris *hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-Rasless*, montre une disparition de cet effet sur les gènes inhibiteurs. Il semblerait donc que la greffe de CGOs permette la formation d'un environnement faiblement inhibiteur de la repousse axonale, en agissant sur les cellules épendymaires ou leur progénie. On pourrait donc suspecter, en corrélation avec les résultats obtenus quant à la caractérisation de l'expression de *Neurocan*, que les CGOs stimulent la différenciation des cellules épendymaires vers un type astrocytaire hypo-réactifs au niveau de la lésion. Néanmoins, on constate chez les souris *hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-Rasless* ayant reçu des CGOs, une augmentation, non significative, des facteurs promoteurs de la repousse axonale. Ceci confirme que les CGOs induisent une expression faible de facteurs favorisant l'établissement d'un environnement moins délétère pour la repousse axonale et la neurogène. Sablestrom démontra que l'inhibition de la prolifération des cellules épendymaires chez le modèle *hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-Rasless* entraînait une diminution de l'expression de certains de ces facteurs

neurotrophiques au niveau de la moelle se traduisant par une exacerbation des dommages tissulaires dans la moelle spinale après lésion (Sabelstrom et al., 2013). En effet, Sabelstrom, dans son article, montre que les cellules issues des cellules épendymaires sécrètent de nombreux facteurs trophiques, comme le CNTF, l'HGF et l'IGF1 (Sabelstrom et al., 2013). L'absence de réactivité des cellules épendymaires, et donc de leur progénie, mène à une absence de production de ces facteurs, ce qui conduit à une altération majeure de l'établissement de la cicatrice médullaire, se traduisant par un élargissement profond de la lésion au sein du tissu nerveux (Sabelstrom et al., 2013). Dans ce modèle, la zone de lésion est principalement envahie par les fibroblastes méningés et par les péricytes formant une cicatrice fibrotique dense empêchant toute repousse axonale. Dans notre étude chez la souris *hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-Rasless* après transplantation de bCGOs, nous constatons un envahissement massif de la zone de lésion par le fait d'une prolifération et d'une migration des astrocytes résidents. Ces astrocytes empêchent ainsi l'invasion massive des fibroblastes et des péricytes au niveau de la lésion et donc diminuent la surface de la cicatrice fibrotique. Cette prolifération massive d'astrocytes au niveau du site de lésion pourrait s'expliquer par la production de CNTF par les CGOs et être entretenue par les astrocytes résidents via une boucle autocrine dans la moelle spinale.

### **Nouveaux neurones après lésion médullaire**

Un fait intéressant de notre étude est l'apparition de nouveaux neurones. En effet, nous avons évalué le taux de survie des neurones après lésion médullaire. L'utilisation du marqueur spécifique, NeuN (neurones matures) nous a permis de constater une survie neuronale accrue au cours du temps par la greffe de CGOs, mais surtout d'observer l'apparition de nouveaux neurones. Depuis des années, la moelle spinale est considérée comme un tissu mature post-mitotique donc dépourvu de neurogenèse. Ce dogme, fut longtemps vrai pour le cerveau, où il était considéré que l'Homme disposait dès sa naissance d'une quantité définie de neurones lui servant tout au long de sa vie sans possibilité d'en générer de nouveaux. Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, ce concept s'avère être faux. En effet, il est maintenant globalement admis que le cerveau des mammifères contient deux régions neurogènes, la SVZ et la zone granulaire du gyrus dentelé. Depuis quelques années, ce concept tend également à être remis en cause concernant la moelle spinale. Depuis les travaux d'Adrian et Walker en 1962, qui démontrèrent par l'administration de thymidine tritiée, la présence d'une prolifération cellulaire chez une souris saine, de nombreuses équipes tentent de prouver la présence d'une

neurogenèse dans la moelle spinale. Une étude précédente de Horner, démontra par l'utilisation de BrdU, la présence de cellules prolifératives donnant naissance majoritairement à des cellules gliales en conditions physiologiques. Dans cette étude, les chercheurs utilisèrent également des marqueurs neuronaux, comme NeuN et Tuj1 et ne purent démontrer la présence de cellules co-marquées au BrdU avec ces marqueurs neuronaux (Horner et al., 2000). Ces mêmes résultats furent confirmés par les travaux de Barnabé-Heider en 2010. Il fut démontré, par l'utilisation de trois lignées transgéniques, qu'en condition physiologique, la majorité des cellules qui prolifèrent sont des oligodendrocytes et quelques astrocytes (Barnabe-Heider et al., 2010). La première étude faisant état de la présence de nouveaux neurones dans la moelle spinale, fut réalisée par Shechter en 2007. Dans cette étude, l'auteur confirme l'absence de colocalisation de BrdU avec les marqueurs NeuN et Tuj1 dans une moelle saine. Mais il démontre pour la première fois une colocalisation du BrdU avec un autre marqueur neuronal, le DCX (Shechter et al., 2007). En effet, pour la première fois, il fut démontré la présence de cellules nouvellement formées présentant une expression protéique neuronale, traduisant la présence d'une neurogenèse dans la moelle saine. Les auteurs décrivent la formation au cours du temps de neurones GABAergiques, en partie dorsale de la moelle spinale adulte. Mais ces nouveaux neurones furent décrits comme immatures et n'arrivant pas à maturité au cours du temps. Cette absence de détection de nouveaux neurones matures au sein d'une moelle spinale saine pourrait s'expliquer par l'utilisation du BrdU. En effet, il a été démontré que l'incorporation de BrdU pouvait s'avérer toxique *in vivo* et *in vitro*. Les effets du BrdU peuvent se caractériser par des altérations du cycle cellulaire et des altérations quant à la prolifération et la survie des progéniteurs neuronaux (Lehner et al., 2011). De plus, la détection par immunohistochimie de l'incorporation de BrdU par les cellules suit un protocole spécifique qui nécessite une dénaturation de l'ADN. La dénaturation de l'ADN est réalisée par un traitement du tissu à l'acide hydrochlorique ou par la chaleur (Zeng et al., 2010). Ces traitements ont pour conséquence l'altération de certains épitopes présents sur les cellules cibles. Ceci pourrait expliquer l'absence de co-marquage BrdU avec les marqueurs spécifiques des neurones matures. A cause de ces différentes contraintes, une nouvelle méthode de détection de la synthèse d'ADN fut développée avec l'utilisation de l'EdU. Cet analogue de la thymidine va s'incorporer dans l'ADN durant la phase de répllication cellulaire. La particularité de cette molécule tient en son protocole de détection après incorporation. En effet, sa détection se fait par une réaction entre les groupes ethynyles de l'EdU et une azide fluorescente selon la réaction *Clik* (*copper-catalyzed [3+2] cycloaddition*). La taille réduite de l'azide lui permet d'accéder facilement à l'ADN sans étape de dénaturation pour interagir avec l'EdU. La réaction se passe

à température ambiante et n'engendre pas de détérioration des épitopes. Une étude a démontré que l'utilisation d'EdU permettait de visualiser comme avec le BrdU, la population de nouveaux neurones générés dans le gyrus dentelé en condition physiologique, voire même certaines cellules non marquées par le BrdU (Zeng et al., 2010). Les auteurs décrivent cette méthode comme plus fiable et rapide. Récemment, cet analogue permit pour la première fois la détection de nouveaux neurones au niveau d'une moelle épinière saine. En effet, Habib et ses collègues développèrent une nouvelle technique de séquence cellulaire des cellules en prolifération basée sur l'incorporation d'EdU (Habib et al., 2016). Cette technique très novatrice, appelé *Div-seq*, consiste en à trier des noyaux cellulaires ayant incorporés de l'EdU par cytométrie de flux. L'ARN de chacun des noyaux est ensuite séquencé afin d'identifier, par l'utilisation d'une librairie de gènes spécifiques d'un type cellulaire présent dans le SNC, l'identité des cellules qui prolifèrent en condition physiologique dans la moelle spinale adulte. C'est par cette méthode qu'il fut prouvé pour la première fois la présence de neurones GABAergiques immatures et matures dans une moelle saine après une semaine de traitement à l'EdU (Habib et al., 2016). Nos résultats vont dans le sens de cette étude. En effet, l'utilisation d'EdU nous a permis de visualiser les rares nouveaux neurones générés dans la moelle lésée après transplantation de CGOs. A notre connaissance, ces résultats sont les premiers à démontrer la capacité d'une moelle spinale lésée à générer de nouveaux neurones. Nous sommes d'ailleurs en collaboration avec l'équipe du Dr Habib afin de confirmer par l'utilisation de sa technique innovante, la présence de nouveaux neurones dans les moelles spinales transplantées lésées. Différentes études ont démontré la possibilité de générer de nouveaux neurones par la greffe de cellules souches neurales ou par une modification des cellules endogènes. En effet, Lu et ses collègues démontrèrent la possibilité de générer de nouveaux neurones au cours du temps par la transplantation de cellules iPSC après une lésion médullaire (Lu, 2017; Lu et al., 2014). Ils constatèrent qu'environ trois mois après la transplantation, leurs cellules souches se différenciaient en nouveaux neurones, devenant pleinement matures et s'intégrant au réseau axonal endogène épargné par la lésion. Une autre étude a démontré la possibilité de générer de nouveaux neurones dans la moelle par une reprogrammation des cellules endogènes non neurales (Su et al., 2014). En effet, les auteurs de cet article montrent qu'il est possible de transformer des astrocytes résidents en neuroblastes DCX positifs puis en neurones Map2 matures par le fait d'une simple surexpression du facteur de transcription Sox2, avec ou sans lésion médullaire. Pour ce faire, ils injectèrent dans la moelle spinale de souris adulte un lentivirus permettant l'expression de Sox2 sous la dépendance du promoteur humain GFAP. Ainsi l'expression forcée de Sox2 dans les astrocytes médullaires conduit à une

reprogrammation génétique vers un profil neuronal. Ceci fut également confirmé au niveau du cerveau avec l'utilisation d'astrocytes corticaux humain différenciés en cellules souche neurales (Corti et al., 2012). Cette technique, similaire à la génération d'iPSC est en plein essor car elle représente une alternative à la transplantation cellulaire et à ses contraintes temporelles et techniques. Il fut démontré précédemment la possibilité de transformer des fibroblastes cardiaques endogènes en cardiomyocytes par l'intermédiaire des facteurs Gata4, Mef2 et Tbx5, après lésion cardiaque (Qian et al., 2013; Qian and Srivastava, 2013). Cette technique de reprogrammation cellulaire fut validée dans différents types d'organes, comme le pancréas, le cœur et le cerveau. En effet, au niveau du cerveau, cette technique permet pour la première fois d'obtenir des neurones par la transformation des astrocytes résidents mais également à partir de fibroblastes par l'expression de facteurs spécifiques (Torper et al., 2013). Ces travaux sont très intéressants puisqu'ils permettraient d'expliquer l'origine des nouveaux neurones obtenus après transplantation dans notre étude. Les nouveaux neurones émergents, après lésion au sein des moelles spinales de souris hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP, au cours du temps, ne sont pas issus de cellules recombinées. En effet, ces neurones NeuN positifs EdU positifs n'expriment pas la YFP ce qui signifie qu'ils ne sont pas issus des cellules épendymaires FoxJ1. La transplantation de CGOs influencerait donc la différenciation neurale de progéniteurs endogènes en neurones ou la différenciation d'une population endogène. Toutefois, la transplantation de CGOs dans la moelle lésée de souris hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-Rasless montre que l'inhibition du cycle cellulaire et donc l'impossibilité pour les cellules FoxJ1 positives de générer de nouvelles cellules après lésion médullaire, conduit à l'absence de détection de nouveaux neurones au cours du temps. La formation des nouveaux neurones observés précédemment, ne serait pas due à une simple interaction du transplant cellulaire avec une population cellulaire endogène mais elle passerait par l'intermédiaire des cellules épendymaires FoxJ1 et des nouvelles cellules qu'elles génèrent après lésion. Ces résultats ouvrent un nouvel axe de recherche, car il est maintenant déterminant de trouver l'origine cellulaire de ces nouveaux neurones qui ne sont pas issus de la principale population souche de la moelle, à savoir les cellules épendymaires. Barnabé-Heider dans son étude démontra qu'en condition physiologique, seuls les oligodendrocytes de la souris CreER-Olig2 proliféraient au cours du temps en condition physiologique (Barnabe-Heider et al., 2010). Après lésion médullaire, les cellules épendymaires FoxJ1 et les astrocytes Cx30 sont les principales cellules qui prolifèrent vigoureusement dans une moelle spinale. *In vitro*, il fut démontré que les cellules épendymaires des souris hFoxJ1-CreER donnaient la plus grande proportion de neurosphères après lésion. Cela confirma l'absence de propriétés souches de la part des astrocytes et des oligodendrocytes

issus des souris Cx30-CreER et Olig2- CreER (Barnabe-Heider et al., 2010). De façon surprenante, nous avons constaté qu'environ 20 % des premières neurosphères ne sont pas issues des cellules FoxJ1. Après repiquage, 100 % des neurosphères sont issues des cellules FoxJ1. Ceci suggère la présence de cellules progénitrices au sein de la moelle spinale murine. Il fut démontré dans le modèle de souris hGFAP-CreER<sup>T2</sup> l'obtention de premières neurosphères recombinaisons (Fiorelli et al., 2013). Dans son étude, Fiorelli montre la présence de cellules « astrocyte like » exprimant la GFAP au niveau du canal central, qui donne des progéniteurs aux capacités d'auto-renouvellement limitées *in vitro*. En culture, ces progéniteurs, après différenciation, ont la capacité de former des quantités importantes de neurones (Fiorelli et al., 2013). Cette proportion de neurones est beaucoup plus élevée que celle générée à partir des neurosphères issues des souris hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP. Il confirme également l'absence d'expression de la protéine Cx30 par ces cellules, utilisée précédemment par Barnabé-Heider pour infirmer le potentiel souche des astrocytes de la moelle spinale. Il pourrait donc s'agir d'une sous-population de cellules épendymaires ou d'astrocytes présentant des capacités souches similaires aux cellules FoxJ1 et qui pourrait être à l'origine de ces nouveaux neurones après transplantation. Pour cette raison, il serait intéressant de réaliser ce même protocole de transplantation cellulaire chez des souris hGFAP-CreER<sup>T2</sup> afin de déterminer l'origine des nouveaux neurones. C'est dans cet objectif que nous avons importé au sein du laboratoire cette lignée de souris transgéniques, ainsi que les lignées Glast et Connexine 30. L'origine astrocytaire de ces neurones nouvellement formés à l'issue de la transplantation semble la plus probable. En effet, au niveau du cerveau, il fut démontré que les astrocytes matures étaient capables, à la suite d'un traumatisme cérébral de se dédifférencier et d'acquérir des propriétés de cellules souches neurales *in vitro* (Buffo et al., 2008; Sirko et al., 2013). Il fut constaté qu'à la suite d'une lésion de type AVC, une diminution de l'expression du facteur Notch1 au niveau des astrocytes matures du striatum entraînait la différenciation de ces derniers en neurones matures (Magnusson et al., 2014). Cette diminution de Notch1 permettrait la libération de l'expression d'un programme neurogénique chez les astrocytes conduisant à leur dédifférenciation en neurones matures. Ces résultats soulèvent la question de l'existence d'un mécanisme similaire au niveau de la moelle spinale après une lésion médullaire. L'hypothèse pourrait être que les nouveaux neurones observés dans la moelle spinale pourraient provenir d'astrocytes résidents après la lésion, sous l'influence de la transplantation de bCGOs, des cellules épendymaires et de sa progénie. Il fut démontré précédemment que les cellules issues des cellules épendymaires étaient sécrétrices de nombreux facteurs neurotrophiques au niveau de la moelle, comme le CNTF, HGF et l'IGF-1, qui participent activement à la survie neuronale

après lésion médullaire (Sabelstrom et al., 2013). Ces facteurs pourraient être à l'origine d'un changement phénotypique de la part des astrocytes résidents dans les souris transplantées, ce qui expliquerait l'absence de nouveaux neurones dans le modèle  $hFoxJ1-CreER^{T2}::YFP-Rasless$ , malgré la présence de CGOs bulbaires.

En conclusion, cette étude a permis de démontrer pour la première fois l'effet d'une thérapie cellulaire sur les cellules épendymaires et sur les différentes cellules générées à l'issue de la lésion médullaire. Nous démontrons ici que la greffe de CGOs bulbaires influence directement les capacités de prolifération des cellules *in vivo* et *in vitro*. La transplantation agit également précocement sur la voie de différenciation de ces cellules en stimulant une astrogenèse importante. Ceci participe à l'établissement précoce d'une cicatrice gliale qui permet au cours du temps la création d'un environnement propice à la survie neuronale et à la neurogenèse. L'effet de ces CGOs passe par la sécrétion de facteurs qui vont directement influencer la réactivité des cellules endogènes.



# CONCLUSION



L'objectif principal de ce travail de thèse était d'étudier les cellules souches épendymaires de la moelle spinale, dans différents modèles murins transgéniques, en condition physiologique et dans un cadre pathologique, avec une analyse au cours du temps de leur comportement lors d'une transplantation de CGOs bulbaires, après lésion médullaire traumatique.

La première partie, a été réalisée en collaboration avec le *Karolinska Institutet*. Dans cette étude, nous avons découvert des fonctions surprenantes et non documentées du gène *FoxJ1* au cours du développement embryonnaire, ainsi qu'à l'âge adulte durant une lésion médullaire. Ce travail a été rendu possible par l'utilisation de trois modèles murins. Les lignées hFoxJ1::EGFP et hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP, utilisant la séquence promotrice du gène humain de *FoxJ1*, nous ont permis de suivre l'expression transitoire du gène *FoxJ1* par des cellules progénitrices de la moelle spinale au cours du développement. Avec cette première étude, nous avons montré qu'au stade E10,5, Foxj1 était exprimé par des cellules progénitrices présentes autour du canal central et également par des interneurons V1 et V2. Au stade E13-17, cette expression change et FoxJ1 se trouve alors exprimé par une sous-population d'astrocytes de la substance blanche latérale et au niveau dorsal de la moelle spinale. Finalement, nos résultats ont confirmé l'expression, à partir de E15,5 et après la naissance, de l'expression *FoxJ1* par les cellules épendymaires bordant le canal central de la moelle, cette expression devenant exclusive aux seules cellules épendymaires à partir de P5 (Barnabe-Heider et al., 2010; Li et al., 2016b; Meletis et al., 2008).

Du fait des différentes critiques quant à la spécificité du promoteur humain de *FoxJ1*, nous avons utilisé une troisième lignée théoriquement plus spécifique des cellules épendymaires, la lignée FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> (Muthusamy et al., 2014; Ren et al., 2017). Ce modèle de *knock-in*, utilisant le promoteur murin de *FoxJ1*, s'est révélé être plus proche d'un modèle *knockout* du gène *FoxJ1*, du fait des différentes altérations phénotypiques que nous avons observées lors son utilisation (malformations congénitales souvent fatales). Nos résultats ont démontré qu'au cours du développement, l'altération du gène *FoxJ1* par l'insertion du vecteur dans un ou deux allèles du gène *FoxJ1*, entraîne une diminution de la prolifération et de la migration des cellules progénitrices de la moelle spinale. Cette observation avait également été faite précédemment lors du développement cérébral (Jacquet et al., 2011). A l'âge adulte, l'altération de *FoxJ1* (exprimé uniquement par les cellules épendymaires à ce stade) dans le modèle FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> montre des modifications quant au potentiel souche médullaire aussi en présence ou en l'absence de lésion. Nous avons montré que les moelles

spinales des souris FoxJ1-KI-CreER<sup>T2</sup> hétérozygotes, produisent moins de neurosphères *in vitro* en condition physiologique ainsi qu'en condition pathologique et ce, dès l'âge juvénile. Nous avons également mis en évidence une modification des voies de différenciation physiologique des premières neurosphères, par la formation d'une plus grande proportion de neurones Tuj1 *in vitro*, probablement du fait de l'altération des séquences endogènes de *FoxJ1*.

En conclusion de cette première partie, nous avons démontré que *FoxJ1* n'était pas seulement indispensable au processus de ciliogénèse mais qu'il participait à d'autres processus plus vastes, comme la prolifération et la migration de certaines cellules progénitrices au cours du développement, la réactivité des cellules épendymaires après une lésion médullaire et au potentiel souche de la moelle spinale adulte. Même si le promoteur humain de *FoxJ1* peut présenter quelques inconvénients, l'utilisation de la lignée hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP représente actuellement le modèle le plus fiable quant à l'étude *in vivo* et *in vitro* des cellules épendymaires et leur progénie avec ou sans lésion médullaire.

La seconde partie de mon travail a été de mettre en place une étude novatrice, visant à mettre en évidence, pour la première fois, l'effet direct des thérapies cellulaires sur les cellules souches épendymaires de la moelle spinale adulte après lésion médullaire traumatique. Nous avons montré, *in vitro*, une augmentation du potentiel souche médullaire lors d'une transplantation de CGOs d'origine bulbaire, avec ou sans lésion. Ceci se caractérise par une augmentation significative du nombre de premières et de secondes neurosphères obtenues après transplantations. De plus, la thérapie cellulaire influence directement la voie de différenciation des cellules souches *in vitro* vers un type neural, et ce, via une augmentation de la proportion de neurones Tuj1 obtenus. *In vivo*, nous avons confirmé l'augmentation de la prolifération des cellules épendymaires après une lésion médullaire chez la souris hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP (Barnabe-Heider et al., 2010; Meletis et al., 2008; Mothe and Tator, 2005; Sabelstrom et al., 2013). Pour la première fois, nos travaux ont démontré que la greffe de bCGOs permettait d'accroître au cours du temps les taux de prolifération des cellules épendymaires. Bien que ne changeant intrinsèquement pas la voie de différenciation des cellules épendymaires qui se fait préférentiellement vers un type astrocytaire, la transplantation de bCGOs accélère et accroît le mécanisme d'astroglie au sein de la moelle spinale adulte et permet la génération d'astrocytes hypo-réactifs, comme le traduit la diminution de production de neurocan. Cette génération précoce d'astrocytes non-réactifs, couplés aux propriétés neurotrophiques et immunomodulatrices des bCGOs, conduit à la formation d'un environnement cicatriciel permissif illustré par la diminution, à deux semaines, de l'expression des gènes inhibiteurs de

la repousse axonale. Ceci aboutit à une augmentation des taux de survie des neurones au cours du temps au sein des moelles spinales lésées. Bien que longtemps suspectée et uniquement observée en condition physiologique, nous avons identifié, pour la première fois, par l'observation de neurones NeuN/ EdU positifs, l'existence d'une neurogenèse médullaire post-traumatique chez la souris. De façon surprenante, ces nouveaux neurones ne sont pas issus des cellules épendymaires du canal central. L'utilisation unique de la lignée hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-Rasless dans une étude de thérapie cellulaire, nous a permis de constater le rôle central que jouent les cellules épendymaires et les cellules qui en sont issues, dans les effets bénéfiques induits par la transplantation de bCGOs. Nous décrivons de façon exclusive, que l'absence de prolifération des cellules épendymaires en présence de bCGOs après lésion médullaire, conduit à une absence de diminution des gènes inhibiteurs de la repousse axonale. Cela se traduit par une diminution drastique de la survie neuronale et une absence de nouveaux neurones post-lésionnels. Nous avons constaté que la greffe de CGOs chez la souris hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP-Rasless lésée conduit à une modulation majeure de la cicatrice médullaire, en réduisant la cicatrice fibrotique au profit d'une invasion massive d'astrocytes résidents au cœur de la lésion. Nous pouvons émettre l'hypothèse que cet effet est médié par la sécrétion de facteurs neurotrophiques produits par les CGOs bulbaires.

En conclusion, tous ces travaux ont permis de mieux documenter le rôle central des cellules épendymaires dans la physiopathologie de la lésion médullaire. Les CGOs présentent donc un intérêt thérapeutique, du fait de leur capacité à interagir avec les cellules souches épendymaires et leur progénie afin de médier l'établissement d'une régénération tissulaire bénéfique. Comme c'est le cas au niveau du cerveau, la moelle spinale n'est pas un tissu post-mitotique et elle constitue maintenant une nouvelle région neurogénique du SNC adulte. Nos travaux ouvrent d'immenses perspectives pour l'élaboration de futurs protocoles cliniques concernant la réhabilitation des lésions médullaires traumatiques. L'étude des cellules épendymaires de la moelle spinale n'en est qu'aux prémices des immenses possibilités que ces cellules peuvent apporter et représente un immense espoir pour des millions de patients médullo-lésés.



# **BIBLIOGRAPHIE**

- (2016). Spinal Cord Injury (SCI) 2016 Facts and Figures at a Glance. *The journal of spinal cord medicine* 39, 493-494.
- Aarum, J., Sandberg, K., Haerberlein, S.L., and Persson, M.A. (2003). Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15983-15988.
- Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37, 13-25.
- Abbott, N.J., Ronnback, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7, 41-53.
- Ackery, A., Robins, S., and Fehlings, M.G. (2006). Inhibition of Fas-mediated apoptosis through administration of soluble Fas receptor improves functional outcome and reduces posttraumatic axonal degeneration after acute spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 23, 604-616.
- Adrian, E.K., Jr., and Walker, B.E. (1962). Incorporation of thymidine-H3 by cells in normal and injured mouse spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol* 21, 597-609.
- Ahuja, C.S., Wilson, J.R., Nori, S., Kotter, M.R.N., Druschel, C., Curt, A., and Fehlings, M.G. (2017). Traumatic spinal cord injury. *Nature reviews Disease primers* 3, 17018.
- Albrecht, P.J., Dahl, J.P., Stoltzfus, O.K., Levenson, R., and Levison, S.W. (2002). Ciliary neurotrophic factor activates spinal cord astrocytes, stimulating their production and release of fibroblast growth factor-2, to increase motor neuron survival. *Experimental neurology* 173, 46-62.
- Alexanian, A.R., Svendsen, C.N., Crowe, M.J., and Kurpad, S.N. (2011). Transplantation of human glial-restricted neural precursors into injured spinal cord promotes functional and sensory recovery without causing allodynia. *Cytotherapy* 13, 61-68.
- Alfaro-Cervello, C., Soriano-Navarro, M., Mirzadeh, Z., Alvarez-Buylla, A., and Garcia-Verdugo, J.M. (2012). Biciliated ependymal cell proliferation contributes to spinal cord growth. *J Comp Neurol* 520, 3528-3552.
- Almad, A., Sahinkaya, F.R., and McTigue, D.M. (2011). Oligodendrocyte fate after spinal cord injury. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 8, 262-273.
- Altman, J. (1962a). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135, 1127-1128.
- Altman, J. (1962b). Autoradiographic study of degenerative and regenerative proliferation of neuroglia cells with tritiated thymidine. *Exp Neurol* 5, 302-318.
- Anderson, M.A., Burda, J.E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T.M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B.S., Deming, T.J., and Sofroniew, M.V. (2016). Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 532, 195-200.
- Anna, Z., Katarzyna, J.W., Joanna, C., Barczewska, M., Joanna, W., and Wojciech, M. (2017). Therapeutic Potential of Olfactory Ensheathing Cells and Mesenchymal Stem Cells in Spinal Cord Injuries. *Stem cells international* 2017, 3978595.
- Arcuino, G., Lin, J.H., Takano, T., Liu, C., Jiang, L., Gao, Q., Kang, J., and Nedergaard, M. (2002). Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9840-9845.
- Attwell, D., Buchan, A.M., Charpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B.A., and Newman, E.A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468, 232-243.
- Au, E., Richter, M.W., Vincent, A.J., Tetzlaff, W., Aebbersold, R., Sage, E.H., and Roskams, A.J. (2007). SPARC from olfactory ensheathing cells stimulates Schwann cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 7208-7221.
- Austin, J.W., and Fehlings, M.G. (2008). Molecular mechanisms of Fas-mediated cell death in oligodendrocytes. *Journal of neurotrauma* 25, 411-426.
- Barateiro, A., and Fernandes, A. (2014). Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochimica et biophysica acta* 1843, 1917-1929.
- Barber, P.C., and Lindsay, R.M. (1982). Schwann cells of the olfactory nerves contain glial fibrillary acidic protein and resemble astrocytes. *Neuroscience* 7, 3077-3090.

- Barbour, H.R., Plant, C.D., Harvey, A.R., and Plant, G.W. (2013). Tissue sparing, behavioral recovery, supraspinal axonal sparing/regeneration following sub-acute glial transplantation in a model of spinal cord contusion. *BMC Neurosci* 14, 106.
- Barnabe-Heider, F., and Frisen, J. (2008). Stem cells for spinal cord repair. *Cell Stem Cell* 3, 16-24.
- Barnabe-Heider, F., Goritz, C., Sabelstrom, H., Takebayashi, H., Pfrieger, F.W., Meletis, K., and Frisen, J. (2010). Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell* 7, 470-482.
- Barraud, P., Seferiadis, A.A., Tyson, L.D., Zwart, M.F., Szabo-Rogers, H.L., Ruhrberg, C., Liu, K.J., and Baker, C.V. (2010). Neural crest origin of olfactory ensheathing glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 21040-21045.
- Barres, B.A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60, 430-440.
- Barres, B.A., and Raff, M.C. (1993). Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. *Nature* 361, 258-260.
- Bartanusz, V., Jezova, D., Alajajian, B., and Digicaylioglu, M. (2011). The blood-spinal cord barrier: morphology and clinical implications. *Ann Neurol* 70, 194-206.
- Bartzokis, G., Lu, P.H., Heydari, P., Couvrette, A., Lee, G.J., Kalashyan, G., Freeman, F., Grinstead, J.W., Villablanca, P., Finn, J.P., *et al.* (2012). Multimodal magnetic resonance imaging assessment of white matter aging trajectories over the lifespan of healthy individuals. *Biological psychiatry* 72, 1026-1034.
- Baumann, N., and Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81, 871-927.
- Beattie, M.S., Farooqui, A.A., and Bresnahan, J.C. (2000). Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 17, 915-925.
- Beattie, M.S., Hermann, G.E., Rogers, R.C., and Bresnahan, J.C. (2002). Cell death in models of spinal cord injury. *Progress in brain research* 137, 37-47.
- Becker, T., and Becker, C.G. (2001). Regenerating descending axons preferentially reroute to the gray matter in the presence of a general macrophage/microglial reaction caudal to a spinal transection in adult zebrafish. *The Journal of comparative neurology* 433, 131-147.
- Ben Haim, L., and Rowitch, D.H. (2017). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nature reviews Neuroscience* 18, 31-41.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Lipp, P. (1998). Calcium—a life and death signal. *Nature* 395, 645-648.
- Bican, O., Minagar, A., and Pruitt, A.A. (2013). The spinal cord: a review of functional neuroanatomy. *Neurol Clin* 31, 1-18.
- Biesiada, E., Razandi, M., and Levin, E.R. (1996). Egr-1 activates basic fibroblast growth factor transcription. Mechanistic implications for astrocyte proliferation. *The Journal of biological chemistry* 271, 18576-18581.
- Bijlard, M., Klunder, B., de Jonge, J.C., Nomden, A., Tyagi, S., de Vries, H., Hoekstra, D., and Baron, W. (2015). Transcriptional expression of myelin basic protein in oligodendrocytes depends on functional syntaxin 4: a potential correlation with autocrine signaling. *Molecular and cellular biology* 35, 675-687.
- Boggs, J.M. (2006). Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63, 1945-1961.
- Boggs, J.M., and Wang, H. (2004). Co-clustering of galactosylceramide and membrane proteins in oligodendrocyte membranes on interaction with polyvalent carbohydrate and prevention by an intact cytoskeleton. *J Neurosci Res* 76, 342-355.
- Bohme, G. (1988). Formation of the central canal and dorsal glial septum in the spinal cord of the domestic cat. *Journal of anatomy* 159, 37-47.
- Boido, M., Garbossa, D., Fontanella, M., Ducati, A., and Vercelli, A. (2014). Mesenchymal stem cell transplantation reduces glial cyst and improves functional outcome after spinal cord compression. *World Neurosurg* 81, 183-190.
- Boison, D., and Stoffel, W. (1994). Disruption of the compacted myelin sheath of axons of the central nervous system in proteolipid protein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11709-11713.
- Bonaguidi, M.A., Song, J., Ming, G.L., and Song, H. (2012). A unifying hypothesis on mammalian neural stem cell properties in the adult hippocampus. *Curr Opin Neurobiol* 22, 754-761.

- Bottai, D., Madaschi, L., Di Giulio, A.M., and Gorio, A. (2008). Viability-dependent promoting action of adult neural precursors in spinal cord injury. *Mol Med* 14, 634-644.
- Boullerne, A.I. (2016). The history of myelin. *Exp Neurol* 283, 431-445.
- Bouzier-Sore, A.K., Voisin, P., Bouchaud, V., Bezancon, E., Franconi, J.M., and Pellerin, L. (2006). Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study. *Eur J Neurosci* 24, 1687-1694.
- Bouzier-Sore, A.K., Voisin, P., Canioni, P., Magistretti, P.J., and Pellerin, L. (2003). Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 1298-1306.
- Bradl, M., and Lassmann, H. (2010). Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 37-53.
- Bretzner, F., Gilbert, F., Baylis, F., and Brownstone, R.M. (2011). Target populations for first-in-human embryonic stem cell research in spinal cord injury. *Cell Stem Cell* 8, 468-475.
- Briscoe, J., and Ericson, J. (2001). Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol* 11, 43-49.
- Brody, S.L., Yan, X.H., Wuerffel, M.K., Song, S.K., and Shapiro, S.D. (2000). Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23, 45-51.
- Brook, G.A., Plate, D., Franzen, R., Martin, D., Moonen, G., Schoenen, J., Schmitt, A.B., Noth, J., and Nacimiento, W. (1998). Spontaneous longitudinally orientated axonal regeneration is associated with the Schwann cell framework within the lesion site following spinal cord compression injury of the rat. *Journal of neuroscience research* 53, 51-65.
- Bruni, J.E. (1998). Ependymal development, proliferation, and functions: a review. *Microscopy research and technique* 41, 2-13.
- Buffo, A., Rite, I., Tripathi, P., Lepier, A., Colak, D., Horn, A.P., Mori, T., and Gotz, M. (2008). Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3581-3586.
- Bunge, M.B., and Wood, P.M. (2012). Realizing the maximum potential of Schwann cells to promote recovery from spinal cord injury. *Handb Clin Neurol* 109, 523-540.
- Burda, J.E., and Sofroniew, M.V. (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81, 229-248.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., and Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22, 183-192.
- Butovsky, O., Ziv, Y., Schwartz, A., Landa, G., Talpalar, A.E., Pluchino, S., Martino, G., and Schwartz, M. (2006). Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Molecular and cellular neurosciences* 31, 149-160.
- Butt, A.M. (2006). Neurotransmitter-mediated calcium signalling in oligodendrocyte physiology and pathology. *Glia* 54, 666-675.
- Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., et al. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 28, 264-278.
- Camara, J., Wang, Z., Nunes-Fonseca, C., Friedman, H.C., Grove, M., Sherman, D.L., Komiyama, N.H., Grant, S.G., Brophy, P.J., Peterson, A., et al. (2009). Integrin-mediated axoglial interactions initiate myelination in the central nervous system. *J Cell Biol* 185, 699-712.
- Campagnoni, A.T., Campagnoni, C.W., Bourre, J.M., Jacque, C., and Baumann, N. (1984). Cell-free synthesis of myelin basic proteins in normal and dysmyelinating mutant mice. *J Neurochem* 42, 733-739.
- Cao, Q.L., Zhang, Y.P., Howard, R.M., Walters, W.M., Tsoulfas, P., and Whittemore, S.R. (2001). Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. *Experimental neurology* 167, 48-58.
- Carlen, M., Meletis, K., Goritz, C., Darsalia, V., Evergren, E., Tanigaki, K., Amendola, M., Barnabe-Heider, F., Yeung, M.S., Naldini, L., et al. (2009). Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nature neuroscience* 12, 259-267.

- Carlson, S.L., Parrish, M.E., Springer, J.E., Doty, K., and Dossett, L. (1998). Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp Neurol* *151*, 77-88.
- Carpentier, P.A., and Palmer, T.D. (2009). Immune influence on adult neural stem cell regulation and function. *Neuron* *64*, 79-92.
- Carrade, D.D., Affolter, V.K., Outerbridge, C.A., Watson, J.L., Galuppo, L.D., Buerchler, S., Kumar, V., Walker, N.J., and Borjesson, D.L. (2011). Intradermal injections of equine allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells are well tolerated and do not elicit immediate or delayed hypersensitivity reactions. *Cytotherapy* *13*, 1180-1192.
- Casha, S., Yu, W.R., and Fehlings, M.G. (2001). Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience* *103*, 203-218.
- Casha, S., Yu, W.R., and Fehlings, M.G. (2005). FAS deficiency reduces apoptosis, spares axons and improves function after spinal cord injury. *Experimental neurology* *196*, 390-400.
- Charles, A. (1998). Intercellular calcium waves in glia. *Glia* *24*, 39-49.
- Charles, A.C., Naus, C.C., Zhu, D., Kidder, G.M., Dirksen, E.R., and Sanderson, M.J. (1992). Intercellular calcium signaling via gap junctions in glioma cells. *J Cell Biol* *118*, 195-201.
- Chen, Y., DeVivo, M.J., Richards, J.S., and SanAgustin, T.B. (2016). Spinal Cord Injury Model Systems: Review of Program and National Database From 1970 to 2015. *Archives of physical medicine and rehabilitation* *97*, 1797-1804.
- Chernousov, M.A., and Carey, D.J. (2000). Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors. *Histol Histopathol* *15*, 593-601.
- Chew, L.J., Shen, W., Ming, X., Senatorov, V.V., Jr., Chen, H.L., Cheng, Y., Hong, E., Knobloch, S., and Gallo, V. (2011). SRY-box containing gene 17 regulates the Wnt/beta-catenin signaling pathway in oligodendrocyte progenitor cells. *J Neurosci* *31*, 13921-13935.
- Cho, T.A. (2015). Spinal cord functional anatomy. *Continuum (Minneapolis)* *21*, 13-35.
- Chuah, M.I., and Teague, R. (1999). Basic fibroblast growth factor in the primary olfactory pathway: mitogenic effect on ensheathing cells. *Neuroscience* *88*, 1043-1050.
- Clevidence, D.E., Overdier, D.G., Peterson, R.S., Porcella, A., Ye, H., Paulson, K.E., and Costa, R.H. (1994). Members of the HNF-3/forkhead family of transcription factors exhibit distinct cellular expression patterns in lung and regulate the surfactant protein B promoter. *Developmental biology* *166*, 195-209.
- Conley, B.J., Young, J.C., Trounson, A.O., and Mollard, R. (2004). Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* *36*, 555-567.
- Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S., and Smith, S.J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* *247*, 470-473.
- Corti, S., Nizzardo, M., Simone, C., Falcone, M., Donadoni, C., Salani, S., Rizzo, F., Nardini, M., Riboldi, G., Magri, F., *et al.* (2012). Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons. *Experimental cell research* *318*, 1528-1541.
- Cregg, J.M., DePaul, M.A., Filous, A.R., Lang, B.T., Tran, A., and Silver, J. (2014). Functional regeneration beyond the glial scar. *Experimental neurology* *253*, 197-207.
- Dasari, V.R., Veeravalli, K.K., and Dinh, D.H. (2014). Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injuries: A review. *World journal of stem cells* *6*, 120-133.
- David, S., and Kroner, A. (2011). Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* *12*, 388-399.
- Dawson, M.R., Polito, A., Levine, J.M., and Reynolds, R. (2003). NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci* *24*, 476-488.
- Decimo, I., Bifari, F., Rodriguez, F.J., Malpeli, G., Dolci, S., Lavarini, V., Pretto, S., Vasquez, S., Sciancalepore, M., Montalbano, A., *et al.* (2011). Nestin- and doublecortin-positive cells reside in adult spinal cord meninges and participate in injury-induced parenchymal reaction. *Stem cells* *29*, 2062-2076.
- Decimo, I., Fumagalli, G., Berton, V., Krampera, M., and Bifari, F. (2012). Meninges: from protective membrane to stem cell niche. *Am J Stem Cells* *1*, 92-105.

- DeFelipe, J., Alonso-Nanclares, L., and Arellano, J.I. (2002). Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *J Neurocytol* 31, 299-316.
- Deierborg, T., Roybon, L., Inacio, A.R., Pesic, J., and Brundin, P. (2010). Brain injury activates microglia that induce neural stem cell proliferation ex vivo and promote differentiation of neurosphere-derived cells into neurons and oligodendrocytes. *Neuroscience* 171, 1386-1396.
- Del Bigio, M.R. (2010). Ependymal cells: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119, 55-73.
- Devivo, M.J. (2012). Epidemiology of traumatic spinal cord injury: trends and future implications. *Spinal Cord* 50, 365-372.
- DeVivo, M.J., Biering-Sorensen, F., New, P., Chen, Y., and International Spinal Cord Injury Data, S. (2011). Standardization of data analysis and reporting of results from the International Spinal Cord Injury Core Data Set. *Spinal cord* 49, 596-599.
- Dietschy, J.M., and Turley, S.D. (2004). Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *Journal of lipid research* 45, 1375-1397.
- Dimou, L., and Gotz, M. (2014). Glial cells as progenitors and stem cells: new roles in the healthy and diseased brain. *Physiological reviews* 94, 709-737.
- Dlouhy, B.J., Awe, O., Rao, R.C., Kirby, P.A., and Hitchon, P.W. (2014). Autograft-derived spinal cord mass following olfactory mucosal cell transplantation in a spinal cord injury patient: Case report. *Journal of neurosurgery Spine* 21, 618-622.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17, 5046-5061.
- Donnelly, D.J., and Popovich, P.G. (2008). Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol* 209, 378-388.
- Doucette, R. (1990). Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia* 3, 433-449.
- Doucette, R. (1991). PNS-CNS transitional zone of the first cranial nerve. *J Comp Neurol* 312, 451-466.
- Dugas, J.C., Cuellar, T.L., Scholze, A., Ason, B., Ibrahim, A., Emery, B., Zamanian, J.L., Foo, L.C., McManus, M.T., and Barres, B.A. (2010). Dicer1 and miR-219 Are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination. *Neuron* 65, 597-611.
- Dumont, R.J., Okonkwo, D.O., Verma, S., Hurlbert, R.J., Boulos, P.T., Ellegala, D.B., and Dumont, A.S. (2001). Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clinical neuropharmacology* 24, 254-264.
- Duncan, I.D., Aguayo, A.J., Bunge, R.P., and Wood, P.M. (1981). Transplantation of rat Schwann cells grown in tissue culture into the mouse spinal cord. *J Neurol Sci* 49, 241-252.
- Edgar, J.M., and Garbern, J. (2004). The myelinated axon is dependent on the myelinating cell for support and maintenance: molecules involved. *J Neurosci Res* 76, 593-598.
- Edgar, J.M., and Griffiths, I.R. (2014). Chapter 7 - White Matter Structure: A Microscopist's View. In *Diffusion MRI (Second Edition)* (San Diego: Academic Press), pp. 127-153.
- Edgar, J.M., and Nave, K.A. (2009). The role of CNS glia in preserving axon function. *Curr Opin Neurobiol* 19, 498-504.
- Ekberg, J.A., and St John, J.A. (2015). Olfactory ensheathing cells for spinal cord repair: crucial differences between subpopulations of the glia. *Neural regeneration research* 10, 1395-1396.
- Emery, B. (2010). Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science* 330, 779-782.
- Emery, B., Agalliu, D., Cahoy, J.D., Watkins, T.A., Dugas, J.C., Mulinyawe, S.B., Ibrahim, A., Ligon, K.L., Rowitch, D.H., and Barres, B.A. (2009). Myelin gene regulatory factor is a critical transcriptional regulator required for CNS myelination. *Cell* 138, 172-185.
- Emgard, M., Holmberg, L., Samuelsson, E.B., Bahr, B.A., Falci, S., Seiger, A., and Sundstrom, E. (2009). Human neural precursor cells continue to proliferate and exhibit low cell death after transplantation to the injured rat spinal cord. *Brain research* 1278, 15-26.

- Eng, L.F. (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol* 8, 203-214.
- Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., and Lee, Y.L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25, 1439-1451.
- Farbman, A.I., and Buchholz, J.A. (1992). Growth of olfactory epithelial tissue in vitro: lectin staining of axons. *Microsc Res Tech* 23, 173-180.
- Faulkner, J.R., Herrmann, J.E., Woo, M.J., Tansey, K.E., Doan, N.B., and Sofroniew, M.V. (2004). Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 2143-2155.
- Fehlings, M.G., Vaccaro, A., Wilson, J.R., Singh, A., D, W.C., Harrop, J.S., Aarabi, B., Shaffrey, C., Dvorak, M., Fisher, C., *et al.* (2012). Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury: results of the Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study (STASCIS). *PloS one* 7, e32037.
- Feil, S., Valtcheva, N., and Feil, R. (2009). Inducible Cre mice. *Methods in molecular biology* 530, 343-363.
- Felker, A., Nieuwenhuize, S., Dolbois, A., Blazkova, K., Hess, C., Low, L.W., Burger, S., Samson, N., Carney, T.J., Bartunek, P., *et al.* (2016). In Vivo Performance and Properties of Tamoxifen Metabolites for CreERT2 Control. *PloS one* 11, e0152989.
- Feron, F. (2007). [Current cell therapy strategies for repairing the central nervous system]. *Revue neurologique* 163 Spec No 1, 3S23-30.
- Feron, F., Bianco, J., Ferguson, I., and Mackay-Sim, A. (2008). Neurotrophin expression in the adult olfactory epithelium. *Brain research* 1196, 13-21.
- Feron, F., Perry, C., Cochrane, J., Licina, P., Nowitzke, A., Urquhart, S., Geraghty, T., and Mackay-Sim, A. (2005). Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. *Brain : a journal of neurology* 128, 2951-2960.
- Figley, S.A., Khosravi, R., Legasto, J.M., Tseng, Y.F., and Fehlings, M.G. (2014). Characterization of vascular disruption and blood-spinal cord barrier permeability following traumatic spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 31, 541-552.
- Fiorelli, R., Cebrian-Silla, A., Garcia-Verdugo, J.M., and Raineteau, O. (2013). The adult spinal cord harbors a population of GFAP-positive progenitors with limited self-renewal potential. *Glia* 61, 2100-2113.
- Fitch, M.T., and Silver, J. (2008). CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Experimental neurology* 209, 294-301.
- Fogarty, M., Richardson, W.D., and Kessaris, N. (2005). A subset of oligodendrocytes generated from radial glia in the dorsal spinal cord. *Development* 132, 1951-1959.
- Forni, P.E., Taylor-Burds, C., Melvin, V.S., Williams, T., and Wray, S. (2011). Neural crest and ectodermal cells intermix in the nasal placode to give rise to GnRH-1 neurons, sensory neurons, and olfactory ensheathing cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 6915-6927.
- Fouad, K., Schnell, L., Bunge, M.B., Schwab, M.E., Liebscher, T., and Pearse, D.D. (2005). Combining Schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 1169-1178.
- Franssen, E.H., De Bree, F.M., Essing, A.H., Ramon-Cueto, A., and Verhaagen, J. (2008). Comparative gene expression profiling of olfactory ensheathing glia and Schwann cells indicates distinct tissue repair characteristics of olfactory ensheathing glia. *Glia* 56, 1285-1298.
- Franssen, E.H., de Bree, F.M., and Verhaagen, J. (2007). Olfactory ensheathing glia: their contribution to primary olfactory nervous system regeneration and their regenerative potential following transplantation into the injured spinal cord. *Brain Res Rev* 56, 236-258.
- Frisen, J., Johansson, C.B., Torok, C., Risling, M., and Lendahl, U. (1995). Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *The Journal of cell biology* 131, 453-464.
- Fu, H., Qi, Y., Tan, M., Cai, J., Hu, X., Liu, Z., Jensen, J., and Qiu, M. (2003). Molecular mapping of the origin of postnatal spinal cord ependymal cells: evidence that adult ependymal cells are derived from Nkx6.1+ ventral neural progenitor cells. *J Comp Neurol* 456, 237-244.

- Gage, F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438.
- Genzen, J.R., Platel, J.C., Rubio, M.E., and Bordey, A. (2009). Ependymal cells along the lateral ventricle express functional P2X(7) receptors. *Purinergic signalling* 5, 299-307.
- Giaume, C. (2010). Astroglial Wiring is Adding Complexity to Neuroglial Networking. *Front Neuroenergetics* 2.
- Giaume, C., and Naus, C.C. (2013). Connexins, gap junctions, and glia. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling* 2, 133-142.
- Goldman, S.A., and Kuypers, N.J. (2015). How to make an oligodendrocyte. *Development* 142, 3983-3995.
- Goldshmit, Y., Sztal, T.E., Jusuf, P.R., Hall, T.E., Nguyen-Chi, M., and Currie, P.D. (2012). Fgf-dependent glial cell bridges facilitate spinal cord regeneration in zebrafish. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 7477-7492.
- Goritz, C., Dias, D.O., Tomilin, N., Barbacid, M., Shupliakov, O., and Frisen, J. (2011). A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science* 333, 238-242.
- Goto, J., Tezuka, T., Nakazawa, T., Sagara, H., and Yamamoto, T. (2008). Loss of Fyn tyrosine kinase on the C57BL/6 genetic background causes hydrocephalus with defects in oligodendrocyte development. *Mol Cell Neurosci* 38, 203-212.
- Gravel, M., Peterson, J., Yong, V.W., Kottis, V., Trapp, B., and Braun, P.E. (1996). Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination. *Mol Cell Neurosci* 7, 453-466.
- Graziadei, P.P., and Graziadei, G.A. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol* 8, 1-18.
- Gregoire, C.A., Goldenstein, B.L., Floriddia, E.M., Barnabe-Heider, F., and Fernandes, K.J. (2015). Endogenous neural stem cell responses to stroke and spinal cord injury. *Glia* 63, 1469-1482.
- Grossman, S.D., Rosenberg, L.J., and Wrathall, J.R. (2001). Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. *Experimental neurology* 168, 273-282.
- Guerout, N., Derambure, C., Drouot, L., Bon-Mardion, N., Duclos, C., Boyer, O., and Marie, J.P. (2010). Comparative gene expression profiling of olfactory ensheathing cells from olfactory bulb and olfactory mucosa. *Glia* 58, 1570-1580.
- Guerout, N., Li, X., and Barnabe-Heider, F. (2014a). Cell fate control in the developing central nervous system. *Experimental cell research* 321, 77-83.
- Guerout, N., Paviot, A., Bon-Mardion, N., Duclos, C., Genty, D., Jean, L., Boyer, O., and Marie, J.P. (2011). Co-transplantation of olfactory ensheathing cells from mucosa and bulb origin enhances functional recovery after peripheral nerve lesion. *PloS one* 6, e22816.
- Guerout, N., Paviot, A., Bon-Mardion, N., Honore, A., Obongo, R., Duclos, C., and Marie, J.P. (2014b). Transplantation of olfactory ensheathing cells to evaluate functional recovery after peripheral nerve injury. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e50590.
- Habib, N., Li, Y., Heidenreich, M., Swiech, L., Avraham-Davidi, I., Trombetta, J.J., Hession, C., Zhang, F., and Regev, A. (2016). Div-Seq: Single-nucleus RNA-Seq reveals dynamics of rare adult newborn neurons. *Science* 353, 925-928.
- Hackett, A.R., and Lee, J.K. (2016). Understanding the NG2 Glial Scar after Spinal Cord Injury. *Front Neurol* 7, 199.
- Hall, E.D., and Braughler, J.M. (1982). Glucocorticoid mechanisms in acute spinal cord injury: a review and therapeutic rationale. *Surg Neurol* 18, 320-327.
- Hall, P.A., and Watt, F.M. (1989). Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 106, 619-633.
- Hamilton, L.K., Truong, M.K., Bednarczyk, M.R., Aumont, A., and Fernandes, K.J. (2009). Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord. *Neuroscience* 164, 1044-1056.
- Hassinger, T.D., Guthrie, P.B., Atkinson, P.B., Bennett, M.V., and Kater, S.B. (1996). An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13268-13273.

- Hatami, M., Mehrjardi, N.Z., Kiani, S., Hemmesi, K., Azizi, H., Shahverdi, A., and Baharvand, H. (2009). Human embryonic stem cell-derived neural precursor transplants in collagen scaffolds promote recovery in injured rat spinal cord. *Cytotherapy* 11, 618-630.
- Hawkins, L.A., and Devitt, A. (2013). Current understanding of the mechanisms for clearance of apoptotic cells—a fine balance. *J Cell Death* 6, 57-68.
- Hawrylyuk, G.W., Spano, S., Chew, D., Wang, S., Erwin, M., Chamankhah, M., Forgiione, N., and Fehlings, M.G. (2014). An examination of the mechanisms by which neural precursors augment recovery following spinal cord injury: a key role for remyelination. *Cell transplantation* 23, 365-380.
- Hayar, A., Karnup, S., Shipley, M.T., and Ennis, M. (2004). Olfactory bulb glomeruli: external tufted cells intrinsically burst at theta frequency and are entrained by patterned olfactory input. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 1190-1199.
- He, Y., Dupree, J., Wang, J., Sandoval, J., Li, J., Liu, H., Shi, Y., Nave, K.A., and Casaccia-Bonnel, P. (2007). The transcription factor Yin Yang 1 is essential for oligodendrocyte progenitor differentiation. *Neuron* 55, 217-230.
- Hendricks, W.A., Pak, E.S., Owensby, J.P., Menta, K.J., Glazova, M., Moretto, J., Hollis, S., Brewer, K.L., and Murashov, A.K. (2006). Predifferentiated embryonic stem cells prevent chronic pain behaviors and restore sensory function following spinal cord injury in mice. *Mol Med* 12, 34-46.
- Hermanson, O., Jepsen, K., and Rosenfeld, M.G. (2002). N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes. *Nature* 419, 934-939.
- Hochstim, C., Deneen, B., Lukaszewicz, A., Zhou, Q., and Anderson, D.J. (2008). Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain code. *Cell* 133, 510-522.
- Hofstetter, C.P., Holmstrom, N.A., Lilja, J.A., Schweinhardt, P., Hao, J., Spenger, C., Wiesenfeld-Hallin, Z., Kurpad, S.N., Frisen, J., and Olson, L. (2005). Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nature neuroscience* 8, 346-353.
- Honore, A., Le Corre, S., Derambure, C., Normand, R., Duclos, C., Boyer, O., Marie, J.P., and Guerout, N. (2012). Isolation, characterization, and genetic profiling of subpopulations of olfactory ensheathing cells from the olfactory bulb. *Glia* 60, 404-413.
- Horky, L.L., Galimi, F., Gage, F.H., and Horner, P.J. (2006). Fate of endogenous stem/progenitor cells following spinal cord injury. *J Comp Neurol* 498, 525-538.
- Horner, P.J., and Gage, F.H. (2000). Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 407, 963-970.
- Horner, P.J., Power, A.E., Kempermann, G., Kuhn, H.G., Palmer, T.D., Winkler, J., Thal, L.J., and Gage, F.H. (2000). Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci* 20, 2218-2228.
- Hoshina, N., Tezuka, T., Yokoyama, K., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., and Yamamoto, T. (2007). Focal adhesion kinase regulates laminin-induced oligodendroglial process outgrowth. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 12, 1245-1254.
- Huang, A.L., Chen, X., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Guo, W., Trankner, D., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2006). The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442, 934-938.
- Hugnot, J.P. (2012). The Spinal Cord Neural Stem Cell Niche. In *Tech Neural Stem Cells and Therapy*.
- Hwang, I., Hahm, S.C., Choi, K.A., Park, S.H., Jeong, H., Yea, J.H., Kim, J., and Hong, S. (2016). Intrathecal Transplantation of Embryonic Stem Cell-Derived Spinal GABAergic Neural Precursor Cells Attenuates Neuropathic Pain in a Spinal Cord Injury Rat Model. *Cell transplantation* 25, 593-607.
- Iglesias-Rozas, J.R., and Garrosa, M. (2012). The discovery of oligodendroglia cells by Rio-Hortega: his original articles. 1921. *Clin Neuropathol* 31, 437-439.
- Iosif, R.E., Ekdahl, C.T., Ahlenius, H., Pronk, C.J., Bonde, S., Kokaia, Z., Jacobsen, S.E., and Lindvall, O. (2006). Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 9703-9712.
- Ishibashi, T., Dakin, K.A., Stevens, B., Lee, P.R., Kozlov, S.V., Stewart, C.L., and Fields, R.D. (2006). Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron* 49, 823-832.

- Iwai, H., Shimada, H., Nishimura, S., Kobayashi, Y., Itakura, G., Hori, K., Hikishima, K., Ebise, H., Negishi, N., Shibata, S., *et al.* (2015). Allogeneic Neural Stem/Progenitor Cells Derived From Embryonic Stem Cells Promote Functional Recovery After Transplantation Into Injured Spinal Cord of Nonhuman Primates. *Stem Cells Transl Med* 4, 708-719.
- Jackman, N., Ishii, A., and Bansal, R. (2009). Oligodendrocyte development and myelin biogenesis: parsing out the roles of glycosphingolipids. *Physiology* 24, 290-297.
- Jacquet, B.V., Muthusamy, N., Sommerville, L.J., Xiao, G., Liang, H., Zhang, Y., Holtzman, M.J., and Ghashghaei, H.T. (2011). Specification of a Foxj1-dependent lineage in the forebrain is required for embryonic-to-postnatal transition of neurogenesis in the olfactory bulb. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 9368-9382.
- Jacquet, B.V., Salinas-Mondragon, R., Liang, H., Therit, B., Buie, J.D., Dykstra, M., Campbell, K., Ostrowski, L.E., Brody, S.L., and Ghashghaei, H.T. (2009). FoxJ1-dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain. *Development* 136, 4021-4031.
- Jimenez, A.J., Dominguez-Pinos, M.D., Guerra, M.M., Fernandez-Llebrez, P., and Perez-Figares, J.M. (2014). Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers* 2, e28426.
- Johansson, C.B., Momma, S., Clarke, D.L., Risling, M., Lendahl, U., and Frisen, J. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96, 25-34.
- Johe, K.K., Hazel, T.G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M.M., and McKay, R.D. (1996). Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes & development* 10, 3129-3140.
- Jordan, V.C. (2007). New insights into the metabolism of tamoxifen and its role in the treatment and prevention of breast cancer. *Steroids* 72, 829-842.
- Kang, M.K., and Kang, S.K. (2008). Interleukin-6 induces proliferation in adult spinal cord-derived neural progenitors via the JAK2/STAT3 pathway with EGF-induced MAPK phosphorylation. *Cell proliferation* 41, 377-392.
- Kanno, H., Pearse, D.D., Ozawa, H., Itoi, E., and Bunge, M.B. (2015). Schwann cell transplantation for spinal cord injury repair: its significant therapeutic potential and prospectus. *Rev Neurosci* 26, 121-128.
- Kanno, H., Pressman, Y., Moody, A., Berg, R., Muir, E.M., Rogers, J.H., Ozawa, H., Itoi, E., Pearse, D.D., and Bunge, M.B. (2014). Combination of engineered Schwann cell grafts to secrete neurotrophin and chondroitinase promotes axonal regeneration and locomotion after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34, 1838-1855.
- Karimi-Abdolrezaee, S., Eftekharpour, E., Wang, J., Schut, D., and Fehlings, M.G. (2010). Synergistic effects of transplanted adult neural stem/progenitor cells, chondroitinase, and growth factors promote functional repair and plasticity of the chronically injured spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 1657-1676.
- Keirstead, H.S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu, M., Cloutier, F., Sharp, K., and Steward, O. (2005). Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 4694-4705.
- Kettenmann, H., and Ransom, B.R. (2013). *Neuroglia*, Third Edition edn.
- Kettenmann, H., and Verkhratsky, A. (2008). Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci* 31, 653-659.
- Khankan, R.R., Griffis, K.G., Haggerty-Skeans, J.R., Zhong, H., Roy, R.R., Edgerton, V.R., and Phelps, P.E. (2016). Olfactory Ensheathing Cell Transplantation after a Complete Spinal Cord Transection Mediates Neuroprotective and Immunomodulatory Mechanisms to Facilitate Regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36, 6269-6286.
- Kiernan, J.A. (1979). Hypotheses concerned with axonal regeneration in the mammalian nervous system. *Biol Rev Camb Philos Soc* 54, 155-197.
- Kigerl, K.A., McGaughy, V.M., and Popovich, P.G. (2006). Comparative analysis of lesion development and intraspinal inflammation in four strains of mice following spinal contusion injury. *J Comp Neurol* 494, 578-594.

- Kiss, J.Z., Wang, C., Olive, S., Rougon, G., Lang, J., Baetens, D., Harry, D., and Pralong, W.F. (1994). Activity-dependent mobilization of the adhesion molecule polysialic NCAM to the cell surface of neurons and endocrine cells. *The EMBO journal* *13*, 5284-5292.
- Klusman, I., and Schwab, M.E. (1997). Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Res* *762*, 173-184.
- Kobayashi, K., Imagama, S., Ohgomori, T., Hirano, K., Uchimura, K., Sakamoto, K., Hirakawa, A., Takeuchi, H., Suzumura, A., Ishiguro, N., *et al.* (2013). Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell death & disease* *4*, e525.
- Koenning, M., Jackson, S., Hay, C.M., Faux, C., Kilpatrick, T.J., Willingham, M., and Emery, B. (2012). Myelin gene regulatory factor is required for maintenance of myelin and mature oligodendrocyte identity in the adult CNS. *J Neurosci* *32*, 12528-12542.
- Koizumi, S., Fujishita, K., and Inoue, K. (2005). Regulation of cell-to-cell communication mediated by astrocytic ATP in the CNS. *Purinergic signalling* *1*, 211-217.
- Kojima, A., and Tator, C.H. (2002). Intrathecal administration of epidermal growth factor and fibroblast growth factor 2 promotes ependymal proliferation and functional recovery after spinal cord injury in adult rats. *Journal of neurotrauma* *19*, 223-238.
- Kölliker, A., and Ebner, V.v. (1889). *Handbuch der Gewebelehre des Menschen* (Leipzig: W. Engelmann).
- Kraft, A., Jubal, E.R., von Laer, R., Doring, C., Rocha, A., Grebbin, M., Zenke, M., Kettenmann, H., Stroh, A., and Momma, S. (2017). Astrocytic Calcium Waves Signal Brain Injury to Neural Stem and Progenitor Cells. *Stem cell reports* *8*, 701-714.
- Kuga, N., Sasaki, T., Takahara, Y., Matsuki, N., and Ikegaya, Y. (2011). Large-scale calcium waves traveling through astrocytic networks in vivo. *J Neurosci* *31*, 2607-2614.
- Kunzelmann, P., Schroder, W., Traub, O., Steinhauser, C., Dermietzel, R., and Willecke, K. (1999). Late onset and increasing expression of the gap junction protein connexin30 in adult murine brain and long-term cultured astrocytes. *Glia* *25*, 111-119.
- Kuspert, M., Hammer, A., Bosl, M.R., and Wegner, M. (2011). Olig2 regulates Sox10 expression in oligodendrocyte precursors through an evolutionary conserved distal enhancer. *Nucleic acids research* *39*, 1280-1293.
- Kyritsis, N., Kizil, C., Zocher, S., Kroehne, V., Kaslin, J., Freudenreich, D., Iltzsche, A., and Brand, M. (2012). Acute inflammation initiates the regenerative response in the adult zebrafish brain. *Science* *338*, 1353-1356.
- Lacroix, S., Hamilton, L.K., Vaugeois, A., Beaudoin, S., Breault-Dugas, C., Pineau, I., Levesque, S.A., Gregoire, C.A., and Fernandes, K.J. (2014). Central canal ependymal cells proliferate extensively in response to traumatic spinal cord injury but not demyelinating lesions. *PloS one* *9*, e85916.
- Lafrenaye, A.D., and Fuss, B. (2010). Focal adhesion kinase can play unique and opposing roles in regulating the morphology of differentiating oligodendrocytes. *J Neurochem* *115*, 269-282.
- Lajat, Y., Bensignor le Henaff, M., Heyman, D., Menegalli-Boggelli, D., Mitard, D., and Resche, F. (1994). Anatomie de l'Espace Epidural et ses implications dans le traitement de la douleur. *Douleur et Analgésie* *7*, 51.
- Lakatos, A., Barnett, S.C., and Franklin, R.J. (2003a). Olfactory ensheathing cells induce less host astrocyte response and chondroitin sulphate proteoglycan expression than Schwann cells following transplantation into adult CNS white matter. *Experimental neurology* *184*, 237-246.
- Lakatos, A., Franklin, R.J., and Barnett, S.C. (2000). Olfactory ensheathing cells and Schwann cells differ in their in vitro interactions with astrocytes. *Glia* *32*, 214-225.
- Lakatos, A., Smith, P.M., Barnett, S.C., and Franklin, R.J. (2003b). Meningeal cells enhance limited CNS remyelination by transplanted olfactory ensheathing cells. *Brain : a journal of neurology* *126*, 598-609.
- Landmesser, L., Dahm, L., Tang, J.C., and Rutishauser, U. (1990). Polysialic acid as a regulator of intramuscular nerve branching during embryonic development. *Neuron* *4*, 655-667.
- Lankford, K.L., Sasaki, M., Radtke, C., and Kocsis, J.D. (2008). Olfactory ensheathing cells exhibit unique migratory, phagocytic, and myelinating properties in the X-irradiated spinal cord not shared by Schwann cells. *Glia* *56*, 1664-1678.

- Laule, C., Vavasour, I.M., Kolind, S.H., Li, D.K., Traboulsee, T.L., Moore, G.R., and MacKay, A.L. (2007). Magnetic resonance imaging of myelin. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 4, 460-484.
- Laursen, L.S., Chan, C.W., and Ffrench-Constant, C. (2011). Translation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes is regulated by integrin activation and hnRNP-K. *J Cell Biol* 192, 797-811.
- Lazzari, M., Bettini, S., and Franceschini, V. (2014). Immunocytochemical characterisation of olfactory ensheathing cells of zebrafish. *Journal of anatomy* 224, 192-206.
- Lee, S.W., Kim, W.J., Choi, Y.K., Song, H.S., Son, M.J., Gelman, I.H., Kim, Y.J., and Kim, K.W. (2003). SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat Med* 9, 900-906.
- Lehner, B., Sandner, B., Marschallinger, J., Lehner, C., Furtner, T., Couillard-Despres, S., Rivera, F.J., Brockhoff, G., Bauer, H.C., Weidner, N., *et al.* (2011). The dark side of BrdU in neural stem cell biology: detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival. *Cell and tissue research* 345, 313-328.
- Leung, J.Y., Chapman, J.A., Harris, J.A., Hale, D., Chung, R.S., West, A.K., and Chuah, M.I. (2008). Olfactory ensheathing cells are attracted to, and can endocytose, bacteria. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65, 2732-2739.
- Leybaert, L., Paemeleire, K., Strahonja, A., and Sanderson, M.J. (1998). Inositol-trisphosphate-dependent intercellular calcium signaling in and between astrocytes and endothelial cells. *Glia* 24, 398-407.
- Leybaert, L., and Sanderson, M.J. (2012). Intercellular Ca(2+) waves: mechanisms and function. *Physiol Rev* 92, 1359-1392.
- Li, B.C., Xu, C., Zhang, J.Y., Li, Y., and Duan, Z.X. (2012). Differing Schwann cells and olfactory ensheathing cells behaviors, from interacting with astrocyte, produce similar improvements in contused rat spinal cord's motor function. *J Mol Neurosci* 48, 35-44.
- Li, G.L., Farooque, M., Holtz, A., and Olsson, Y. (1999). Apoptosis of oligodendrocytes occurs for long distances away from the primary injury after compression trauma to rat spinal cord. *Acta neuropathologica* 98, 473-480.
- Li, J.Y., Christophersen, N.S., Hall, V., Soulet, D., and Brundin, P. (2008). Critical issues of clinical human embryonic stem cell therapy for brain repair. *Trends in neurosciences* 31, 146-153.
- Li, S., Wang, X., Ma, Q.H., Yang, W.L., Zhang, X.G., Dawe, G.S., and Xiao, Z.C. (2016a). Amyloid precursor protein modulates Nav1.6 sodium channel currents through a Go-coupled JNK pathway. *Sci Rep* 6, 39320.
- Li, X., Floriddia, E.M., Toskas, K., Fernandes, K.J., Guerout, N., and Barnabe-Heider, F. (2016b). Regenerative Potential of Ependymal Cells for Spinal Cord Injuries Over Time. *EBioMedicine* 13, 55-65.
- Liang, X., Draghi, N.A., and Resh, M.D. (2004). Signaling from integrins to Fyn to Rho family GTPases regulates morphologic differentiation of oligodendrocytes. *J Neurosci* 24, 7140-7149.
- Lipson, A.C., Widenfalk, J., Lindqvist, E., Ebendal, T., and Olson, L. (2003). Neurotrophic properties of olfactory ensheathing glia. *Experimental neurology* 180, 167-171.
- Liu, Z., Fan, Y., Won, S.J., Neumann, M., Hu, D., Zhou, L., Weinstein, P.R., and Liu, J. (2007). Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia. *Stroke* 38, 146-152.
- Lodish, H.F., A. Berk, C. Kaiser, M. Krieger, M. Scott, A. Bretscher, H. Ploegh, and P. Matsudaira (2008). *Molecular Cell Biology*, 6th edition (W. H. Freeman and Company, N.Y.).
- Lopez-Vales, R., Garcia-Alias, G., Fores, J., Vela, J.M., Navarro, X., and Verdu, E. (2004). Transplanted olfactory ensheathing cells modulate the inflammatory response in the injured spinal cord. *Neuron glia biology* 1, 201-209.
- Lovatt, D., Sonnewald, U., Waagepetersen, H.S., Schousboe, A., He, W., Lin, J.H., Han, X., Takano, T., Wang, S., Sim, F.J., *et al.* (2007). The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *J Neurosci* 27, 12255-12266.
- Lu, P. (2017). Stem cell transplantation for spinal cord injury repair. *Progress in brain research* 231, 1-32.
- Lu, P., Jones, L.L., Snyder, E.Y., and Tuszynski, M.H. (2003). Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Experimental neurology* 181, 115-129.

- Lu, P., Wang, Y., Graham, L., McHale, K., Gao, M., Wu, D., Brock, J., Blesch, A., Rosenzweig, E.S., Havton, L.A., *et al.* (2012). Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury. *Cell* 150, 1264-1273.
- Lu, P., Woodruff, G., Wang, Y., Graham, L., Hunt, M., Wu, D., Boehle, E., Ahmad, R., Poplawski, G., Brock, J., *et al.* (2014). Long-distance axonal growth from human induced pluripotent stem cells after spinal cord injury. *Neuron* 83, 789-796.
- Lukovic, D., Stojkovic, M., Moreno-Manzano, V., Jendelova, P., Sykova, E., Bhattacharya, S.S., and Erceg, S. (2015). Concise review: reactive astrocytes and stem cells in spinal cord injury: good guys or bad guys? *Stem cells* 33, 1036-1041.
- Lunn, K.F., Baas, P.W., and Duncan, I.D. (1997). Microtubule organization and stability in the oligodendrocyte. *J Neurosci* 17, 4921-4932.
- Luo, J., and Miller, M.W. (1999). Transforming growth factor beta1-regulated cell proliferation and expression of neural cell adhesion molecule in B104 neuroblastoma cells: differential effects of ethanol. *Journal of neurochemistry* 72, 2286-2293.
- Mackay-Sim, A. (2005). Olfactory ensheathing cells and spinal cord repair. *Keio J Med* 54, 8-14.
- Macklin, W.B., Campagnoni, C.W., Deininger, P.L., and Gardinier, M.V. (1987). Structure and expression of the mouse myelin proteolipid protein gene. *J Neurosci Res* 18, 383-394.
- Magnusson, J.P., Goritz, C., Tatarishvili, J., Dias, D.O., Smith, E.M., Lindvall, O., Kokaia, Z., and Frisen, J. (2014). A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse. *Science* 346, 237-241.
- Malgieri, A., Kantzari, E., Patrizi, M.P., and Gambardella, S. (2010). Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *Int J Clin Exp Med* 3, 248-269.
- Marichal, N., Garcia, G., Radmilovich, M., Trujillo-Cenoz, O., and Russo, R.E. (2009). Enigmatic central canal contacting cells: immature neurons in "standby mode"? *J Neurosci* 29, 10010-10024.
- Martens, D.J., Seaberg, R.M., and van der Kooy, D. (2002). In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord. *Eur J Neurosci* 16, 1045-1057.
- Mautes, A.E., Weinzierl, M.R., Donovan, F., and Noble, L.J. (2000). Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis. *Physical therapy* 80, 673-687.
- Mayeur, A., Duclos, C., Honore, A., Gauberti, M., Drouot, L., do Rego, J.C., Bon-Mardion, N., Jean, L., Verin, E., Emery, E., *et al.* (2013). Potential of olfactory ensheathing cells from different sources for spinal cord repair. *PLoS one* 8, e62860.
- McDonald, J.W., and Sadowsky, C. (2002). Spinal-cord injury. *Lancet* 359, 417-425.
- McLellan, M.A., Rosenthal, N.A., and Pinto, A.R. (2017). Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Current protocols in mouse biology* 7, 1-12.
- Meletis, K., Barnabe-Heider, F., Carlen, M., Evergren, E., Tomilin, N., Shupliakov, O., and Frisen, J. (2008). Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS biology* 6, e182.
- Mi, H., Haeberle, H., and Barres, B.A. (2001). Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J Neurosci* 21, 1538-1547.
- Mi, S., Miller, R.H., Lee, X., Scott, M.L., Shulag-Morskaya, S., Shao, Z., Chang, J., Thill, G., Levesque, M., Zhang, M., *et al.* (2005). LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci* 8, 745-751.
- Middeldorp, J., and Hol, E.M. (2011). GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 93, 421-443.
- Miller, R.H. (2002). Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol* 67, 451-467.
- Mirsky, R., Jessen, K.R., Brennan, A., Parkinson, D., Dong, Z., Meier, C., Parmantier, E., and Lawson, D. (2002). Schwann cells as regulators of nerve development. *J Physiol Paris* 96, 17-24.
- Mitew, S., Hay, C.M., Peckham, H., Xiao, J., Koening, M., and Emery, B. (2014). Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin. *Neuroscience* 276, 29-47.
- Mokalled, M.H., Patra, C., Dickson, A.L., Endo, T., Stainier, D.Y., and Poss, K.D. (2016). Injury-induced *ctgfa* directs glial bridging and spinal cord regeneration in zebrafish. *Science* 354, 630-634.

- Momeni, H.R. (2011). Role of calpain in apoptosis. *Cell journal* 13, 65-72.
- Morell, P., and Norton, W.T. (1980). Myelin. *Scientific American* 242, 88-90, 92, 96 passim.
- Morgello, S., Uson, R.R., Schwartz, E.J., and Haber, R.S. (1995). The human blood-brain barrier glucose transporter (GLUT1) is a glucose transporter of gray matter astrocytes. *Glia* 14, 43-54.
- Mothe, A.J., Bozkurt, G., Catapano, J., Zabojska, J., Wang, X., Keating, A., and Tator, C.H. (2011). Intrathecal transplantation of stem cells by lumbar puncture for thoracic spinal cord injury in the rat. *Spinal Cord* 49, 967-973.
- Mothe, A.J., and Tator, C.H. (2005). Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in the adult rat. *Neuroscience* 131, 177-187.
- Mothe, A.J., and Tator, C.H. (2013). Review of transplantation of neural stem/progenitor cells for spinal cord injury. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 31, 701-713.
- Muthusamy, N., Vijayakumar, A., Cheng, G., Jr., and Ghashghaei, H.T. (2014). A knock-in Foxj1(CreERT2::GFP) mouse for recombination in epithelial cells with motile cilia. *Genesis* 52, 350-358.
- Nagoshi, N., Shibata, S., Hamanoue, M., Mabuchi, Y., Matsuzaki, Y., Toyama, Y., Nakamura, M., and Okano, H. (2011). Schwann cell plasticity after spinal cord injury shown by neural crest lineage tracing. *Glia* 59, 771-784.
- Nagy, J.I., and Rash, J.E. (2003). Astrocyte and oligodendrocyte connexins of the glial syncytium in relation to astrocyte anatomical domains and spatial buffering. *Cell Commun Adhes* 10, 401-406.
- Nakagomi, T., Molnar, Z., Nakano-Doi, A., Taguchi, A., Saino, O., Kubo, S., Clausen, M., Yoshikawa, H., Nakagomi, N., and Matsuyama, T. (2011). Ischemia-induced neural stem/progenitor cells in the pia mater following cortical infarction. *Stem Cells Dev* 20, 2037-2051.
- Nash, H.H., Borke, R.C., and Anders, J.J. (2001). New method of purification for establishing primary cultures of ensheathing cells from the adult olfactory bulb. *Glia* 34, 81-87.
- Nazareth, L., Lineburg, K.E., Chuah, M.I., Tello Velasquez, J., Chehrehasa, F., St John, J.A., and Ekberg, J.A. (2015). Olfactory ensheathing cells are the main phagocytic cells that remove axon debris during early development of the olfactory system. *The Journal of comparative neurology* 523, 479-494.
- Nedergaard, M., Ransom, B., and Goldman, S.A. (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends in neurosciences* 26, 523-530.
- Neirinckx, V., Coste, C., Franzen, R., Gothot, A., Rogister, B., and Wislet, S. (2014). Neutrophil contribution to spinal cord injury and repair. *Journal of neuroinflammation* 11, 150.
- Netter, F.H. (2006). Atlas of human anatomy.
- Noble, L.J., and Wrathall, J.R. (1989). Distribution and time course of protein extravasation in the rat spinal cord after contusive injury. *Brain Res* 482, 57-66.
- Nogradi, A., Pajer, K., and Marton, G. (2011). The role of embryonic motoneuron transplants to restore the lost motor function of the injured spinal cord. *Ann Anat* 193, 362-370.
- Nomura, H., Kim, H., Mothe, A., Zahir, T., Kulbatski, I., Morshead, C.M., Shoichet, M.S., and Tator, C.H. (2010). Endogenous radial glial cells support regenerating axons after spinal cord transection. *Neuroreport* 21, 871-876.
- Norenberg, M.D. (1979). Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *J Histochem Cytochem* 27, 756-762.
- Norton, W.T. (1984). Recent advances in myelin biochemistry. *Ann N Y Acad Sci* 436, 5-10.
- Nutt, S.E., Chang, E.A., Suhr, S.T., Schlosser, L.O., Mondello, S.E., Moritz, C.T., Cibelli, J.B., and Horner, P.J. (2013). Caudalized human iPSC-derived neural progenitor cells produce neurons and glia but fail to restore function in an early chronic spinal cord injury model. *Experimental neurology* 248, 491-503.
- O'Shea, T.M., Burda, J.E., and Sofroniew, M.V. (2017). Cell biology of spinal cord injury and repair. *J Clin Invest* 127, 3259-3270.
- O'Toole, D.A., West, A.K., and Chuah, M.I. (2007). Effect of olfactory ensheathing cells on reactive astrocytes in vitro. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64, 1303-1309.

- Oberheim, N.A., Goldman, S.A., and Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol* 814, 23-45.
- Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J.D., Pilcher, W., Ojemann, J.G., *et al.* (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci* 29, 3276-3287.
- Ogata, K., and Kosaka, T. (2002). Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience* 113, 221-233.
- Ohori, Y., Yamamoto, S., Nagao, M., Sugimori, M., Yamamoto, N., Nakamura, K., and Nakafuku, M. (2006). Growth factor treatment and genetic manipulation stimulate neurogenesis and oligodendrogenesis by endogenous neural progenitors in the injured adult spinal cord. *J Neurosci* 26, 11948-11960.
- Okano-Uchida, T., Naruse, M., Ikezawa, T., Shibasaki, K., and Ishizaki, Y. (2013). Cerebellar neural stem cells differentiate into two distinct types of astrocytes in response to CNTF and BMP2. *Neuroscience letters* 552, 15-20.
- Ostrowski, L.E., Hutchins, J.R., Zakel, K., and O'Neal, W.K. (2003). Targeting expression of a transgene to the airway surface epithelium using a ciliated cell-specific promoter. *Mol Ther* 8, 637-645.
- Oudega, M., and Perez, M.A. (2012). Corticospinal reorganization after spinal cord injury. *J Physiol* 590, 3647-3663.
- Oudega, M., and Xu, X.M. (2006). Schwann cell transplantation for repair of the adult spinal cord. *Journal of neurotrauma* 23, 453-467.
- Oyinbo, C.A. (2011). Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta neurobiologiae experimentalis* 71, 281-299.
- Ozgen, H., Baron, W., Hoekstra, D., and Kahya, N. (2016). Oligodendroglial membrane dynamics in relation to myelin biogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73, 3291-3310.
- Pallini, R., Vitiani, L.R., Bez, A., Casalbore, P., Facchiano, F., Di Giorgi Gerevini, V., Falchetti, M.L., Fernandez, E., Maira, G., Peschle, C., *et al.* (2005). Homologous transplantation of neural stem cells to the injured spinal cord of mice. *Neurosurgery* 57, 1014-1025; discussion 1014-1025.
- Panayiotou, E., and Malas, S. (2013). Adult spinal cord ependymal layer: a promising pool of quiescent stem cells to treat spinal cord injury. *Frontiers in physiology* 4, 340.
- Panni, P., Ferguson, I.A., Beacham, I., Mackay-Sim, A., Ekberg, J.A., and St John, J.A. (2013). Phagocytosis of bacteria by olfactory ensheathing cells and Schwann cells. *Neuroscience letters* 539, 65-70.
- Pansky, B. (1982). *Review of medical embryology.*, Vol 6th edition (New York: Macmillan.).
- Park, E., Velumian, A.A., and Fehlings, M.G. (2004). The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *Journal of neurotrauma* 21, 754-774.
- Park, H.W., Lim, M.J., Jung, H., Lee, S.P., Paik, K.S., and Chang, M.S. (2010). Human mesenchymal stem cell-derived Schwann cell-like cells exhibit neurotrophic effects, via distinct growth factor production, in a model of spinal cord injury. *Glia* 58, 1118-1132.
- Pasinelli, P., and Brown, R.H. (2006). Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nature reviews Neuroscience* 7, 710-723.
- Pastrana, E., Moreno-Flores, M.T., Avila, J., Wandosell, F., Minichiello, L., and Diaz-Nido, J. (2007). BDNF production by olfactory ensheathing cells contributes to axonal regeneration of cultured adult CNS neurons. *Neurochemistry international* 50, 491-498.
- Paviot, A., Guerout, N., Bon-Mardion, N., Duclos, C., Jean, L., Boyer, O., and Marie, J.P. (2011). Efficiency of laryngeal motor nerve repair is greater with bulbar than with mucosal olfactory ensheathing cells. *Neurobiol Dis* 41, 688-694.
- Pellerin, L. (2010). Food for thought: the importance of glucose and other energy substrates for sustaining brain function under varying levels of activity. *Diabetes Metab* 36 Suppl 3, S59-63.
- Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10625-10629.
- Peschl, P., Bradl, M., Hoftberger, R., Berger, T., and Reindl, M. (2017). Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein: Deciphering a Target in Inflammatory Demyelinating Diseases. *Frontiers in immunology* 8, 529.

- Peters, A., Palay, S.L., and Webster, H.F. (1991). The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells (Oxford University Press).
- Petit, A., Sanders, A.D., Kennedy, T.E., Tetzlaff, W., Glattfelder, K.J., Dalley, R.A., Puchalski, R.B., Jones, A.R., and Roskams, A.J. (2011). Adult spinal cord radial glia display a unique progenitor phenotype. *PloS one* 6, e24538.
- Pineau, I., and Lacroix, S. (2007). Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *The Journal of comparative neurology* 500, 267-285.
- Poliak, S., Salomon, D., Elhanany, H., Sabanay, H., Kiernan, B., Pevny, L., Stewart, C.L., Xu, X., Chiu, S.Y., Shrager, P., *et al.* (2003). Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K<sup>+</sup> channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *The Journal of cell biology* 162, 1149-1160.
- Qian, L., Berry, E.C., Fu, J.D., Ieda, M., and Srivastava, D. (2013). Reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocyte-like cells in vitro. *Nature protocols* 8, 1204-1215.
- Qian, L., and Srivastava, D. (2013). Direct cardiac reprogramming: from developmental biology to cardiac regeneration. *Circulation research* 113, 915-921.
- Qin, Y., Zhang, W., and Yang, P. (2015). Current states of endogenous stem cells in adult spinal cord. *J Neurosci Res* 93, 391-398.
- Quarles, R.H. (1997). Glycoproteins of myelin sheaths. *Journal of molecular neuroscience : MN* 8, 1-12.
- Quarles, R.H. (2002). Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59, 1851-1871.
- Ramsauer, M., Krause, D., and Dermietzel, R. (2002). Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *FASEB J* 16, 1274-1276.
- Ransom, B.R., and Sontheimer, H. (1992). The neurophysiology of glial cells. *J Clin Neurophysiol* 9, 224-251.
- Rasband, M.N. (2010). Clustered K<sup>+</sup> channel complexes in axons. *Neurosci Lett* 486, 101-106.
- Rasband, M.N. (2016). Glial Contributions to Neural Function and Disease. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 15, 355-361.
- Rasband, M.N., and Peles, E. (2015). The Nodes of Ranvier: Molecular Assembly and Maintenance. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 8, a020495.
- Ray, J., and Gage, F.H. (1994). Spinal cord neuroblasts proliferate in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 14, 3548-3564.
- Reece, J.B., Meyers, N., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V., Jackson, R.B., and Cooke, B.N. (2015). *Campbell biology Tenth Edition (Australian version) edn (Frenchs Forest, N.S.W. Pearson Australia)*.
- Rela, L., Bordey, A., and Greer, C.A. (2010). Olfactory ensheathing cell membrane properties are shaped by connectivity. *Glia* 58, 665-678.
- Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T.M., Burda, J.E., Bernstein, A.M., Brumm, A.J., Muthusamy, N., Ghashghaei, H.T., Carmichael, S.T., Cheng, L., *et al.* (2017). Ependymal cell contribution to scar formation after spinal cord injury is minimal, local and dependent on direct ependymal injury. *Sci Rep* 7, 41122.
- Resnick, D.K. (2013). Updated Guidelines for the Management of Acute Cervical Spine and Spinal Cord Injury. *Neurosurgery* 72 *Suppl* 2, 1.
- Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96, 414-495.
- Richardson, W.D., Kessaris, N., and Pringle, N. (2006). Oligodendrocyte wars. *Nat Rev Neurosci* 7, 11-18.
- Richardson, W.D., Pringle, N.P., Yu, W.P., and Hall, A.C. (1997). Origins of spinal cord oligodendrocytes: possible developmental and evolutionary relationships with motor neurons. *Developmental neuroscience* 19, 58-68.
- Richardson, W.D., Young, K.M., Tripathi, R.B., and McKenzie, I. (2011). NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy? *Neuron* 70, 661-673.
- Rivers, L.E., Young, K.M., Rizzi, M., Jamen, F., Psachoulia, K., Wade, A., Kessaris, N., and Richardson, W.D. (2008). PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci* 11, 1392-1401.

- Roessmann, U., Velasco, M.E., Sindely, S.D., and Gambetti, P. (1980). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymal cells during development. An immunocytochemical study. *Brain Res* 200, 13-21.
- Rolls, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R., and Schwartz, M. (2007). Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nature cell biology* 9, 1081-1088.
- Rossi, S.L., Nistor, G., Wyatt, T., Yin, H.Z., Poole, A.J., Weiss, J.H., Gardener, M.J., Dijkstra, S., Fischer, D.F., and Keirstead, H.S. (2010). Histological and functional benefit following transplantation of motor neuron progenitors to the injured rat spinal cord. *PloS one* 5, e11852.
- Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., and Kuncl, R.W. (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13, 713-725.
- Rowitch, D.H., and Kriegstein, A.R. (2010). Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468, 214-222.
- Rowland, J.W., Hawryluk, G.W., Kwon, B., and Fehlings, M.G. (2008). Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurgical focus* 25, E2.
- Roy, C.S., and Sherrington, C.S. (1890). On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *J Physiol* 11, 85-158 117.
- Rusakov, D.A. (2015). Disentangling calcium-driven astrocyte physiology. *Nat Rev Neurosci* 16, 226-233.
- Rush, A.M., Cummins, T.R., and Waxman, S.G. (2007). Multiple sodium channels and their roles in electrogenesis within dorsal root ganglion neurons. *J Physiol* 579, 1-14.
- Sabelstrom, H., Stenudd, M., and Frisen, J. (2014). Neural stem cells in the adult spinal cord. *Experimental neurology* 260, 44-49.
- Sabelstrom, H., Stenudd, M., Reu, P., Dias, D.O., Elfineh, M., Zdunek, S., Damberg, P., Goritz, C., and Frisen, J. (2013). Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science* 342, 637-640.
- Saberi, H., Firouzi, M., Habibi, Z., Moshayedi, P., Aghayan, H.R., Arjmand, B., Hosseini, K., Razavi, H.E., and Yekaninejad, M.S. (2011). Safety of intramedullary Schwann cell transplantation for postrehabilitation spinal cord injuries: 2-year follow-up of 33 cases. *Journal of neurosurgery Spine* 15, 515-525.
- Sabourin, J.C., Ackema, K.B., Ohayon, D., Guichet, P.O., Perrin, F.E., Garcés, A., Ripoll, C., Charite, J., Simonneau, L., Kettenmann, H., *et al.* (2009). A mesenchymal-like ZEB1(+) niche harbors dorsal radial glial fibrillary acidic protein-positive stem cells in the spinal cord. *Stem Cells* 27, 2722-2733.
- Sachewsky, N., Leeder, R., Xu, W., Rose, K.L., Yu, F., van der Kooy, D., and Morshead, C.M. (2014). Primitive neural stem cells in the adult mammalian brain give rise to GFAP-expressing neural stem cells. *Stem cell reports* 2, 810-824.
- Saher, G., Brugger, B., Lappe-Siefke, C., Mobius, W., Tozawa, R., Wehr, M.C., Wieland, F., Ishibashi, S., and Nave, K.A. (2005). High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat Neurosci* 8, 468-475.
- Saher, G., and Simons, M. (2010). Cholesterol and myelin biogenesis. *Sub-cellular biochemistry* 51, 489-508.
- Saker, E., Henry, B.M., Tomaszewski, K.A., Loukas, M., Iwanaga, J., Oskouian, R.J., and Tubbs, R.S. (2016). The Human Central Canal of the Spinal Cord: A Comprehensive Review of its Anatomy, Embryology, Molecular Development, Variants, and Pathology. *Cureus* 8, e927.
- Salewski, R.P., Buttigieg, J., Mitchell, R.A., van der Kooy, D., Nagy, A., and Fehlings, M.G. (2013). The generation of definitive neural stem cells from PiggyBac transposon-induced pluripotent stem cells can be enhanced by induction of the NOTCH signaling pathway. *Stem Cells Dev* 22, 383-396.
- Schummers, J., Yu, H., and Sur, M. (2008). Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science* 320, 1638-1643.
- Schwab, J.M., Brechtel, K., Nguyen, T.D., and Schluesener, H.J. (2000). Persistent accumulation of cyclooxygenase-1 (COX-1) expressing microglia/macrophages and upregulation by endothelium following spinal cord injury. *J Neuroimmunol* 111, 122-130.
- Seidenfaden, R., Desoeuvre, A., Bosio, A., Virard, I., and Cremer, H. (2006). Glial conversion of SVZ-derived committed neuronal precursors after ectopic grafting into the adult brain. *Molecular and cellular neurosciences* 32, 187-198.

- Sethi, R., Sethi, R., Redmond, A., and Lavik, E. (2014). Olfactory ensheathing cells promote differentiation of neural stem cells and robust neurite extension. *Stem cell reviews* 10, 772-785.
- Setoguchi, T., and Kondo, T. (2004). Nuclear export of OLIG2 in neural stem cells is essential for ciliary neurotrophic factor-induced astrocyte differentiation. *The Journal of cell biology* 166, 963-968.
- Sevc, J., Daxnerova, Z., Hanova, V., and Koval, J. (2011). Novel observations on the origin of ependymal cells in the ventricular zone of the rat spinal cord. *Acta histochemica* 113, 156-162.
- Shechter, R., Ziv, Y., and Schwartz, M. (2007). New GABAergic interneurons supported by myelin-specific T cells are formed in intact adult spinal cord. *Stem cells* 25, 2277-2282.
- Sheerin, F. (2004). Spinal cord injury: anatomy and physiology of the spinal cord. *Emerg Nurse* 12, 30-36.
- Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S.M., Goderie, S.K., Roysam, B., and Temple, S. (2008). Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell stem cell* 3, 289-300.
- Shen, S., Li, J., and Casaccia-Bonnel, P. (2005). Histone modifications affect timing of oligodendrocyte progenitor differentiation in the developing rat brain. *J Cell Biol* 169, 577-589.
- Sherwood, L., and Ectors, F. (2015). *Physiologie humaine*. .
- Shihabuddin, L.S., Horner, P.J., Ray, J., and Gage, F.H. (2000). Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 8727-8735.
- Siddiqui, A.M., Khazaei, M., and Fehlings, M.G. (2015). Translating mechanisms of neuroprotection, regeneration, and repair to treatment of spinal cord injury. *Progress in brain research* 218, 15-54.
- Silva, N.A., Sousa, N., Reis, R.L., and Salgado, A.J. (2014). From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. *Prog Neurobiol* 114, 25-57.
- Silver, J., and Miller, J.H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nature reviews Neuroscience* 5, 146-156.
- Simons, M., and Trajkovic, K. (2006). Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J Cell Sci* 119, 4381-4389.
- Sirko, S., Behrendt, G., Johansson, P.A., Tripathi, P., Costa, M., Bek, S., Heinrich, C., Tiedt, S., Colak, D., Dichgans, M., *et al.* (2013). Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog. [corrected]. *Cell Stem Cell* 12, 426-439.
- Slezak, M., Goritz, C., Niemiec, A., Frisen, J., Chambon, P., Metzger, D., and Pfriege, F.W. (2007). Transgenic mice for conditional gene manipulation in astroglial cells. *Glia* 55, 1565-1576.
- Soderblom, C., Luo, X., Blumenthal, E., Bray, E., Lyapichev, K., Ramos, J., Krishnan, V., Lai-Hsu, C., Park, K.K., Tsoulfas, P., *et al.* (2013). Perivascular fibroblasts form the fibrotic scar after contusive spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 13882-13887.
- Sofroniew, M.V. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature reviews Neuroscience* 16, 249-263.
- Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 7-35.
- Spiegel, I., and Peles, E. (2002). Cellular junctions of myelinated nerves (Review). *Molecular membrane biology* 19, 95-101.
- Sroga, J.M., Jones, T.B., Kigerl, K.A., McGaughy, V.M., and Popovich, P.G. (2003). Rats and mice exhibit distinct inflammatory reactions after spinal cord injury. *J Comp Neurol* 462, 223-240.
- Stange, D.E., Koo, B.K., Huch, M., Sibbel, G., Basak, O., Lyubimova, A., Kujala, P., Bartfeld, S., Koster, J., Geahlen, J.H., *et al.* (2013). Differentiated Troy<sup>+</sup> chief cells act as reserve stem cells to generate all lineages of the stomach epithelium. *Cell* 155, 357-368.
- Stenudd, M., Sabelstrom, H., and Frisen, J. (2015). Role of endogenous neural stem cells in spinal cord injury and repair. *JAMA Neurol* 72, 235-237.
- Sternberg, N., and Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *Journal of molecular biology* 150, 467-486.
- Sternberg, N., Hamilton, D., and Hoess, R. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. *Journal of molecular biology* 150, 487-507.

- Stobart, J.L., and Anderson, C.M. (2013). Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, 38.
- Su, Z., Niu, W., Liu, M.L., Zou, Y., and Zhang, C.L. (2014). In vivo conversion of astrocytes to neurons in the injured adult spinal cord. *Nature communications* 5, 3338.
- Tabakow, P., Jarmundowicz, W., Czapiga, B., Fortuna, W., Miedzybrodzki, R., Czyz, M., Huber, J., Szarek, D., Okurowski, S., Szewczyk, P., *et al.* (2013). Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury. *Cell transplantation* 22, 1591-1612.
- Tabakow, P., Raisman, G., Fortuna, W., Czyz, M., Huber, J., Li, D., Szewczyk, P., Okurowski, S., Miedzybrodzki, R., Czapiga, B., *et al.* (2014). Functional regeneration of supraspinal connections in a patient with transected spinal cord following transplantation of bulbar olfactory ensheathing cells with peripheral nerve bridging. *Cell transplantation* 23, 1631-1655.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Taoka, Y., Okajima, K., Uchiba, M., Murakami, K., Kushimoto, S., Johno, M., Naruo, M., Okabe, H., and Takatsuki, K. (1997). Gabexate mesilate, a synthetic protease inhibitor, prevents compression-induced spinal cord injury by inhibiting activation of leukocytes in rats. *Critical care medicine* 25, 874-879.
- Tetzlaff, W., Okon, E.B., Karimi-Abdolrezaee, S., Hill, C.E., Sparling, J.S., Plemel, J.R., Plunet, W.T., Tsai, E.C., Baptiste, D., Smithson, L.J., *et al.* (2011). A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 28, 1611-1682.
- Torper, O., Pfisterer, U., Wolf, D.A., Pereira, M., Lau, S., Jakobsson, J., Bjorklund, A., Grealish, S., and Parmar, M. (2013). Generation of induced neurons via direct conversion in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 7038-7043.
- Totoiu, M.O., and Keirstead, H.S. (2005). Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination. *The Journal of comparative neurology* 486, 373-383.
- Traka, M., Dupree, J.L., Popko, B., and Karagogeos, D. (2002). The neuronal adhesion protein TAG-1 is expressed by Schwann cells and oligodendrocytes and is localized to the juxtaparanodal region of myelinated fibers. *J Neurosci* 22, 3016-3024.
- Trapp, B.D. (1990). Myelin-associated glycoprotein. Location and potential functions. *Ann N Y Acad Sci* 605, 29-43.
- Tsacopoulos, M., and Magistretti, P.J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16, 877-885.
- Tzekou, A., and Fehlings, M.G. (2014). Treatment of spinal cord injury with intravenous immunoglobulin G: preliminary evidence and future perspectives. *Journal of clinical immunology* 34 Suppl 1, S132-138.
- Vallstedt, A., Klos, J.M., and Ericson, J. (2005). Multiple dorsoventral origins of oligodendrocyte generation in the spinal cord and hindbrain. *Neuron* 45, 55-67.
- Valny, M., Honsa, P., Kirdajova, D., Kamenik, Z., and Anderova, M. (2016). Tamoxifen in the Mouse Brain: Implications for Fate-Mapping Studies Using the Tamoxifen-Inducible Cre-loxP System. *Frontiers in cellular neuroscience* 10, 243.
- Vawda, R., Wilcox, J., and Fehlings, M. (2012). Current stem cell treatments for spinal cord injury. *Indian J Orthop* 46, 10-18.
- Venance, L., Stella, N., Glowinski, J., and Giaume, C. (1997). Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signaling in cultured rat astrocytes. *J Neurosci* 17, 1981-1992.
- Verkhatsky, A., and Butt, A. (2007). Astrocytes. In *Glial Neurobiology* (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 93-123.
- Verkhatsky, A., and Butt, A. (2013). Oligodendrocytes. In *Glial Physiology and Pathophysiology* (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 245-319.
- Verkhatsky, A., Rodriguez, J.J., and Parpura, V. (2012). Calcium signalling in astroglia. *Molecular and cellular endocrinology* 353, 45-56.
- Verrier, J.D., Jackson, T.C., Bansal, R., Kochanek, P.M., Puccio, A.M., Okonkwo, D.O., and Jackson, E.K. (2012). The brain in vivo expresses the 2',3'-cAMP-adenosine pathway. *J Neurochem* 122, 115-125.

- Vigh, B., Manzano e Silva, M.J., Frank, C.L., Vincze, C., Czirok, S.J., Szabo, A., Lukats, A., and Szel, A. (2004). The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain. *Histology and histopathology* *19*, 607-628.
- Vincent, A.J., Taylor, J.M., Choi-Lundberg, D.L., West, A.K., and Chuah, M.I. (2005a). Genetic expression profile of olfactory ensheathing cells is distinct from that of Schwann cells and astrocytes. *Glia* *51*, 132-147.
- Vincent, A.J., West, A.K., and Chuah, M.I. (2005b). Morphological and functional plasticity of olfactory ensheathing cells. *J Neurocytol* *34*, 65-80.
- Virchow, R. (1858). *Die cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*.
- Vue, T.Y., Kim, E.J., Parras, C.M., Guillemot, F., and Johnson, J.E. (2014). *Ascl1* controls the number and distribution of astrocytes and oligodendrocytes in the gray matter and white matter of the spinal cord. *Development* *141*, 3721-3731.
- Walton, N.M., Sutter, B.M., Laywell, E.D., Levkoff, L.H., Kearns, S.M., Marshall, G.P., 2nd, Scheffler, B., and Steindler, D.A. (2006). Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* *54*, 815-825.
- Wang, G., Ao, Q., Gong, K., Zuo, H., Gong, Y., and Zhang, X. (2010). Synergistic effect of neural stem cells and olfactory ensheathing cells on repair of adult rat spinal cord injury. *Cell transplantation* *19*, 1325-1337.
- Wang, L., Zhang, Z.G., Zhang, R.L., Gregg, S.R., Hozeska-Solgot, A., LeTourneau, Y., Wang, Y., and Chopp, M. (2006). Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *26*, 5996-6003.
- Wanner, I.B., Anderson, M.A., Song, B., Levine, J., Fernandez, A., Gray-Thompson, Z., Ao, Y., and Sofroniew, M.V. (2013). Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *33*, 12870-12886.
- Watson, C., and Kayalioglu, G. (2009). Chapter 1 - The Organization of the Spinal Cord. In *The Spinal Cord* (San Diego: Academic Press), pp. 1-7.
- Watzlawick, R., Rind, J., Sena, E.S., Brommer, B., Zhang, T., Kopp, M.A., Dirnagl, U., Macleod, M.R., Howells, D.W., and Schwab, J.M. (2016). Olfactory Ensheathing Cell Transplantation in Experimental Spinal Cord Injury: Effect size and Reporting Bias of 62 Experimental Treatments: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS biology* *14*, e1002468.
- Wegner, M. (2008). A matter of identity: transcriptional control in oligodendrocytes. *Journal of molecular neuroscience : MN* *35*, 3-12.
- Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A.C., and Reynolds, B.A. (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *16*, 7599-7609.
- Wilcox, J.T., Cadotte, D., and Fehlings, M.G. (2012). Spinal cord clinical trials and the role for bioengineering. *Neuroscience letters* *519*, 93-102.
- Windus, L.C., Lineburg, K.E., Scott, S.E., Claxton, C., Mackay-Sim, A., Key, B., and St John, J.A. (2010). Lamellipodia mediate the heterogeneity of central olfactory ensheathing cell interactions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *67*, 1735-1750.
- Wolburg, H., Noell, S., Mack, A., Wolburg-Buchholz, K., and Fallier-Becker, P. (2009). Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res* *335*, 75-96.
- Wolburg, H., and Rohmann, A. (1995). Structure--function relationships in gap junctions. *Int Rev Cytol* *157*, 315-373.
- Wolman, L. (1965). The Disturbance of Circulation in Traumatic Paraplegia in Acute and Late Stages: A Pathological Study. *Paraplegia* *2*, 213-226.
- Woodhall, E., West, A.K., and Chuah, M.I. (2001). Cultured olfactory ensheathing cells express nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, glia cell line-derived neurotrophic factor and their receptors. *Brain research Molecular brain research* *88*, 203-213.

- Xu, W., Chi, L., Xu, R., Ke, Y., Luo, C., Cai, J., Qiu, M., Gozal, D., and Liu, R. (2005). Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. *Spinal cord* 43, 204-213.
- Yaguchi, M., Ohta, S., Toyama, Y., Kawakami, Y., and Toda, M. (2008). Functional recovery after spinal cord injury in mice through activation of microglia and dendritic cells after IL-12 administration. *Journal of neuroscience research* 86, 1972-1980.
- Yamamoto, S., Yamamoto, N., Kitamura, T., Nakamura, K., and Nakafuku, M. (2001). Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 172, 115-127.
- Yasui, K., Hashizume, Y., Yoshida, M., Kameyama, T., and Sobue, G. (1999). Age-related morphologic changes of the central canal of the human spinal cord. *Acta Neuropathol* 97, 253-259.
- Yoo, S., and Wrathall, J.R. (2007). Mixed primary culture and clonal analysis provide evidence that NG2 proteoglycan-expressing cells after spinal cord injury are glial progenitors. *Developmental neurobiology* 67, 860-874.
- Young, K.M., Psachoulia, K., Tripathi, R.B., Dunn, S.J., Cossell, L., Attwell, D., Tohyama, K., and Richardson, W.D. (2013). Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. *Neuron* 77, 873-885.
- Yu, K., McGlynn, S., and Matisse, M.P. (2013). Floor plate-derived sonic hedgehog regulates glial and ependymal cell fates in the developing spinal cord. *Development* 140, 1594-1604.
- Yu, X., Ng, C.P., Habacher, H., and Roy, S. (2008). Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. *Nat Genet* 40, 1445-1453.
- Yui, S., Ito, D., Fujita, N., and Nishimura, R. (2011). Effects of fibroblasts derived from the olfactory bulb and nasal olfactory mucosa on proliferation of olfactory ensheathing cells harvested from the olfactory bulb. *The Journal of veterinary medical science* 73, 133-137.
- Zeng, C., Pan, F., Jones, L.A., Lim, M.M., Griffin, E.A., Sheline, Y.I., Mintun, M.A., Holtzman, D.M., and Mach, R.H. (2010). Evaluation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine staining as a sensitive and reliable method for studying cell proliferation in the adult nervous system. *Brain research* 1319, 21-32.
- Zhang, J., Wang, B., Xiao, Z., Zhao, Y., Chen, B., Han, J., Gao, Y., Ding, W., Zhang, H., and Dai, J. (2008). Olfactory ensheathing cells promote proliferation and inhibit neuronal differentiation of neural progenitor cells through activation of Notch signaling. *Neuroscience* 153, 406-413.
- Zhang, N., Yin, Y., Xu, S.J., Wu, Y.P., and Chen, W.S. (2012). Inflammation & apoptosis in spinal cord injury. *The Indian journal of medical research* 135, 287-296.
- Zhang, X., Klueber, K.M., Guo, Z., Cai, J., Lu, C., Winstead, W.I., Qiu, M., and Roisen, F.J. (2006). Induction of neuronal differentiation of adult human olfactory neuroepithelial-derived progenitors. *Brain research* 1073-1074, 109-119.
- Zhao, X., He, X., Han, X., Yu, Y., Ye, F., Chen, Y., Hoang, T., Xu, X., Mi, Q.S., Xin, M., *et al.* (2010). MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation. *Neuron* 65, 612-626.
- Zhou, X.H., Ning, G.Z., Feng, S.Q., Kong, X.H., Chen, J.T., Zheng, Y.F., Ban, D.X., Liu, T., Li, H., and Wang, P. (2012). Transplantation of autologous activated Schwann cells in the treatment of spinal cord injury: six cases, more than five years of follow-up. *Cell transplantation* 21 Suppl 1, S39-47.
- Zhu, Q., Whitemore, S.R., Devries, W.H., Zhao, X., Kuypers, N.J., and Qiu, M. (2011). Dorsally-derived oligodendrocytes in the spinal cord contribute to axonal myelination during development and remyelination following focal demyelination. *Glia* 59, 1612-1621.
- Zhu, X., Bergles, D.E., and Nishiyama, A. (2008a). NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Development* 135, 145-157.
- Zhu, X., Hill, R.A., and Nishiyama, A. (2008b). NG2 cells generate oligodendrocytes and gray matter astrocytes in the spinal cord. *Neuron glia biology* 4, 19-26.
- Ziskin, J.L., Nishiyama, A., Rubio, M., Fukaya, M., and Bergles, D.E. (2007). Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter. *Nat Neurosci* 10, 321-330.
- Zukor, K., Belin, S., Wang, C., Keelan, N., Wang, X., and He, Z. (2013). Short hairpin RNA against PTEN enhances regenerative growth of corticospinal tract axons after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 15350-15361.



# ANNEXES



# ANNEXE I



# Isolation, Characterization, and Genetic Profiling of Subpopulations of Olfactory Ensheathing Cells from the Olfactory Bulb

AXEL HONORÉ,<sup>1,2</sup> STÉPHANIE LE CORRE,<sup>3,4</sup> CÉLINE DERAMBURE,<sup>3,4</sup> ROMAIN NORMAND,<sup>3,4</sup> CÉLIA DUCLOS,<sup>1,2</sup> OLIVIER BOYER,<sup>3,4</sup> JEAN-PAUL MARIE,<sup>1,2</sup> AND NICOLAS GUÉROUT<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>UPRES EA 3830, Institute for Biomedical Research and Innovation, University of Rouen, Rouen, Normandy, France

<sup>2</sup>Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Rouen University Hospital, Rouen, Normandy, France

<sup>3</sup>UMR Inserm U905, Institute for Biomedical Research and Innovation, University of Rouen, Rouen, Normandy, France

<sup>4</sup>Department of Immunology, Rouen University Hospital, Rouen, Normandy, France

## KEY WORDS

flow cytometry; microenvironment; p75; neurogenesis; microarray

## ABSTRACT

Olfactory ensheathing cells (OECs) play a crucial role during neurogenesis of primary olfactory neurons. Transplantation of OECs is considered as a promising new therapy for central nervous system repair. Nevertheless, OECs are constituted of distinct subpopulations and their role during neurogenesis is not clearly understood. In particular, OECs from the olfactory bulb (OB) constitute a heterogeneous, but not yet isolated and characterized, population of cells. In our study, flow cytometry analyses of primary OB cultures, based on cell surface expression of low-affinity nerve growth factor receptor (p75), reveal the presence of two distinct populations of OECs. Indeed, some of them express a high level of p75 (P75High) and the other a low level of p75 (P75Low). Effects of OB microenvironment were assessed, and we were able to show that fibroblasts mediate the induction of these two populations through the secretion of soluble factors. To characterize P75High and P75Low OECs, cells were sorted based on their differential expression of p75. Microarray analyses revealed that P75High OECs overexpress genes implicated in modulation of extracellular matrix and cell sorting, whereas P75Low OECs overexpress genes involved in regulation of the inflammatory response and axonal guidance. These results permit, for the first time, to isolate the two distinct subpopulations of OECs from OB, and suggest their specific role during neurogenesis. © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

## INTRODUCTION

The olfactory system is unusual in that the olfactory neurons are regularly renewed throughout life (Graziadei and Graziadei, 1979). This remarkable ability is thought to be in part due to a unique type of glial cells, the olfactory ensheathing cells (OECs; Ramon-Cueto and Avila, 1998). OECs are neural crest cells, which participate in the growth and guidance of primary olfactory neurons from olfactory epithelium to olfactory bulbs (OBs; Barraud et al., 2010; Forni et al., 2011). Their common origin with Schwann cells (SCs) permits to explain, in part, the expression of several specific markers, such as S-100, low-affinity nerve growth factor receptor (p75), and

glial fibrillary acidic protein (GFAP). Indeed, like non-myelinating SC, OECs could surround olfactory axons forming fascicular processes and in some cases, like myelinating SC, could synthesize peripheral-like myelin (Babiarz et al., 2011).

However, OECs and SC express distinct abilities to intermingle with meningeal cells and astrocytes (Franssen et al., 2009; Lakatos et al., 2000). Indeed, in contrast to SC, contact between OECs and astrocytes do not induce astroglial hyper-reactivity (Lakatos et al., 2000). Therefore, these properties permit OECs to be one of the most promising candidates for cell-based therapy for central nervous system (CNS) repair.

Nevertheless, some fundamental properties of OECs remain not fully understood, such as presence and abilities of distinct subpopulations of OECs. In fact, because of their specific role during neurogenesis of primary olfactory system, OECs could be found in peripheral nervous system (PNS) and in CNS. Also, it has been previously demonstrated that specific populations of OECs exist in each compartment and that these cells exhibit specific behaviors *in vitro* and *in vivo* (Guerout et al., 2010; Kueh et al., 2011; Paviot et al., 2011; Richter et al., 2005; Windus et al., 2010). Specific microenvironment may explain the presence of distinct OECs subpopulations. Indeed in the olfactory mucosa (OM), OECs are closely associated with primary olfactory neurons and fibroblasts, whereas, in OB, OECs are in contact with fibroblasts and astrocytes both *in vitro* and *in vivo* (Jani and Raisman, 2004; Li et al., 2005; Ramon-Cueto and Nieto-Sampedro, 1992; Windus et al., 2010).

Of particular interest is the accumulating evidence which suggests the presence of heterogeneous populations

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsors: Aide à Domicile aux Insuffisants Respiratoires (ADIR), Fondation de l'Avenir.

\*Correspondence to: Nicolas Guérou, Experimental Surgery Laboratory, EA3830, Faculty of Medicine and Pharmacy, Rouen University, 22 Boulevard Gambetta, 76183 Rouen, France. E-mail: nicolas\_guerout\_76@hotmail.com

Received 19 September 2011; Accepted 4 November 2011

DOI 10.1002/glia.22274

Published online 7 December 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

of OECs in OB *in vitro* and *in vivo* (Au et al., 2002; Huang et al., 2008; Rela et al., 2010; Richter et al., 2005; Windus et al., 2010). As described by Windus et al., these subpopulations are differentially organized in OB and express distinct patterns of some markers, in particular, p75. In fact, it appears that some OECs expressed a high level of p75 (P75High) and other low level of p75 (P75Low) (Windus et al., 2010). Thus, it has been hypothesized, based on their specific repulsion–adhesion behaviors *in vitro*, that these two populations of OECs could be implicated in two fundamental and opposite biological processes, such as defasciculation, cell sorting, and axonal guidance (Windus et al., 2010). Previously, it was also reported that distinct patterns of p75 expression could be observed in OECs obtained from OB *in vitro* (Richter et al., 2005), arguing about a conservation of these two phenotypes under culture conditions.

The aim of this study was to isolate and characterize the two populations of OECs found in OBs and to determine the factors involved in their differentiation/maturation.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Experiments were performed after acceptance by the local Ethics Committee for Animal Experiments in Normandy: N/01-02-11/05/02-14. For this study, Fischer inbred rats were used for all cultures (Charles River, L'Arbresle, France).

### Antibodies

Fluorescently conjugated antibodies directed against GFAP (Chemicon, Billerica, MA) and Thy-1 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) were used. Staining for p75 (Chemicon) was determined using primary antibody followed by PE-conjugated anti-mouse antibody (BD Biosciences, San Jose, CA).

### Cell Culture

#### Primary olfactory bulbs cultures

Primary OB cultures were prepared as previously described (Guerout et al., 2010). Then, cells were plated in DF-10S in 25 cm<sup>2</sup> flasks, precoated with poly-L-lysine (50 µg/mL).

#### Olfactory ensheathing cells and olfactory bulbs microenvironment cultures

OECs purification and cultures of OB microenvironment (OB-M) were performed by using the method described by Nash et al. (2001). Briefly, this method of differential adhesion is based on a very low adhesion rate of OEC to the surface of uncoated culture flasks (Nash et al., 2001; Novikova et al., 2011). The cell suspension

obtained from OB was resuspended in DF-10S, seeded on uncoated flasks, and cultured at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. After 18 h, the supernatant was removed and replated on other uncoated flasks and incubated for additional 36 h. The supernatants from these flasks were removed and replated on 25 cm<sup>2</sup> poly-L-lysine-coated culture flasks with DF-10S. During the procedure, most of the non-OEC cells attached to the uncoated flasks and constituted the OB-M. Based on this procedure, pure cultures of OECs and specific OB-M cultures could be obtained.

Effects of matrix + membrane and soluble fractions from OB-M on OECs differentiation were assessed as follows: To test the effect of matrix + membrane fraction, OECs were seeded onto confluent OB-M cultures previously lysing with H<sub>2</sub>O for 1 h at 37°C as described previously (Parrinello et al., 2010).

To test the effect of soluble fraction, supernatant was removed from confluent OB-M cultures. Conditioned medium (CM) from these cultures was collected, after centrifugation (5 min at 1.000g), and added to purified OECs cultures (2/3 CM: 1/3 DF-10S).

### Astrocytes cultures

Cortical astrocytes cultures were prepared as described elsewhere, thus purified astrocytes cultures could be obtained. Astrocytes-CM was obtained as described for OB-M CM.

### Fibroblast cultures

Fibroblasts cultures were prepared from OM, OM were cultured as previously described (Guerout et al., 2010). Then, purified fibroblasts cultures (>95% Thy-1 positive cells) were obtained from the negative fraction after p75 purification stage performed using magnetic bead technology (Miltenyi Biotec) (Supp. Info. Fig. 1D; Guerout et al., 2010). Fibroblasts-CM was obtained as described for OB-M CM.

### Flow Cytometry

Extracellular p75 and Thy-1 staining was performed as previously described (Pavot et al., 2011). For p75 analysis, control staining was performed by incubating cells without primary antibody. Intracellular GFAP staining was performed following the manufacturer's protocol with Foxp3 fixation/permeabilization kit (eBioscience, San Diego, CA).

For all the experiments distinct periods were defined:

- D0, day of OECs sowing onto coated flasks or onto matrix + membrane fraction.
- D1, introduction of specific treatment (DF-10S or soluble fraction).
- D3, control of the purity of OECs cultures to assess the quality of OB dissection and purification method. At this early stage, all the purified OECs cultures present a rate of homogeneous p75 positive cells higher than 90%.

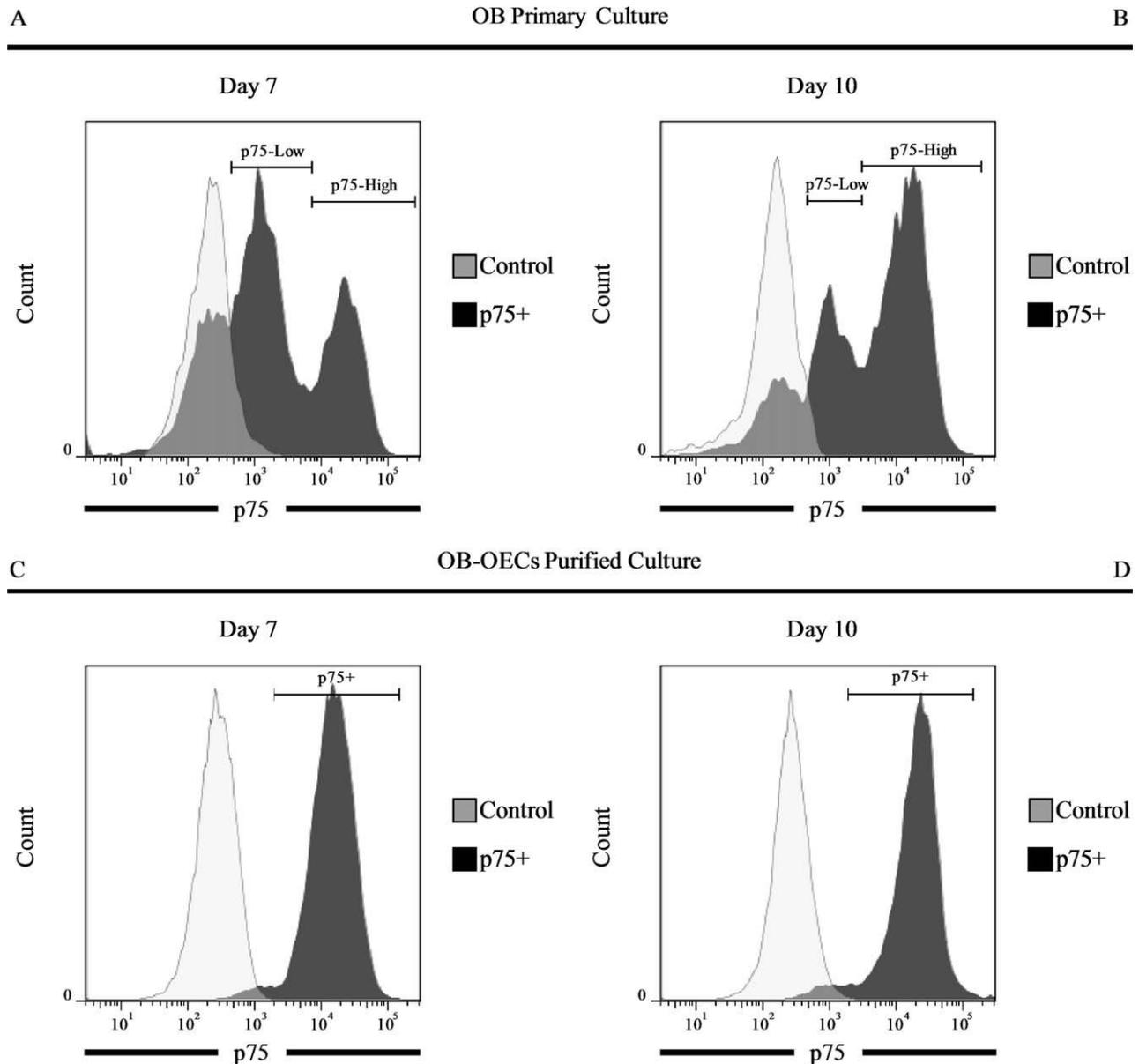


Fig. 1. Primary olfactory bulb and purified olfactory ensheathing cell cultures displayed a distinct expression of p75. Flow cytometry analyses of p75 cell surface expression on primary OB (A and B) and purified OECs (C and D) cultures at D7 (A and C) and D10 (B and D). Control was performed by incubating cells without primary antibody. Data are representative of at least four independent experiments.

- D7, first passage in flow cytometer to evaluate effect of each cultures conditions.
- D10, second passage in flow cytometer to evaluate effect of each cultures conditions.

Analyses were performed on a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences) using the FlowJo software (Tree Star).

#### Isolation of P75Low and P75High OECs

P75Low and P75High OECs were sorted using a FACSAria flow cytometer (BD Biosciences;  $n = 4$ ). Briefly, OECs were sorted based on their differential expression

of p75, purification of each sorting experiments were then assessed.

After each purification run, 10.000 P75Low and P75High OECs were collected for microarray analysis. Then, eight paired samples were constituted  $n = 4$  for P75Low OECs and  $n = 4$  for P75High OECs.

#### RNA Sample Preparation and Microarray Experiments

P75Low and P75High OECs were lysed using Super-Amp Lysis Buffer according to manufacturer's instruction (Miltenyi Biotec) to constitute the eight paired-RNA

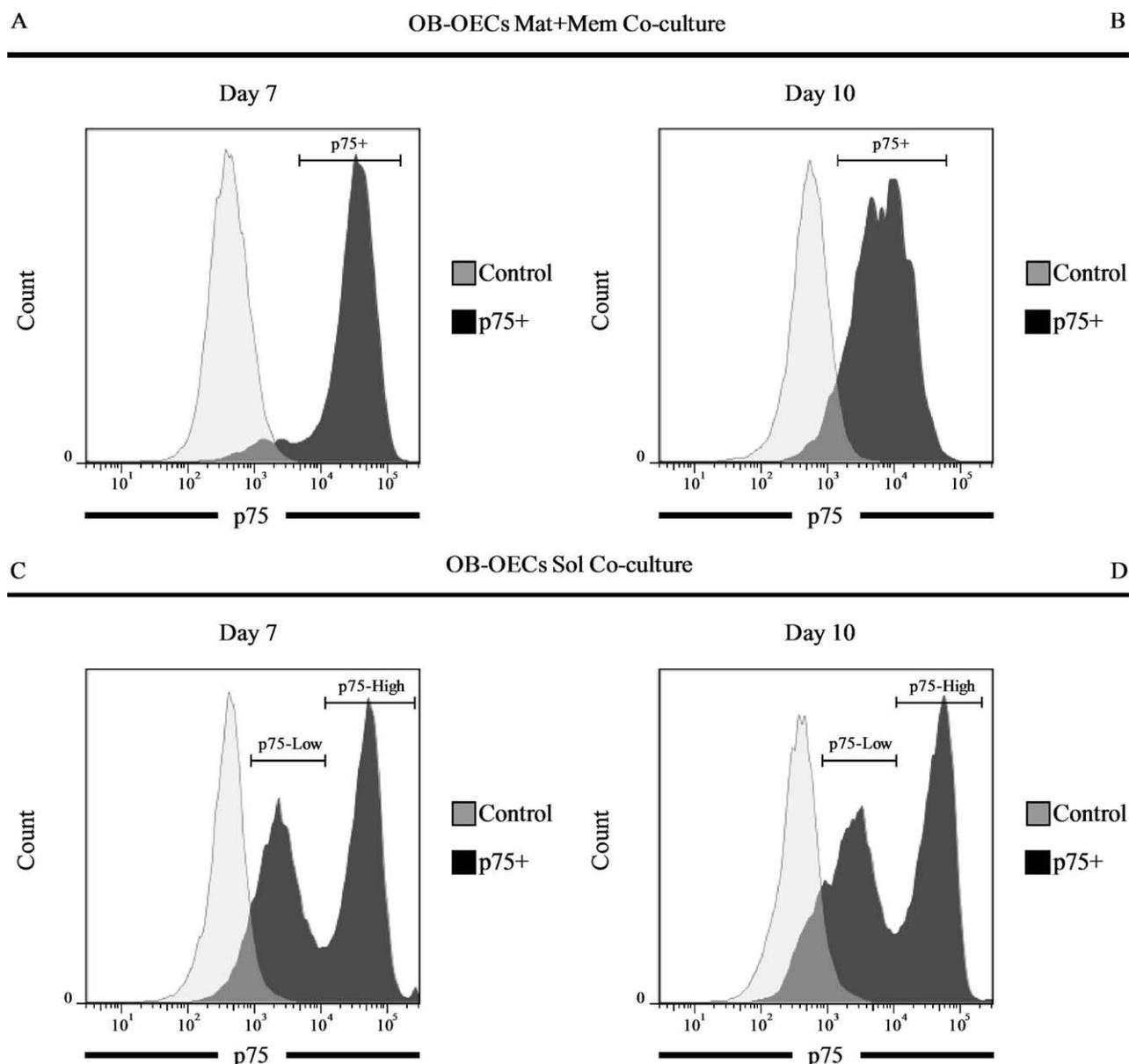


Fig. 2. Olfactory bulb microenvironment induced differential expression of p75 by diffusible factors. Flow cytometry analyses of p75 cell surface expression on purified OECs cultivated with matrix + membrane fraction of OB microenvironment (A and B) and purified

OECs cultivated with soluble fraction of OB microenvironment (C and D) at D7 (A and C) and D10 (B and D). Data are representative of at least four independent experiments.

samples. Then, microarrays experiments were performed as previously described according to manufacturer's instruction (Agilent Technologies, Santa Clara, CA; Guerout et al., 2010).

#### Data Mining and MIAME

Data were processed as we previously described with a fold change >3 and a  $P$  value < 0.01 (Guerout et al., 2010).

Data were submitted to gene expression omnibus (GEO) archive according to minimum information about a microarray experiment (MIAME) recommendations. A GEO accession number was accorded: GSE30797.

## RESULTS

### Primary OB and Purified OECs Cultures Displayed a Distinct Expression of p75

To verify the presence of the distinct subpopulations of OECs *in vitro*, flow cytometry analyses were performed. For this, primary OB cultures were compared with purified OECs cultures. In primary OB cultures, two distinct populations of OECs were found at D7 (Fig. 1A) and D10 (Fig. 1B), in contrast purified OECs cultures presented a unique population of OECs for these periods (Fig. 1C,D). Indeed, primary OB culture analyses showed P75High and P75Low OECs (Fig.

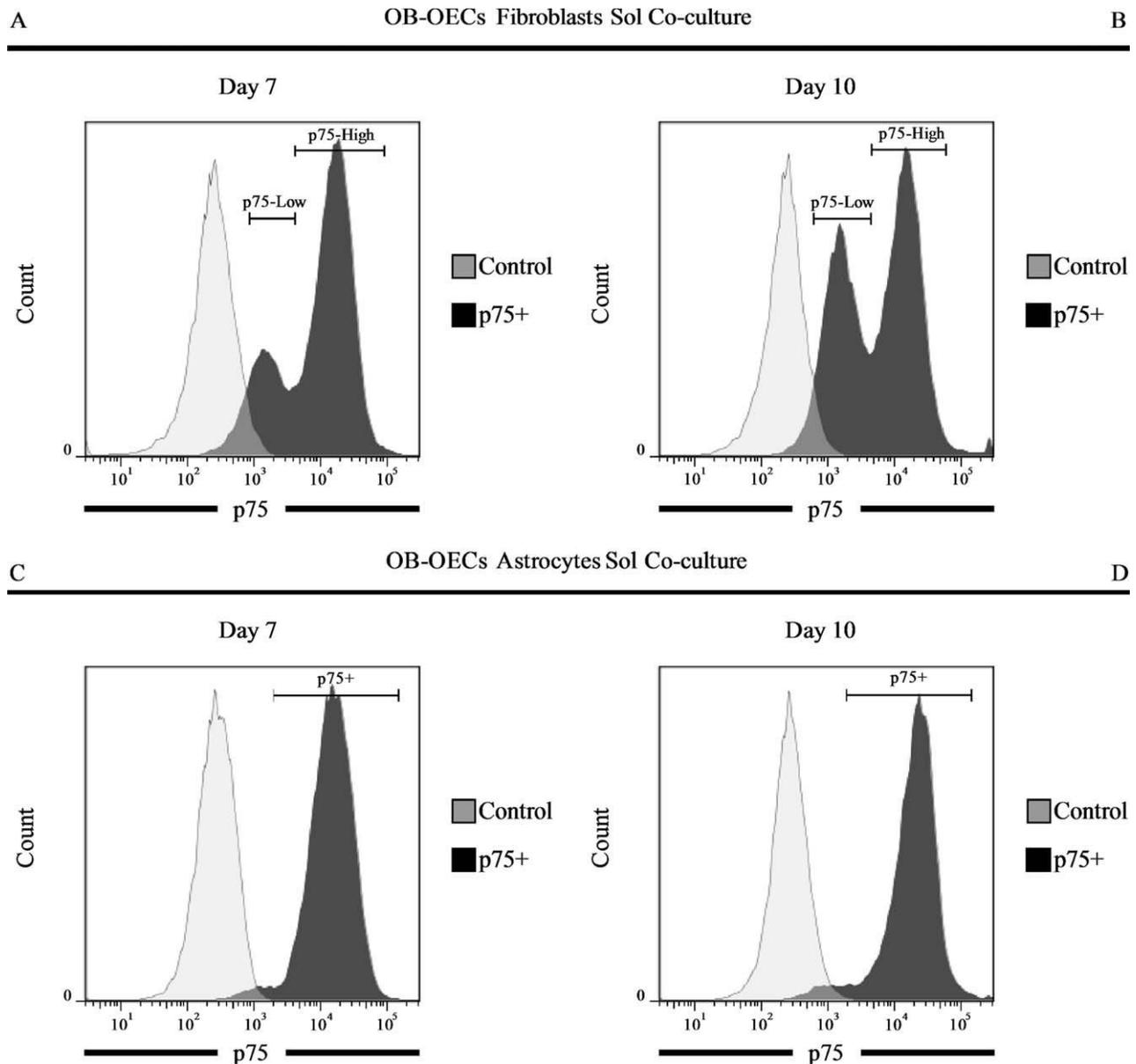


Fig. 3. Fibroblasts induced differential expression of p75. Flow cytometry analyses of p75 cell surface expression on purified OECs cultivated with soluble fraction of fibroblasts cultures (A and B) and purified

OECs cultivated with soluble fraction of astrocytes cultures (C and D) at D7 (A and C) and D10 (B and D). Data are representative of at least four independent experiments.

1A,B). At the same time, purified OECs cultures presented a unique p75 population (Fig. 1C,D), all of these were positive for GFAP (Supp. Info. Fig. 1A).

These results demonstrate that the two populations of OECs present *in vivo* can be found under culture conditions and suggest a role of OB-M for induction of these two specific populations.

#### **OB Microenvironment Induces Differential Expression of p75 by Diffusible Factors**

To assess the role of the microenvironment, effects of matrix + membrane and soluble fractions on OECs p75 profile were analyzed by flow cytometry. Analyses

revealed that at D7 and D10 matrix + membrane fraction had no effect on purified OECs regarding p75 expression (Fig. 2A,B). Indeed, OECs presented a unique p75 profile as compared with purified control OECs (Fig. 1C,D). At the same time, CM induced at D7 and D10, a typical switch of populations. In fact, OECs presented P75High and P75Low populations (Fig. 2C,D).

These analyses revealed the main role of OB-M on p75 OECs profile via diffusible factors that induced a phenotypic switch of OECs populations.

#### **Fibroblasts Induce Differential Expression of p75**

OB-M was exclusively constituted of astrocytes and fibroblasts (Li et al., 2005; Ramon-Cueto and Nieto-

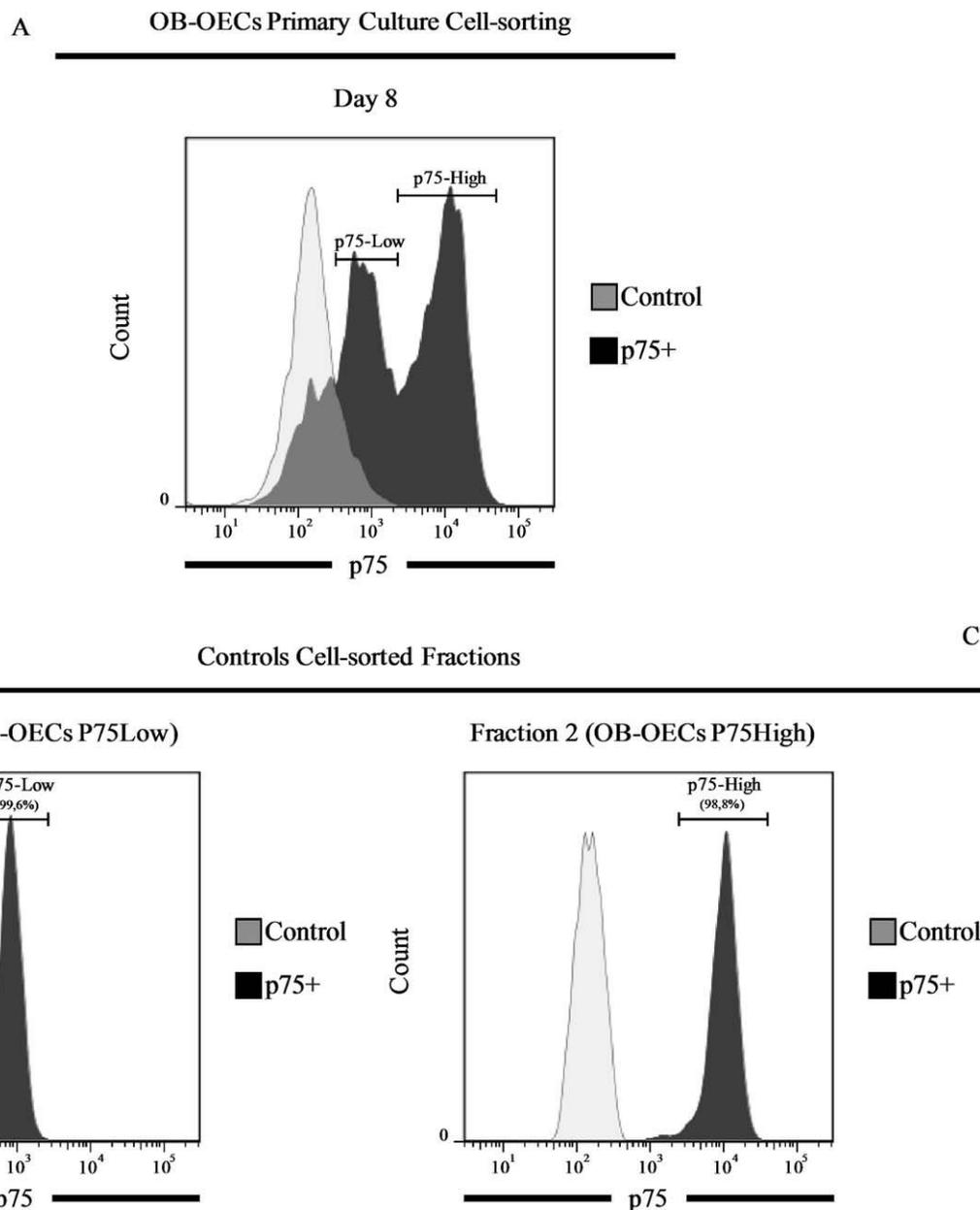


Fig. 4. P75Low and P75High OECs purification. Flow cytometry analyses of p75 cell surface expression on P75Low OECs (B) and P75High OECs (C) from primary olfactory bulb cultures (A). Numbers indicate the percentage of cells present in the indicated gated region.

Sampedro, 1992). Effects of each purified cultures on OECs p75 profile were determined. These experiments revealed that astrocytes-CM had no effect on OECs p75 profile (Fig. 3C,D) as compared with control purified OECs (Fig. 1C,D). In contrast, fibroblasts-CM could induce, at D7 and D10, a phenotypic switch of populations, at this time, OECs presented P75High and P75Low expressions (Fig. 3A,B), and all of these were GFAP positive cells (Supp. Info. Fig. 1B).

These analyses permitted to determine that fibroblasts but not astrocytes can induce a switch of OECs populations via diffusible factors.

### The Two Populations of OECs have Specific Gene Expression Profiles

To determine the specific gene expression profiles of P75High and P75Low OECs, cells were sorted using FACS technology. Highly purified P75Low and P75High OECs were obtained from primary OB cultures (Fig. 4). Transcriptome analysis of P75High and P75Low OECs (4 vs. 4) was performed and revealed a large number of differentially expressed mRNA. With a cut-off threshold of 3,704 mRNA were differentially expressed between P75High and P75Low

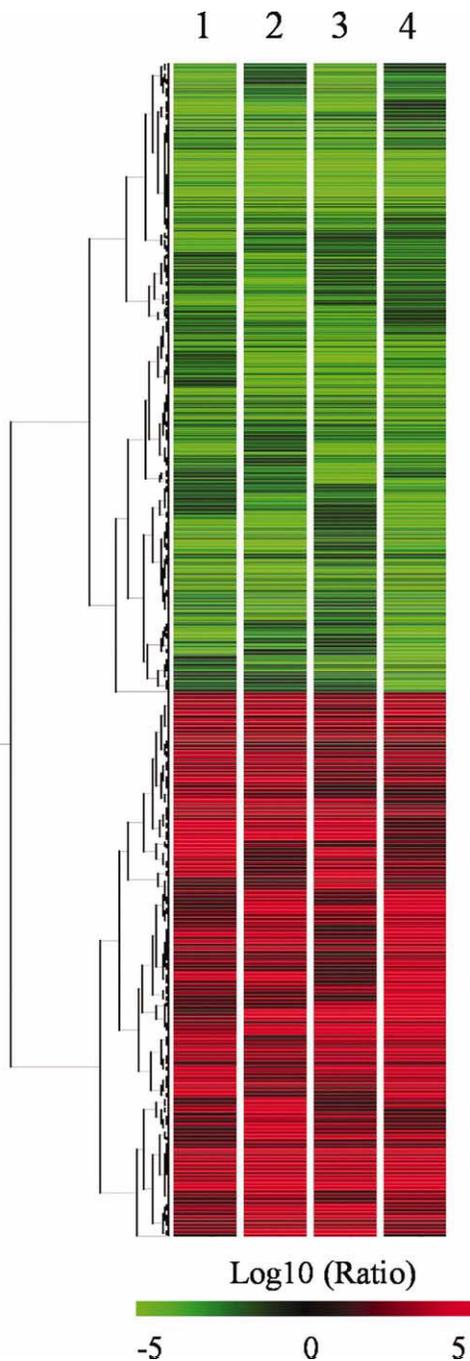


Fig. 5. Hierarchical clustering of 704 mRNA expression pattern deregulated in P75High OECs versus P75Low OECs ( $n = 4$ ). Expression levels are color coded relatively to log<sub>2</sub> ratio (P75High OECs/P75Low OECs): green for genes overexpressed in P75High OECs and red for genes overexpressed in P75Low OECs. The scale indicates log<sub>2</sub> ratio values. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

OECs ( $P < 0.01$ ). Hierarchical clustering is presented in Fig. 5.

From these differentially expressed mRNA, several relevant genes could be found. A table of all regulated genes is provided in the Supp. Info. Table 1.

Analyses revealed that P75High OECs overexpressed genes implicated in modulation of extracellular matrix

TABLE 1. Overexpressed Genes by P75High OECs

Gene symbol	Gene name	Log <sub>2</sub> ratio (P75High OECs/P75Low OECs)
<i>Lama2</i>	PREDICTED: laminin, alpha 2	6.72
<i>ErbB2</i>	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2	3.24
<i>Col5a1</i>	Collagen, type V, alpha 1	4.16
<i>Colla1</i>	Collagen, type I, alpha 1	3.99
<i>Col5a2</i>	Collagen, type V	6.40
<i>Drp2</i>	Dystrophin-related protein 2 splice variant	4.04
<i>Lama4</i>	Laminin, alpha 4	7.70
<i>Sparc</i>	Secreted protein, acidic, cysteine-rich	3.99
<i>Lgals 1</i>	Lectin, galactoside-binding, soluble, 1	4.29

(ECM) and neurite outgrowth. It also appeared that P75High OECs preferentially expressed to P75Low OECs genes involved in axonal fasciculation/defasciculation and cell sorting. Genes for these processes are listed in Table 1.

In contrast, P75Low OECs overexpressed genes implicated in modulation of inflammatory response. Interestingly, P75Low OECs overexpressed genes involved in cellular adhesion/repulsion phenomena and axonal guidance. Genes for these processes are listed in Table 2.

## DISCUSSION

To our knowledge, this is the first report of isolation and characterization of the distinct subpopulations of OECs present in OB. This study has also permitted to determine that OB-M, in particular fibroblasts, plays a crucial role for induction of these specific populations via secretion of diffusible factors. Finally, P75Low and P75High OECs have been shown to display distinct gene expression profiling, with genes acting differentially in neurogenesis. P75High OECs expressed genes implicated in neurite outgrowth and cell sorting, whereas P75Low OECs expressed genes involved in axonal guidance and targeting.

Neither cytokines nor growth factors were used in this study. Nevertheless, several purification methods were tested as use of cytosine arabinoside (to deplete fibroblasts and astrocytes). As described for purification based on Nash's method (Fig. 1C,D), it appears that a homogeneous single p75 population could be only observed. This confirms the main role of microenvironment independently of the purification method used (Supp. Info. Fig. 1C). Cytometry analyses were conducted for p75 expression, because this is the only referred marker known to be specifically and differentially expressed *in vivo* by OECs (Gueye et al., 2011; Kueh et al., 2011; Windus et al., 2010). Intracellular GFAP staining showed that all the p75 cells were GFAP positive, confirming the high purity of the OECs cultures (Supp. Info. Fig. 1A,B).

For the past two decades, OECs have elicited increasing interest due to their exceptional ability to induce

functional recovery and axonal regrowth after spinal cord or dorsal root axons injuries (Li et al., 1997; Ramon-Cueto and Nieto-Sampedro, 1994). OECs are thought to be in

TABLE 2. Overexpressed Genes by P75Low OECs

Gene symbol	Gene name	Log2 ratio (P75High OECs/P75Low OECs)
<i>Ndel1</i>	Nuclear distribution gene E-like homolog 1	-3.34
<i>Adap2</i>	ArfGAP with dual PH domains 2	-3.85
<i>Corola</i>	Coronin, actin binding protein 1A	-3.40
<i>Myolf</i>	Myosin IF	-4.73
<i>Vasp</i>	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	-3.49
<i>Il1b</i>	Interleukin 1 beta	-5.33
<i>Dlc1</i>	Deleted in liver cancer 1	-3.75
<i>Arrb2</i>	Arrestin, beta 2	-4.27
<i>Aif1</i>	Allograft inflammatory factor 1	-5.51
<i>Nudc</i>	Nuclear distribution gene C homolog (A. nidulans)	-3.18
<i>Lcp2</i>	Lymphocyte cytosolic protein 2	-3.99
<i>Coro1b</i>	Coronin, actin-binding protein, 1B	-4.28
<i>Gmfg</i>	Glia maturation factor, gamma	-4.33
<i>Ephb2</i>	Eph receptor B2	-3.33
<i>Sirpa</i>	Signal-regulatory protein alpha	-3.85
<i>Skap2</i>	Src kinase associated phosphoprotein 2	-5.52
<i>Smo</i>	Smoothed homolog (Drosophila)	-3.11
<i>Cyth4</i>	Cytohesin 4	-5.99
<i>Cfh</i>	Complement factor H	-4.83
<i>Cxcl13</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13	-6.56
<i>Fcgr2a</i>	Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor	-6.30

part responsible for the neurogenesis of primary olfactory neurons by several processes as fasciculation, cell sorting, and axonal targeting (Windus et al., 2010). Thus, it was presumed, based on immunohistochemistry staining observations, that distinct subpopulations may be implicated during olfactory neuron turnover. In particular, a sublamina organization of the OECs in the olfactory nerve layer was identified (Au et al., 2002). In this layer, olfactory axons, which are randomly arranged, were defasciculated and specifically conducted to their target glomeruli. In this study, we report *in vitro* evidence of the existence of these different subpopulations of OECs. Indeed, primary OB and purified OECs cultures presented distinct p75 profiles, arguing the case for a main role of microenvironment for induction of P75Low and P75High phenotypes (Fig. 1). Based on matrix + membrane and soluble fraction experiments, it could be demonstrated that diffusible factors induce a phenotypic switch of OECs populations (Fig. 2). OB-M is exclusively constituted of astrocytes and fibroblasts, thus CM from fibroblasts and astrocytes cultures were tested on purified OECs. CM-fibroblasts were able to induce expression of P75Low and P75High OECs, whereas CM-astrocytes had no effect on OECs p75 profile (Fig. 3).

To characterize P75Low and P75High OECs, microarray analysis was performed after purification of each population (Fig. 4). Also gene expression profiles revealed differential expression of sets of genes by P75Low and P75High OECs.

P75High OECs overexpressed genes implicated in modulation of ECM, for example, *Sparc*, *lama2*, *lama4*, and *Tnc* (Table 1). In a previous study regarding OECs from OM, *Sparc* had been identified to indirectly

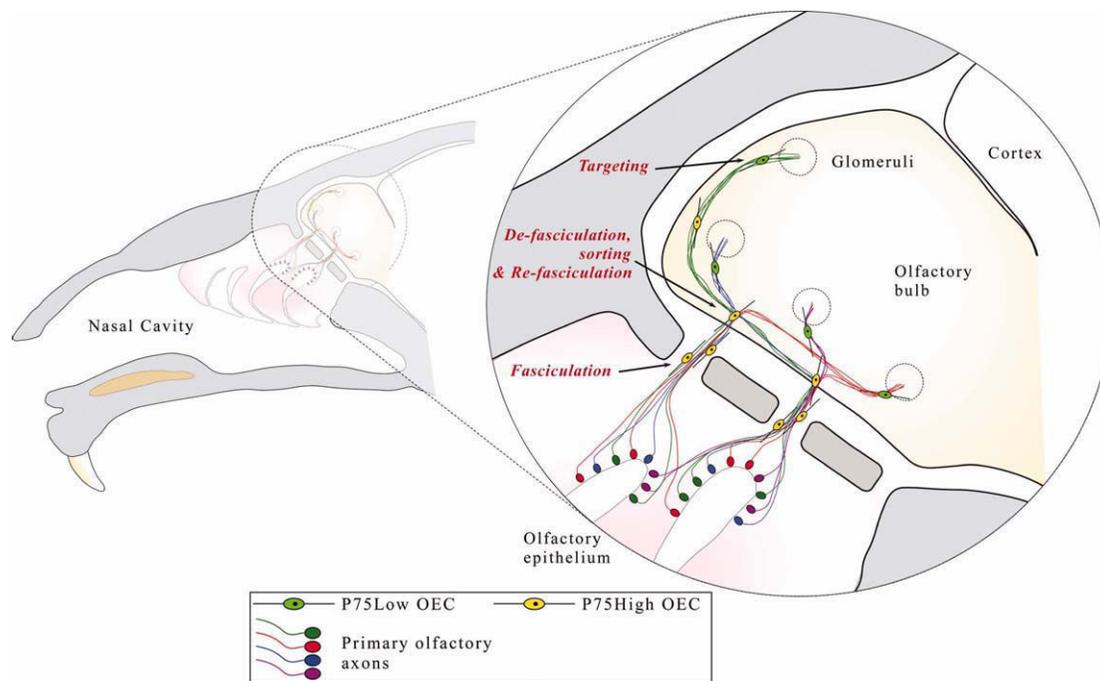


Fig. 6. Graphic illustration summarizing the presumed roles of OECs during neurogenesis of primary olfactory neurons. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

promote neurite outgrowth *in vitro* and *in vivo* in modulating ECM (Au et al., 2007). Furthermore, P75High OECs overexpressed several genes implicated in the production of collagen, for example, *col5a1*, *col1a1*, and *col5a2* (Table 1). P75High OECs also overexpressed genes which are involved in fasciculation/defasciculation and cell sorting processes, for example, *ErbB2*, *Drp2*, and *Lgals1* (Guertin et al., 2005; Plachta et al., 2007; Sherman et al., 2001). *Drp2* has been identified as a key factor for the formation and stabilization of SC-axon unit (Sherman et al., 2001). In contrast, *ErbB2* is involved at an early stage during Wallerian degeneration by participating in disruption of the myelin sheath (Guertin et al., 2005).

In contrast, P75Low OECs strikingly overexpressed set of genes which are implicated in regulation of inflammatory response (Table 2). Indeed, P75Low OECs overexpressed genes involved in activation of immune cells, for example, *coro1a*, *Lcp2*, *IL1*, and *Cxcl13* and other genes that regulate the inflammatory response, for example, *Aif1*, *Arrb2*, *Sirpa* (CD172a), *Timp2*, *Cfh*, and *Fcgr2a* (CD32) (Lattin et al., 2009; Saez de Guinoa et al., 2011; Table 2). Overexpression of genes regulating inflammatory response may explain previously reported studies about the ability of OECs to reduce glial scar in spinal cord injury models (Gorrie et al., 2010; Lopez-Vales et al., 2004). Interestingly, P75Low OECs overexpressed genes involved in axonal guidance and targeting, for example, *Ndel1*, *Ephb2*, *Cy4*, and *Smo* (Angot et al., 2008; Hippenmeyer et al., 2010; Parrinello et al., 2010; Table 2). In fact, it was recently demonstrated that *Ndel1* regulate the last stage of neuronal migration, in particular “entry to the target lamina” (Hippenmeyer et al., 2010). Moreover, it was recently discovered that Ephrin-B/EphB2 signaling between fibroblasts and SC is mainly implicated in targeted axonal outgrowth during regeneration which occurred in PNS after axotomy (Parrinello et al., 2010). P75Low OECs also overexpressed numerous genes regulating cytoskeleton organization, a phenomenon particularly important for adhesion/repulsion processes required during neurogenesis, for example, *Dlc1*, *Nudc*, *Myo1f*, *Adap2*, *Vasp*, *Coro1b*, *Skap2*, and *Gmfg* (Cappello et al., 2011; Ismail et al., 2010).

These results provide a better understanding of the distinct role that could be played by OECs during neurogenesis of olfactory neurons (Fig. 6). Moreover, these results underline the main role of microenvironment, in particular fibroblasts, for differentiation/maturation of OECs. For clinical purposes, OECs represent a promising candidate for CNS repair. In this instance, autograft of OECs obtained from OM (OM-OECs) is more reliable. Nevertheless, OM-OECs seem to express less potential to induce neurogenesis than OB-OECs (Guerout et al., 2010; Paviot et al., 2011). Therefore, isolation and characterization of diffusible factors responsible of differentiation/maturation for subpopulations of OECs must be established, which would allow maturation of OM-OECs without use of gene transfer (Ruitenberget al., 2003).

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Richard Medeiros, Rouen University Hospital Medical Editor, for editing the manuscript.

## REFERENCES

- Angot E, Loulier K, Nguyen-Ba-Charvet KT, Gadeau AP, Ruat M, Traifort E. 2008. Chemoattractive activity of sonic hedgehog in the adult subventricular zone modulates the number of neural precursors reaching the olfactory bulb. *Stem Cells* 26:2311–2320.
- Au E, Richter MW, Vincent AJ, Tetzlaff W, Aebersold R, Sage EH, Roskams AJ. 2007. SPARC from olfactory ensheathing cells stimulates Schwann cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair. *J Neurosci* 27:7208–7221.
- Au WW, Treloar HB, Greer CA. 2002. Sublaminar organization of the mouse olfactory bulb nerve layer. *J Comp Neurol* 446:68–80.
- Babiarz J, Kane-Goldsmith N, Basak S, Liu K, Young W, Grumet M. 2011. Juvenile and adult olfactory ensheathing cells bundle and myelinate dorsal root ganglion axons in culture. *Exp Neurol* 229:72–79.
- Barraud P, Seferiadis AA, Tyson LD, Zwart MF, Szabo-Rogers HL, Ruhrberg C, Liu KJ, Baker CV. 2010. Neural crest origin of olfactory ensheathing glia. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:21040–21045.
- Cappello S, Monzo P, Vallee RB. 2011. NudC is required for interkinetic nuclear migration and neuronal migration during neocortical development. *Dev Biol* 357:326–335.
- Forni PE, Taylor-Burds C, Melvin VS, Williams T, Wray S. 2011. Neural crest and ectodermal cells intermix in the nasal placode to give rise to GnRH-1 neurons, sensory neurons, and olfactory ensheathing cells. *J Neurosci* 31:6915–6927.
- Franssen EH, Roet KC, de Bree FM, Verhaagen J. 2009. Olfactory ensheathing glia and Schwann cells exhibit a distinct interaction behavior with meningeal cells. *J Neurosci Res* 87:1556–1564.
- Gorrie CA, Hayward I, Cameron N, Kailainathan G, Nandapalan N, Sutharsan R, Wang J, Mackay-Sim A, Waite PM. 2010. Effects of human OEC-derived cell transplants in rodent spinal cord contusion injury. *Brain Res* 1337:8–20.
- Graziadei PP, Graziadei GA. 1979. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol* 8:1–18.
- Guerout N, Derambure C, Drouot L, Bon-Mardion N, Duclos C, Boyer O, Marie JP. 2010. Comparative gene expression profiling of olfactory ensheathing cells from olfactory bulb and olfactory mucosa. *Glia* 58:1570–1580.
- Guertin AD, Zhang DP, Mak KS, Alberta JA, Kim HA. 2005. Microanatomy of axon/glia signaling during Wallerian degeneration. *J Neurosci* 25:3478–3487.
- Gueye Y, Ferhat L, Sbai O, Bianco J, Ould-Yahoui A, Bernard A, Charat E, Chauvin JP, Risso JJ, Feron F, Rivera S, Khrestchatsky M. 2011. Trafficking and secretion of matrix metalloproteinase-2 in olfactory ensheathing glial cells: A role in cell migration? *Glia* 59:750–770.
- Hippenmeyer S, Youn YH, Moon HM, Miyamichi K, Zong H, Wynshaw-Boris A, Luo L. 2010. Genetic mosaic dissection of *Lis1* and *Ndel1* in neuronal migration. *Neuron* 68:695–709.
- Huang ZH, Wang Y, Cao L, Su ZD, Zhu YL, Chen YZ, Yuan XB, He C. 2008. Migratory properties of cultured olfactory ensheathing cells by single-cell migration assay. *Cell Res* 18:479–490.
- Ismail SA, Vetter IR, Sot B, Wittinghofer A. 2010. The structure of an Arf-ArfGAP complex reveals a Ca<sup>2+</sup> regulatory mechanism. *Cell* 141:812–821.
- Jani HR, Raisman G. 2004. Ensheathing cell cultures from the olfactory bulb and mucosa. *Glia* 47:130–137.
- Kueh JL, Raisman G, Li Y, Stevens R, Li D. 2011. Comparison of bulbar and mucosal olfactory ensheathing cells using FACS and simultaneous antigenic bivariate cell cycle analysis. *Glia* 59:1658–1671.
- Lakatos A, Franklin RJ, Barnett SC. 2000. Olfactory ensheathing cells and Schwann cells differ in their *in vitro* interactions with astrocytes. *Glia* 32:214–225.
- Lattin JE, Greenwood KP, Daly NL, Kelly G, Zidar DA, Clark RJ, Thomas WG, Kellie S, Craik DJ, Hume DA, Sweet MJ. 2009. Beta-arrestin 2 is required for complement C1q expression in macrophages and constrains factor-independent survival. *Mol Immunol* 47:340–347.
- Li Y, Field PM, Raisman G. 1997. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* 277:2000–2002.
- Li Y, Li D, Raisman G. 2005. Interaction of olfactory ensheathing cells with astrocytes may be the key to repair of tract injuries in the spinal cord: The “pathway hypothesis.” *J Neurocytol* 34:343–351.

- Lopez-Vales R, Garcia-Alias G, Fores J, Vela JM, Navarro X, Verdu E. 2004. Transplanted olfactory ensheathing cells modulate the inflammatory response in the injured spinal cord. *Neuron Glia Biol* 1:201–209.
- Nash HH, Borke RC, Anders JJ. 2001. New method of purification for establishing primary cultures of ensheathing cells from the adult olfactory bulb. *Glia* 34:81–87.
- Novikova LN, Lobov S, Wiberg M, Novikov LN. 2011. Efficacy of olfactory ensheathing cells to support regeneration after spinal cord injury is influenced by method of culture preparation. *Exp Neurol* 229:132–142.
- Parrinello S, Napoli I, Ribeiro S, Digby PW, Fedorova M, Parkinson DB, Doddrell RD, Nakayama M, Adams RH, Lloyd AC. 2010. EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell sorting. *Cell* 143:145–155.
- Paviot A, Guerout N, Bon-Mardion N, Duclos C, Jean L, Boyer O, Marie JP. 2011. Efficiency of laryngeal motor nerve repair is greater with bulbar than with mucosal olfactory ensheathing cells. *Neurobiol Dis* 41:688–694.
- Plachta N, Annaheim C, Bissiere S, Lin S, Ruegg M, Hoving S, Muller D, Poirier F, Bibel M, Barde YA. 2007. Identification of a lectin causing the degeneration of neuronal processes using engineered embryonic stem cells. *Nat Neurosci* 10:712–719.
- Ramon-Cueto A, Avila J. 1998. Olfactory ensheathing glia: properties and function. *Brain Res Bull* 46:175–187.
- Ramon-Cueto A, Nieto-Sampedro M. 1992. Glial cells from adult rat olfactory bulb: Immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells. *Neuroscience* 47:213–220.
- Ramon-Cueto A, Nieto-Sampedro M. 1994. Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants. *Exp Neurol* 127:232–244.
- Rela L, Bordey A, Greer CA. 2010. Olfactory ensheathing cell membrane properties are shaped by connectivity. *Glia* 58:665–678.
- Richter MW, Fletcher PA, Liu J, Tetzlaff W, Roskams AJ. 2005. Lamina propria and olfactory bulb ensheathing cells exhibit differential integration and migration and promote differential axon sprouting in the lesioned spinal cord. *J Neurosci* 25:10700–10711.
- Ruitenber MJ, Plant GW, Hamers FP, Wortel J, Blits B, Dijkhuizen PA, Gispen WH, Boer GJ, Verhaagen J. 2003. Ex vivo adenoviral vector-mediated neurotrophin gene transfer to olfactory ensheathing glia: Effects on rubrospinal tract regeneration, lesion size, and functional recovery after implantation in the injured rat spinal cord. *J Neurosci* 23:7045–7058.
- Saez de Guinoa J, Barrio L, Mellado M, Carrasco YR. 2011. CXCL13/CXCR5 signaling enhances BCR-triggered B-cell activation by shaping cell dynamics. *Blood* 118:1560–1569.
- Sherman DL, Fabrizi C, Gillespie CS, Brophy PJ. 2001. Specific disruption of a schwann cell dystrophin-related protein complex in a demyelinating neuropathy. *Neuron* 30:677–687.
- Windus LC, Lineburg KE, Scott SE, Claxton C, Mackay-Sim A, Key B, St John JA. 2010. Lamellipodia mediate the heterogeneity of central olfactory ensheathing cell interactions. *Cell Mol Life Sci* 67:1735–1750.

## ANNEXE II



# Potential of Olfactory Ensheathing Cells from Different Sources for Spinal Cord Repair

Anne Mayeur<sup>1,2</sup>, Célia Duclos<sup>1</sup>, Axel Honoré<sup>1</sup>, Maxime Gauberti<sup>3</sup>, Laurent Drouot<sup>4</sup>, Jean-Claude do Rego<sup>5</sup>, Nicolas Bon-Mardion<sup>1,2</sup>, Laetitia Jean<sup>4</sup>, Eric Vérin<sup>1</sup>, Evelyne Emery<sup>3</sup>, Sighild Lemarchant<sup>3</sup>, Denis Vivien<sup>3</sup>, Olivier Boyer<sup>4,6</sup>, Jean-Paul Marie<sup>1,2</sup>, Nicolas Guérout<sup>1\*</sup>

**1** UPRES EA 3830, Institute for Research and Innovation in Biomedicine, University of Rouen, Rouen, Normandy, France, **2** Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery Department, Rouen University Hospital, Rouen, Normandy, France, **3** Inserm UMR-S 919, Serine Proteases and Pathophysiology of the Neurovascular Unit, GIP Cycleron, Université de Caen Basse-Normandie, Caen, France, **4** Inserm, U905, Institute for Biomedical Research and Innovation, University of Rouen, Rouen, Normandy, France, **5** Platform of Behavioural Analysis (SCAC), Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Rouen University, France, National Center of Scientific Research (CNRS) - DR19, France, **6** Rouen University Hospital, Department of Immunology, Rouen, Normandy, France

## Abstract

Spinal cord injury (SCI) induces a permanent disability in patients. To this day no curative treatment can be proposed to restore lost functions. Therefore, extensive experimental studies have been conducted to induce recovery after SCI. One of the most promising therapies is based on the use of olfactory ensheathing cells (OECs). OECs can be obtained from either the olfactory bulbs (OB-OECs) or from olfactory mucosa (OM-OECs), involving a less invasive approach for autotransplantation. However the vast majority of experimental transplantations have been focusing on OB-OECs although the OM represents a more accessible source of OECs. Importantly, the ability of OM-OECs in comparison to OB-OECs to induce spinal cord recovery in the same lesion paradigm has never been described. We here present data using a multiparametric approach, based on electrophysiological, behavioral, histological and magnetic resonance imaging experiments on the repair potential of OB-OECs and OM-OECs from either primary or purified cultures after a severe model of SCI. Our data demonstrate that transplantation of OECs obtained from OB or OM induces electrophysiological and functional recovery, reduces astrocyte reactivity and glial scar formation and improves axonal regrowth. We also show that the purification step is essential for OM-OECs while not required for OB-OECs. Altogether, our study strongly indicates that transplantation of OECs from OM represents the best benefit/risk ratio according to the safety of access of OM and the results induced by transplantations of OM-OECs. Indeed, purified OM-OECs in addition to induce recovery can integrate and survive up to 60 days into the spinal cord. Therefore, our results provide strong support for these cells as a viable therapy for SCI.

**Citation:** Mayeur A, Duclos C, Honoré A, Gauberti M, Drouot L, et al. (2013) Potential of Olfactory Ensheathing Cells from Different Sources for Spinal Cord Repair. PLoS ONE 8(4): e62860. doi:10.1371/journal.pone.0062860

**Editor:** Fabrizio Gelain, University of Milan-Bicocca, Italy

**Received:** November 13, 2012; **Accepted:** March 26, 2013; **Published:** April 24, 2013

**Copyright:** © 2013 Mayeur et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The study was financially supported by ADIR (Aide à Domicile aux Insuffisants Respiratoires), Fondation de l'Avenir and IRIB (Institute for Research and Innovation in Biomedicine). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: nicolas.guerout@ki.se

## Introduction

Spinal cord injury (SCI) is a devastating disease leading to a loss of neural conduction. Sensory and motor pathways are interrupted resulting to paraplegia or tetraplegia for patients. After SCI several mechanisms take place such as astrocyte reactivity, formation of the glial scar, invasion of inflammatory cells resulting in a lack of axonal regrowth [1,2]. To this day no curative treatment is available for clinical use. Therefore extensive experimental studies have been conducted to increase axonal regrowth and to promote functional recovery after SCI using various therapies [3,4]. Many of these approaches have used cellular transplantation, such as Schwann cells (SC), neural stem cells, induced pluripotent stem cells or olfactory ensheathing cells (OECs, “OECs” is used to name all the olfactory ensheathing cells) with contrasting results [5–12]. OECs have gained considerable interest for the past decade due to the fact that OECs have shown a great potential to restore both

functional and anatomical recoveries after SCI [13]. OECs are neural crest cells which participate to neurogenesis occurring in the primary olfactory system throughout life in mammals [14]. Following transplantation in lesioned spinal cord, OECs were shown to enhance axonal regrowth, regulate astrocyte reactivity, increase angiogenesis and modulate glial scar leading to functional recovery in various models of SCI in rodents [15–19]. However, OECs are constituted of several subpopulations and the role of each of them following transplantation in injured spinal cord is not well described [20,21]. Specifically, OECs can be obtained from two different regions: olfactory mucosa (OM) and olfactory bulbs (OB) and it appears that OECs obtained from OM (OM-OECs) and OB (OB-OECs) have not the same properties and effects after transplantation *in vivo* [22,23]. Moreover, culture conditions, in particular the presence of microenvironment, can greatly influence OECs behaviors *in vitro* and *in vivo* [21,24]. OM-OECs are closely associated with primary olfactory neurons and fibroblasts,

whereas OB -OECs are in contact with fibroblasts and astrocytes both *in vitro* and *in vivo* [25–28]. For a clinical purpose these two aspects have some relevant consequences. Indeed, for clinical use, OECs could be obtained for autotransplantation easily by a simple biopsy of OM or more invasively, as described by Rubio et al., after an unilateral bulbectomy from OB [29]. Furthermore, OECs can be transplanted either as primary cultures or after additional purification steps and it is well described that time in culture can alter neurogenic properties of OECs [30,31].

Here we have directly compared the potential of OECs obtained and purified from the two sources in a severe model of SCI by a multiparametric approach. We demonstrate that transplantation of OECs induces electrophysiological and functional recovery, reduces astrocyte reactivity and glial scar formation and improves axonal regrowth. Moreover, in our model, transplantation of OECs from OM represents the best benefit/risk source, providing support for these cells as a new therapy for SCI in human.

## Materials and Methods

### General Overview

An overview of the paradigms used in this study is presented in Figure 1.

Briefly, cellular transplantations were performed after complete transection of the spinal cord from two sources (OB and OM) and cultured in two different ways (primary and purified). For OB (Primary OB) and OM (Primary OM), primary cultures were transplanted after 5 days *in vitro* (DIV). For OB (Purified OB), purified cultures were transplanted after 10 DIV. For OM (Purified OM), purified cultures were transplanted after 14 DIV. All different cell types were transplanted immediately after spinal cord transection. All groups of animals were analyzed 15, 30 and 60 days after surgery for electrophysiological and locomotor activities. Histological analyses were performed blindly 60 days after transplantation for all the groups. Then, additional animals treated with Md, Primary OB and Purified OM, which showed

higher potential to promote recovery, were used for MRI analyses 7 days after transplantation. Finally, OM purified cells, which constituted the most relevant group for clinical use, were labeled with GFP to visualize them 30 and 60 days after transplantation.

### Animals

Experiments were performed after acceptance by the local Ethics Committee for Animal Experiments in Normandy: N/02-11-10/22/11-13 in accordance with the French law on the protection of animals.

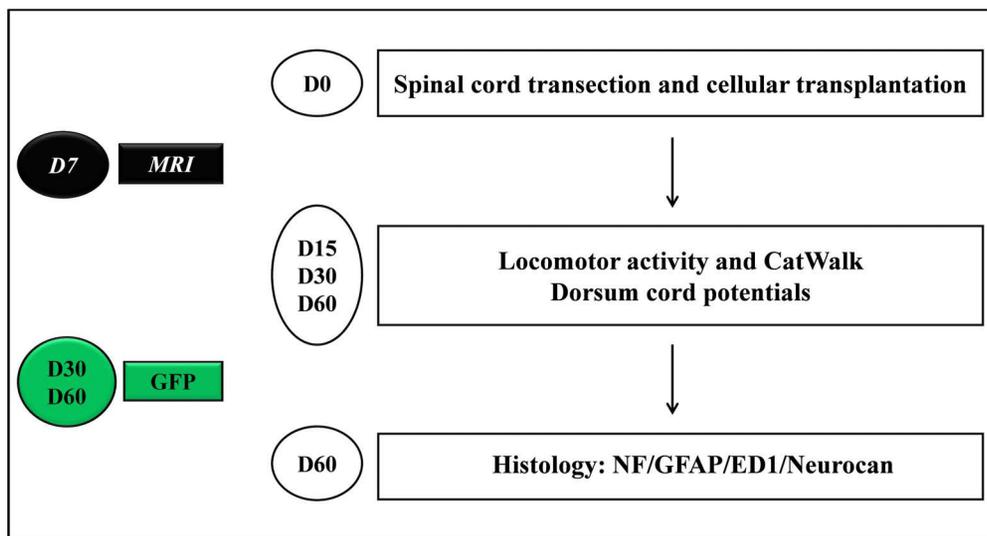
For this study, 95 8-weeks old and 30 3–4 weeks old male inbred Fischer rats were used (Charles River, L'Arbresle, France).

Individual rats were identified by implantation of glass tag (Biolog-id, Bernay, France); glass tag numbers have been used to perform blindly analyses.

### Cell Culture

All cultures have been performed in semi-sterile conditions with autoclaved surgery tools.

**Primary cultures.** OB and OM primary cultures were prepared as described previously with slight modifications [25,26]. Briefly, rats were deeply anesthetized (isoflurane) and decapitated. OB from one rat were immediately dissected and placed in 1 ml of Hank's buffered salt solution (H.B.S.S, Invitrogen, Carlsbad, CA), after removing the meninges. H.B.S.S containing 0.1% trypsin (Invitrogen) and OB were incubated for 45 min at 37°C. Trypsinization was stopped by adding Dulbecco's Modified Eagle's/Ham's F12 medium (D.M.E.M/F12, Invitrogen), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (F.B.S, Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) (DF-10S). The tissue was centrifugated at 1.000 RPM for 3 min, resuspended in DF-10S and centrifugated again. Tissue was then triturated in 3 ml DF-10S using a micropipette, until a homogenous cell suspension was obtained. Prior plating, undigested tissue blocks were removed by pipetting. Then, cells were plated (1.5–3.10<sup>6</sup> cells per flask) in DF-10S in 25 cm<sup>2</sup> flasks (Starlab, Bagneux, France), pre-coated with poly-L-Lysine (50 µg/



**Figure 1. Experimental paradigm illustrating the timeline of the major experimental manipulations.** Cells or medium were transplanted into sectioned spinal cords (D0). 15, 30 and 60 days after surgery animals were analyzed for electrophysiological and locomotor activities (D15, D30, D60). Histological analyses were performed 60 days after transplantation for all the groups (D60) (n = 10). On additional animals of OM-purified OECs tracking of GFP+ cells were performed 30 and 60 after transplantation (D30, D60). Each time point (n = 3) (in green). doi:10.1371/journal.pone.0062860.g001

ml, Invitrogen). The flasks were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. The medium was changed every two days. Five days after plating, OB primary cultures were used for transplantation.

In the same rats, the nasal cavity was opened sagittally with a spatula and OM was cut in small pieces. Care was taken to avoid to take cartilage. After a short rinse in H.B.S.S, samples from 1 rat were digested enzymatically in 1 ml of collagenase A (0.5%) for 45 min at 37°C (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). The OM is easily identified in the rat by its posterior position on the nasal septum and by the yellowish appearance of the epithelial surface. Care was taken to avoid the anterior edge of the OM which could have been contaminated with respiratory epithelium. Respiratory mucosa was removed from the dorso-anterior region of the septum. Then, samples were cultivated with the same protocol that for OB cultures [25]. Five days after plating, OM primary cultures were used for transplantation.

**Olfactory ensheathing cells purification.** OECs purification from OB were performed in using method described by Nash based on the differing rates of attachment of the various harvested cell types [32]. Briefly, the method of differential adhesion is based on a very low adhesion rate of OEC to the surface of uncoated culture flasks [32,33]. The cell suspension obtained from OB was resuspended in DF-10S, seeded on uncoated flask and cultured at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. After 18 h, the supernatant was removed and re-plated on other uncoated flasks and incubated for additional 36 h. The supernatants from these flasks were removed and re-plated on 25 cm<sup>2</sup> poly-L-lysine-coated culture flasks with DF-10S. Ten days after plating, OB purified cultures were used for transplantation.

OECs purification from OM was performed by using the method described by Bianco and modified by Gueye et al. [34,35]. Briefly, after one week in primary culture, cells were split by trypsinisation and replated in serum-free culture medium supplemented with 25 ng/mL of transforming growth factor  $\alpha$  (Sigma Aldrich, St Louis, MO) onto pre-coated flasks (poly-L-Lysine 50  $\mu$ g/ml). The second passage was performed 1 week after. Fourteen days after plating, OM purified cultures were used for transplantation.

**Preparation of the cells for grafting.** Before transplantation, cultures were trypsinized to remove them from the dishes, and the cells were counted using a hemocytometer. Cultures cells were resuspended in DF-10S immediately before grafting for a final concentration of 100,000 cells/ $\mu$ l. Samples of the different cultures were prepared for characterization as described below.

**Flow-cytometry analysis of OECs.** In order to characterize cellular preparations, flow-cytometry analysis was conducted. The cells were washed with PBS and treated with trypsin/EDTA in conjunction with the use of a cell scraper to remove adherent cells. Then, cells were washed with PBS/EDTA and immunolabeled, during 15 min at 4°C, with the anti-p75LNGFr (1:100) (Chemicon, Billerica, MA). At the end of the incubation, 2 ml of PBS/EDTA was added and the cells were centrifuged (300 g for 5 min). Cells were incubated with the secondary antibodies conjugated with phycoerythrin (1:200) for p75 (BD Biosciences, San Jose, CA). At the end of the incubation, 2 ml of PBS/EDTA was added and the cells were centrifuged (300 g for 5 min). Then, cells were resuspended in 500  $\mu$ l of PBS/EDTA. The total number of 10,000 events was analyzed on a FACSCalibur flow-cytometer (BD Biosciences) directly after the staining procedure. Data were processed using the FACSdiva program (BD Biosciences). Proportion of p75 positive cells in the various samples was determined by measuring the fluorescence intensity dot plot compared to the total amount of non-labeled cells.

Flow cytometry analysis allowed to determinate that OB primary cultures contained approximately 70% of p75 positive cells (Figure 2A) and OB purified cultures contained approximately 97% of p75 positive cells (Figure 2B), whereas in the same time OM cultures contained about 15% of p75 positive cells (Figure 2C) and OM purified cultures contained approximately 98% of p75 positive cells (Figure 2D).

**GFP labeling of transplanted cells.** This evaluation was performed in 6 other rats for Purified OM group, 3 rats were used at each time point (30 and 60 days).

Briefly, five days before transplantation, OM-OECs purified cultures were infected with a lentiviral vector harboring enhanced GFP (multiplicity of infection: 20, time of exposure overnight). Efficiency of infection was 80% determined by flow cytometry as previously described in "materials and methods". After several washing steps, GFP positive cells were injected as described below.

### Experimental Spinal Cord Lesion and Cell Transplantation Procedure

For experimental groups, adult Fischer inbred rats (225–250 g) were used.

All the rats were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride (12.5 mg/kg) and chlorpromazine hydrochloride (0.625 mg/kg).

Five groups (n = 10) were classified as follows:

Group 1: Medium group (Md). Complete spinal cord transection was performed and DF-10S was injected.

Group 2: OB-treated group (Primary OB). Complete spinal cord transection was performed and primary olfactory bulb cultures were transplanted.

Group 3: OM-treated group (Primary OM). Complete spinal cord transection was performed and primary olfactory mucosa cultures were transplanted.

Group 4: OB OECs-treated group (Purified OB). Complete spinal cord transection was performed and purified olfactory ensheathing cells from olfactory bulb were transplanted.

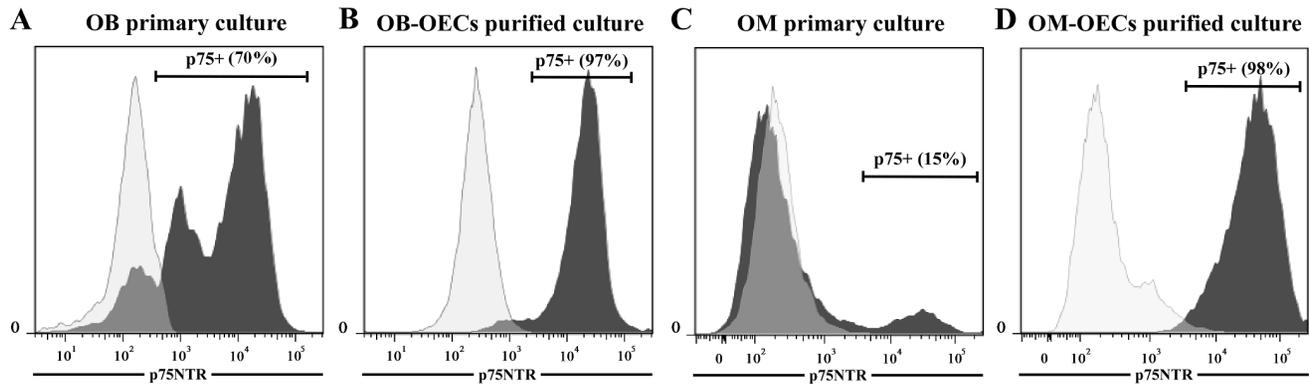
Group 5: OM OECs-treated group (Purified OM). Complete spinal cord transection was performed and purified olfactory ensheathing cells from olfactory mucosa were transplanted.

Control animals (Ctrl) were also used for histological analyses, for these no surgery was performed.

For all operated groups surgery was performed by the same operator as follow:

Through a midline dorsal incision, a standard bilateral Th10 laminectomy was performed with great care, in order to visualize the spinal cord. The dura was opened longitudinally and laterally at the level of the Th10 dorsal root. Then, the spinal cord was completely sectioned with a microscalpel, the cord stumps were lifted and a needle was passed between the two stumps to ensure completeness of the lesion.

Immediately after spinal cord transection, cells or medium were transplanted using a 5  $\mu$ l Hamilton glass syringe, connected to a 27 gauge needle and attached to a micromanipulator. Md treated animals received injection of DF-10S, and transplanted animals received cellular preparations. Medium or cells were injected to the spinal cord on the site of the lesion. Injections were delivered at spinal sites 1.5 mm laterally from the midline (2 sites) and 2 mm depth: 1 mm rostrally and 1 mm caudally. Each animal received a total of 4 injections (4 $\times$ 1  $\mu$ l) which contained cellular suspension (100,000 cells/ $\mu$ l) or DF-10S. The injection was given at 0.5  $\mu$ l/min. The delivery needle was left in the injection site for 2 min to avoid reflux. No immunosuppressant was used.



**Figure 2. P75 expression of primary OB (A) and OM (C) and purified OB-OECs (B) and OM-OECs (D) cultures.** After 5 and 10 days *in vitro*, cell surface expression of p75 in primary OB and purified OB cultures was determined by flow cytometry. Primary OB cultures were positive for p75 at 70% (A), whereas, OB purified cultures were positive for p75 at 97% (B). At the same time, After 5 and 14 days *in vitro* cell surface expression of p75, respectively, in primary OM and purified OM cultures was determined by flow cytometry. Primary OM cultures were positive for p75 at 15% (C), whereas, OM purified cultures were positive for p75 at 98% (D). Numbers indicate the total population and the percentage of cells present in the indicated gated region.

doi:10.1371/journal.pone.0062860.g002

All the rats were caged individually under heat lamp during 24 hours after surgery and give antibiotics for the first two weeks (Ceftriaxone, 80 mg/Kg).

Before and after the experiments, rats were kept on standard laboratory food and tap water ad libitum, with an artificial 12 hours light/dark cycle and caged by threes.

During all the experiments the bladder was compressed every day by manual abdominal pressure and rats were washed daily.

Despite all the precautions taken a high morbidity has been recorded, around 30%, thereby to obtain 10 rats in every group 15 rats per group were operated. 95 rats have been used for this study.

## Evaluation

Evaluations were performed 15, 30 and 60 days after surgery for electrophysiological and behavioral analyses and at 60 days after surgery for histological analysis on 10 rats per group.

Tracking of GFP positive OECs was performed at 30 and 60 days after surgery on 6 other rats for Purified OM treated group.

Experimental schedule is described in Figure 1.

**Electrophysiological studies.** Measurement of cord dorsum potentials (CDP) was recorded. For this, rats were anaesthetized with ketamine hydrochloride (30 mg/kg) in order to induce slight sedation. Then, an electrode was placed sub-cutaneously in the abdomen of the rats for electrical isolation and CDP were recorded using two recording electrodes placed in gastrocnemius muscles separated by 5 mm. Firstly, spinal cord has been stimulated in sub-lesional to validate the record. Stimulations were performed at Th2 level (above the lesion site) using a magnetic stimulator (Magstim, Rapid 2<sup>®</sup>) by 5 stimulations separated by 30 seconds with an intensity of 90% for supra maximal response. Then, amplitude was recorded and averaged for each animal.

**Measurement of locomotor activity.** Measurement of locomotor activity was performed as described previously [36]. Animals were placed individually in 40×40×30 cm compartments, in a lighted and quiet room. Locomotor activity was assessed automatically in a computerized actimeter (Versamax, AccuScan Instruments Inc, Ohio, USA), which monitored the horizontal displacements and vertical movements, including vertical time and vertical activity. The responses were expressed as the total number of beams crossed (horizontal and vertical

activity) and as time passed vertically (vertical time) by rats during six consecutive 10-minutes periods.

**CatWalk gait analysis.** CatWalk gait analysis was performed as described elsewhere [37]. Briefly, the animals crossed a horizontal glass runway equipped with a standard CCD camera connected to a computer with the CatWalk software (Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands). Animals were tested for at least three uninterrupted runs per animal. Coordination and different individual paw parameters were assessed to quantify functional recovery.

**Histological studies.** All the histological analyses were performed blindly.

In order to verify the correlation between electrophysiological, locomotor and anatomical recovery, we performed immunostaining for axonal regrowth, astrocyte reactivity, glial scar and inflammatory response. Briefly, anaesthetized rats were transcardially perfused first with ice-cold PBS for 2 min and then 4% paraformaldehyde for 15 min. Spinal cord segments were collected and post-fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h at 4°C. After cryopreservation in 30% sucrose at 4°C, spinal cord tissue was cut into longitudinal sections (20 μm) on a cryostat. Following two rinses in PBS, sections on slides were permeabilized using PBS containing 0.2% Triton X-100 for 30 min. Sections were incubated 30 min at room temperature with the corresponding primary antibody: anti-GFAP (1/200, Chemicon, Billerica, MA), anti-neurofilament H (1/200, Chemicon), anti-Neurocan (1/200, Chemicon) and anti-ED1 (1/200, Chemicon). To assess the specificity of the staining, positive and negative controls have been used prior to the experiments. In addition for each experiment, to measure background, slides without primary antibodies were used. Following primary antibody incubation, sections for ED1 and neurocan stainings were incubated 30 min at room temperature with the PE-conjugated anti-mouse antibody (1/500 BD Biosciences). GFAP and neurofilament antibodies were conjugated with Alexa Fluor<sup>®</sup> 488. Images were analyzed and captured with a fluorescence microscope equipped with apotome (100×; Axio-scope; Zeiss). Then, immunodensitometry were performed by outlining areas measuring 1.410<sup>6</sup> pixels (2.15 mm<sup>2</sup>) for GFAP, neurofilament, neurocan and ED1 stainings using ImageJ software (NIH software). For this, number of positive pixels was counted using the measure tool of ImageJ based on the threshold defined

with control animals (without surgery) as described by Stamegna et al. [19].

To address the localization of transplanted OM-OECs into the spinal cord, GFP-Neurofilament co-staining was performed using anti GFP antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA). Stainings were performed as described previously.

**MRI.** Experiments were performed 7 days after spinal cord transection in 4 other rats for Md, primary OB and purified OM treated groups (140–160 g) on a 7 Tesla Pharmascan magnet (Bruker, Germany) in anesthetized rats (1.5% isoflurane in O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O 33%/67%). Sagittal T2-weighted images were acquired with relaxation enhancement (RARE) with an accelerating factor of 4 (TR = ~ 6000 ms, TE = 40 ms, slice thickness = 0.5 mm, planar resolution of 100 μm \* 100 μm, acquisition time ~ 35 minutes). Image analysis was performed using Image J software.

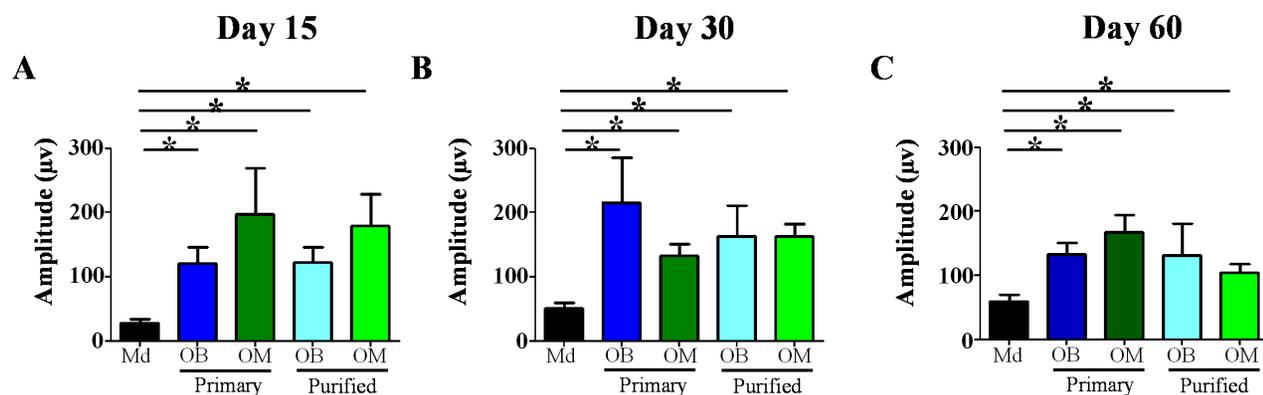
### Statistics

Prism software (Graphpad Software, La Jolla, CA.) was used for statistics. All data, except for Catwalk analysis, are presented as means ± SEM. Nonparametric test was used (Kruskal-Wallis), followed by a post test (Dunns), to identify differences between the groups. For CatWalk analyses data are presented as percentage of runs succeed and failed and a Fisher's exact test was performed. Differences were accepted as statistically significant at \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , or, and \*\*\* $p < 0.001$ .

## Results

### Electrophysiological Studies

Stimulations were performed above the lesion site and CDP were measured using electrodes placed in gastrocnemius muscles. These analyses showed that at D15, all OECs treated groups presented a significant improvement of the CDP amplitudes in comparison to the Md group ( $p < 0.05$ ) (Figure 3A). Increase of CDP amplitudes persisted for the full time duration of the experiment for all OECs treated groups. In fact, all OECs treated groups showed at D30 and D60 significantly higher CDP amplitudes in comparison to the Md group ( $p < 0.05$ ) (Figures 3B and C). For this analysis no difference could be observed between the different OECs treated groups (Figure 3). These results demonstrate that transplantations of different types of OECs equally induce electrophysiological recovery from early (D15) to late time points (D60).



**Figure 3. Analysis of electrophysiological activities.** Measurement of cord dorsum potentials (A–C) shows that transplantation of OECs leads to increase potential amplitude from all OECs treated groups at all-time points studied (A–C). Md: Medium, OB: Olfactory Bulb, OM: Olfactory Mucosa. Statistical comparisons were performed using a nonparametric test (Kruskal-Wallis). Mean ± SEM represents data from 10 rats per group. \*:  $p$  value < 0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0062860.g003

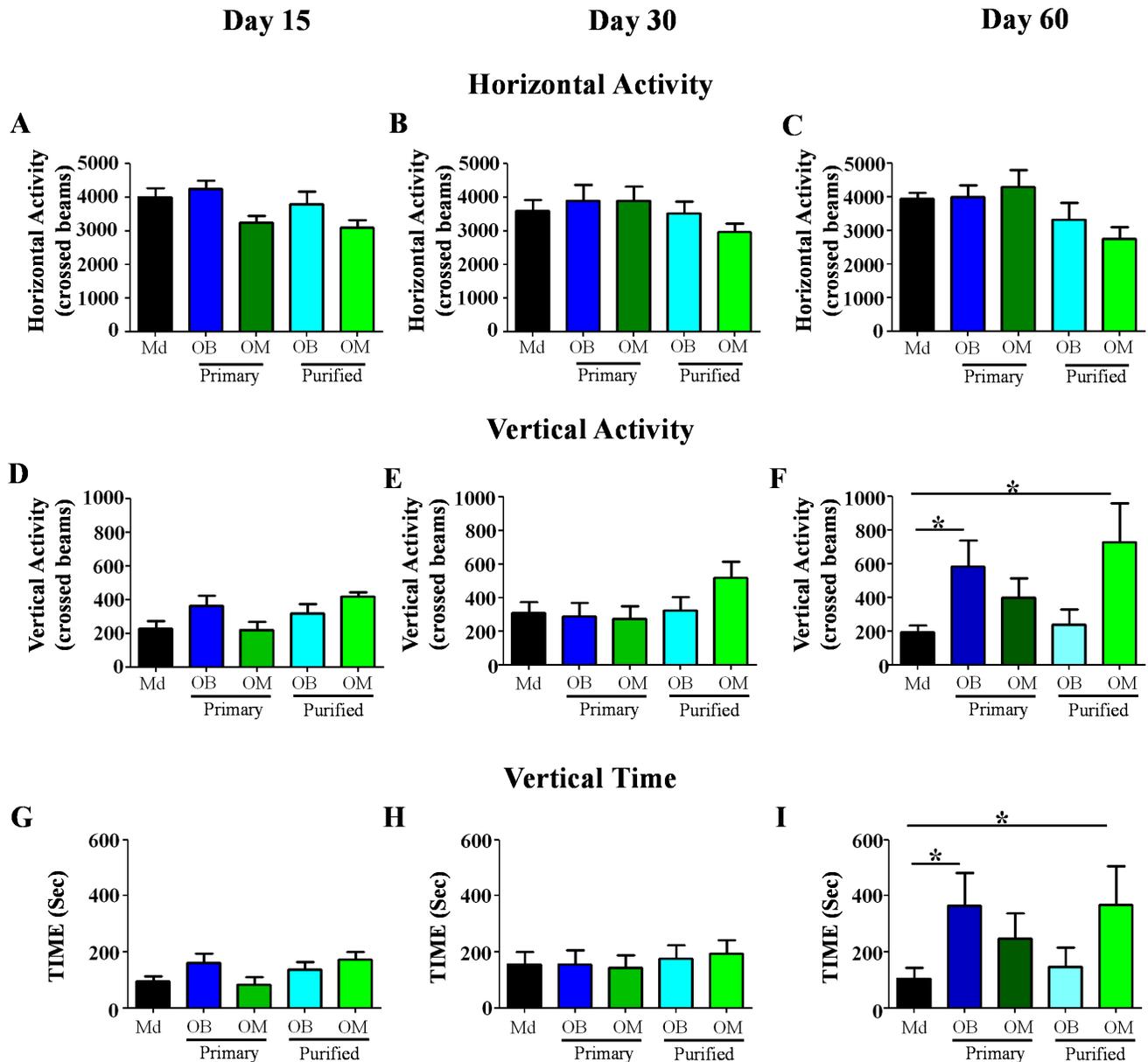
### Behavioral Studies

**Measurement of locomotor activity.** Measurement of horizontal activity revealed that during the full duration of the experiment all groups presented no significant difference for this parameter (Figures 4A–C). These results demonstrate that all groups have the same ability to move and to explore. At D15 and D30 all the groups showed no significant difference for vertical activity and vertical time (Figures 4D–E and G–H). However, at D60, Primary OB and Purified OM treated groups presented a significant higher vertical activity ( $p < 0.05$ ) in comparison to the Md treated group (Figure 4F). Similarly, at D60 Primary OB and Purified OM treated groups presented a significantly higher vertical time ( $p < 0.05$ ) in comparison to the Md treated group (Figure 4I). These results indicate that Primary OB and Purified OM can promote locomotor activity, in particular ability to stand up and to maintain a standing position, at later time (D60).

**CatWalk gait analysis.** This analysis revealed that for all time points analyzed there was no significant differences between all the groups, due to a high intra-group dispersion (data not shown). However, contingency analysis was performed. For this, we have counted all the runs performed by the animals during the three distinct periods (D15 to D60). Then, we have counted the number of successes and failures based on the ability of animals to have walking into the corridor and we have determined the ratio of successes and failures for each group. This analysis showed that Primary OB, Purified OB and Purified OM treated groups displayed a significantly higher rate of runs succeed in comparison to the Md treated animals. Indeed, 0% of the Md treated group has been walking during all the runs, in comparison, 21.6% of the Primary OB ( $p < 0.05$ ), 26% of the Purified OB ( $0.01 < p < 0.001$ ) and 36.7% of the Purified OM treated animals ( $p < 0.001$ ) were able to walk into the corridor during all the runs (Table 1). Moreover, Purified OM treated group showed a significantly higher probability to walk in comparison to the Primary OM treated animals ( $p < 0.05$ ). These results demonstrate that Primary OB, Purified OB and Purified OM treated groups, but not Primary OM treated group can improve ability to walk.

### Histological Analysis

All the histological analyses were performed on longitudinal sections. At D60, histological analyses on an equivalent area revealed that Primary OB, Purified OB and Purified OM treated groups presented a significantly higher staining for neurofilament,



**Figure 4. Analysis of locomotor activities.** A–C: horizontal activity D–F: vertical activity and G–I: vertical time. Measurement of locomotor activity (A–C) reveals that there is no significant difference between the groups for horizontal activity at all-time points. This analyses shows that transplantation of Primary OB and Purified OM improve vertical activity (F) and vertical time (I) at 60 days. Md: Medium, OB: Olfactory Bulb, OM: Olfactory Mucosa. Statistical comparisons were performed using a nonparametric test (Kruskal-Wallis). Mean±SEM represents data from 10 rats per group. \*: p value<0.05.  
doi:10.1371/journal.pone.0062860.g004

used as a marker of axonal regrowth, in comparison to Md treated group ( $p < 0.05$ ) (Figure 5A). Primary OM treated group did not show difference with Md treated group (Figure 5A). Representative pictures are presented for each group for neurofilament staining (Figures 5B–F). Conversely, similar histological analyses revealed that all OECs treated groups presented a significantly lower staining for GFAP, used as a marker of astrocyte reactivity, in comparison to Md treated group ( $p < 0.05$ ) (Figure 5G) [38]. Representative pictures are presented for each group for GFAP staining (Figures 5H–L). We also performed neurocan staining, an extracellular matrix (ECM) protein present in the glial scar, and showed that all OECs treated groups presented a significant reduction for this staining ( $0.01 < p < 0.001$  for Primary OM and

OB treated groups and  $p < 0.001$  for Purified OB and OM treated groups) in comparison to Md treated group (Figure 5M). Of interest, Purified OM treated group showed the greatest reduction of neurocan staining ( $p < 0.05$ ). Representative pictures are presented for each group for neurocan staining (Figures 5O–S).

At D60, there was no difference in ED1 staining, used as a marker of activated microglia, monocytes and macrophages, between all groups. In fact, all groups presented a high ED1+ invasion into the spinal cord parenchyma (Figure 5T). Representative pictures are presented for each group for ED1 staining (Figures 5U–Y). Complementary analyses were performed in order to determine the potential presence of distinct subpopulations of macrophages (M1 and M2) into the ED1+ cells. For this,

**Table 1.** Catwalk analysis.

	Md	Primary OB	Primary OM	Purified OB	Purified OM
Run succeed (%)	0–0/25	21.6*–8/37	10.3–3/29	26**–8/31	36.7*** #–11/30
Run failed (%)	100–25/25	78.4–29/37	89.7–26/29	74–23/31	63.3–19/30

Catwalk analysis reveals that Primary OB, Purified OB and Purified OM animals show a significant higher probability to walk (based of the higher rate of runs succeed). Percentage (%) is based on run succeed or failed during all the time points. Total number of runs succeed and failed are presented for each group. Md: Medium, OB: Olfactory Bulb, OM: Olfactory Mucosa. Statistical comparisons were performed using a Fisher's exact test.

\*: p value<0.05;

\*\* : p value<0.01,

\*\*\*: p value<0.001 and #: p value<0.05.

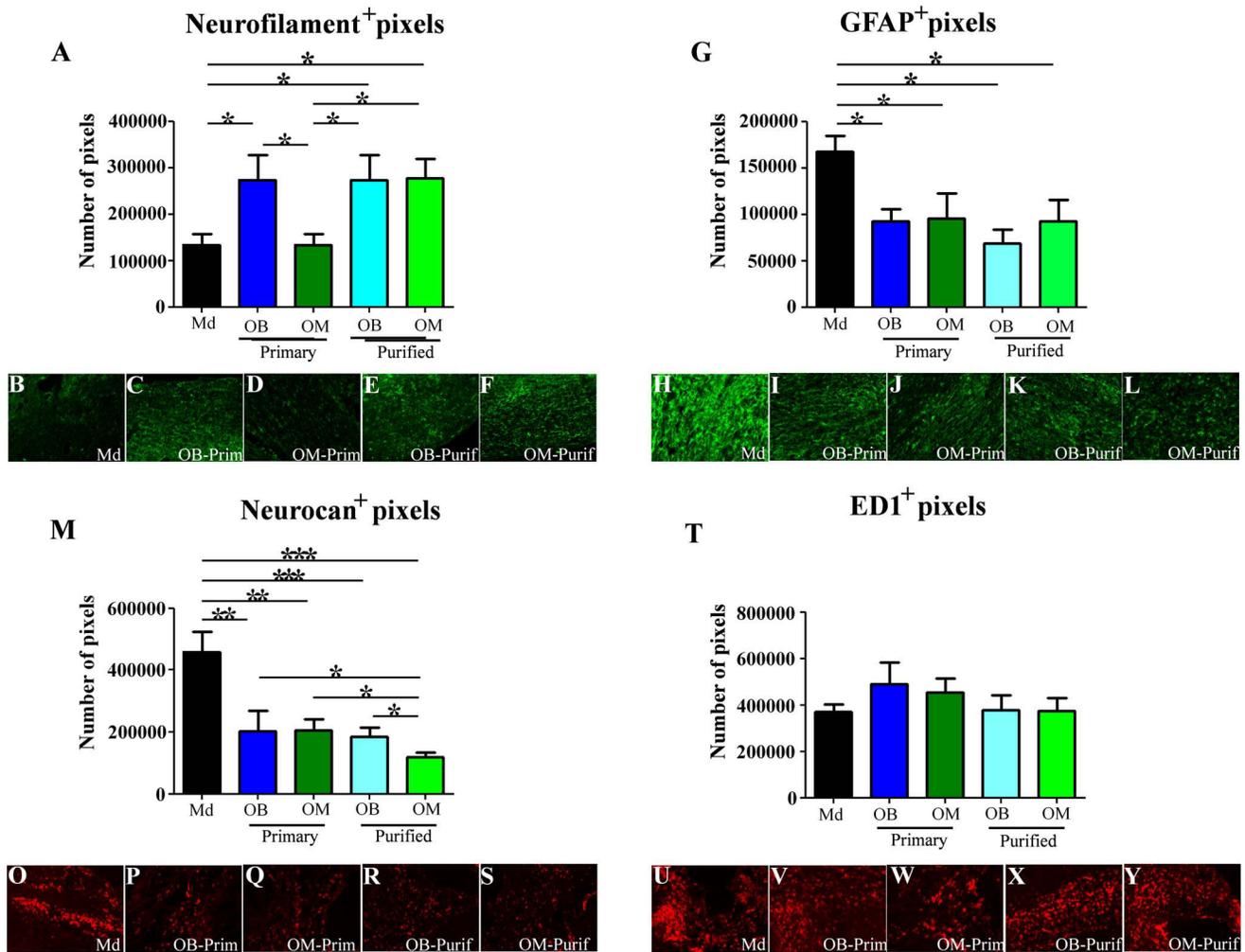
\*represents significant differences between transplanted groups (Primary OB, Purified OB and Purified OM) and Md group.

#represents significant difference between Purified OM and Md groups.

doi:10.1371/journal.pone.0062860.t001

histological analyses based on MMP9-ED1 co-staining were done, but no difference could be observed between the groups (data not shown). We further confirmed these results by an *in vitro* approach

using macrophages (NR8383 cells) cultured with conditioned medium obtained from OM and OB-OECs [7]. Quantification of IL-12 and IL-10 secretion showed that conditioned medium from



**Figure 5. Histological analyses.** Histological analyses on longitudinal sections were performed for neurofilament (A), GFAP (G), Neurocan (M) and ED1 (T). These analyses reveal that Primary OB, Purified OB and Purified OM OECs increase axonal regrowth (neurofilament (A)), reduce astrocyte reactivity (GFAP (G)) and glial scar formation (Neurocan (M)). At the same time this analysis reveals that OECs transplantations had no influence on monocytes/microglia infiltration (ED1 (T)). Typical illustrations, are shown for each group for neurofilament (B–F), GFAP (H–L), neurocan (O–L) and ED1 (U–Y). Md: Medium, OB: Olfactory Bulb, OM: Olfactory Mucosa. Statistical comparisons were performed using a nonparametric test (Kruskal-Wallis). Mean ± SEM represents data from 10 rats per group. \*: p value<0.05; \*\*: p value<0.01 and \*\*\*: p value<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0062860.g005

OM or OB-OECs had no effect on macrophage phenotype in culture (data not shown).

Altogether, these results demonstrate that all OECs treated groups presented a reduction of GFAP (astrocyte reactivity) and neurocan (glial scar component) stainings in comparison to Md treated group and in particular Purified OM treated group displayed a significantly greater reduction of neurocan expression in comparison to all the other OECs treated groups. However it could be demonstrated that Primary OB, Purified OB and Purified OM treated groups and not Primary OM treated group showed an increase of the axonal regrowth (neurofilament) in comparison to Md treated group.

### MRI Analysis

To further address the inflammatory infiltrate and formation of the glial scar at early time point after surgery and/or cellular transplantation, we performed MRI experiments after 7 days. For this analysis 4 other rats of Md, Primary OB and Purified OM treated groups, which showed higher potential to promote recovery, were used. Transplanted animals (Figures 6C and D) presented a reduction of the signal intensity (delimited by white areas) in comparison to the hyperintense sequences of the Md treated animals (Figure 6B). This result based on T2\* IRM sequences indicates that OEC transplantations reduce inflammatory infiltrate and edema into the spinal cord parenchyma at early time. Animals without surgery served as control (Figure 6A).

### Tracking of GFP+ OM-OECs

For this analysis, 6 other rats for Purified OM treated group, which constituted the most relevant group for clinical use, were used. Tracking of GFP+ OM-OECs was performed 30 and 60 days after surgery on 3 rats for each time point. Histological analyses, based on longitudinal sections, revealed that a similarly high number of GFP+ cells could be found at the lesion site and both distally (Figures 7C and F) and proximally (Figures 7A and D) to the injection site at both time points in all the rats transplanted.

Image analysis demonstrated that OECs were spread on a distance of 1.5 cm and on a maximal distance of the injection sites

of around 0.35 cm. It should be noted that the lesion site did not show gap 60 days after transplantation (white arrows) (Figure 7E) in contrary to 30 days after transplantation (Figure 7B).

To address the localization of OECs into the spinal cord, GFP-Neurofilament co-staining was performed and shows that OECs were closely associated to neurofilament 30 and 60 days after surgery (Figures 7G–I2).

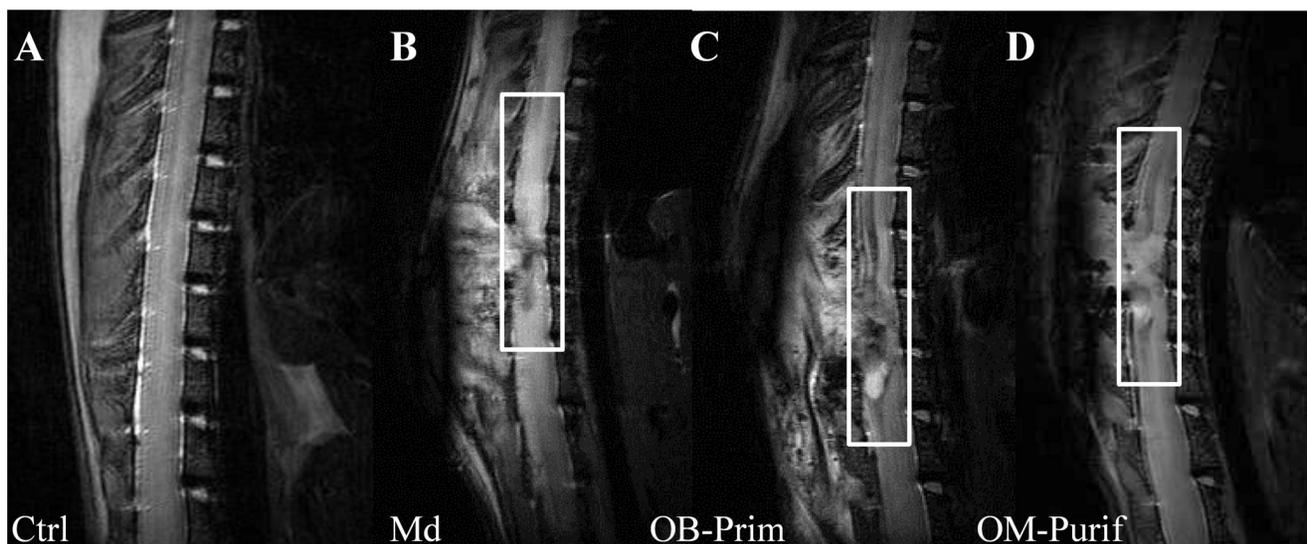
Altogether, these results demonstrate that OM-OECs can survive up to 60 days, migrate and are associated with regrowing axons in the lesioned spinal cord.

### Discussion

Numerous reports have attempted to address the role of OECs transplantations after SCI using different experimental paradigms [13,38–42]. However, none of these studies has directly compared the therapeutic benefit of OM and OB-OECs, from primary or purified cultures, by electrophysiological, functional and histological analyses. To our knowledge, this is the first report which described by a multi-parametric approach the effects of OECs from different sources in a severe SCI model.

For our study we have chosen a complete transection model due to the fact that this model is easily reproducible and induces a permanent disability on lesioned animals [43,44]. To ensure of the completeness and the reproducibility of the section all the surgeries have been performed by the same operator (A.M) and preliminary animals have been used in which we have performed immediate electrophysiology analyses after transection for demonstrating the abolition of the electrical signal.

Locomotor activity and catwalk tests have been chosen preferentially to BBB to monitor functional recovery, because they are computer-assisted analysis and allow to collect quantitative data with a great precision. Indeed, locomotor activity analyses revealed that all the lesioned animals have the same horizontal activity (ability to move), however OECs transplantations specifically induce stand up ability in Primary OB and Purified OM treated animals. These results prove that Md animals were specifically not able to stand up (Figure 4).



**Figure 6. MRI analyses.** MRI analyses revealed that Primary OB (C) and Purified OM OECs (D) decreased inflammatory infiltrate and edema 7 days after transplantation. Boxes represent areas of injury. Typical illustrations are shown for control (A), Md (B), Primary OB (C) and Purified OM OECs (D). Ctrl: Control, Md: Medium, OB: Olfactory Bulb, OM: Olfactory Mucosa. Illustrations are representative of four different animals for each group. doi:10.1371/journal.pone.0062860.g006



Our results demonstrate that transplantation of OECs constitutes a very promising therapy for SCI independently of their source. Indeed, OECs induced electrophysiological and functional recovery (Figures 3 and 4 and Table 1), reduced astrocyte reactivity and glial scar (based on neurocan expression) and improved axonal regrowth (Figure 5). Interestingly, ED1 staining revealed that OECs seem to have no effect on macrophage/microglia response 60 days after SCI (Figure 5). To further address ability of OECs to modulate processes and formation of the glial scar at early time point after surgery and/or cellular transplantation MRI analyses were performed. Seven days after surgery the MRI sequences in treated groups showed a reduction of the signal intensity in comparison to the untreated group. These results could be interpreted as a reduction of the inflammatory infiltrate and edema or as a reduction of the cystic cavities. Both of these hypotheses seem to indicate a decrease of the inflammatory processes 7 days after surgery in transplanted groups (Primary OB and Purified OM groups). Our results show equally that electric recovery (based on measurement of cord dorsum potentials) appeared early after transplantation (D15) in treated groups. However, this recovery is followed by later functional recovery in primary OB and purified OM-OECs treated groups (D60). These results could be probably explained by the fact that to induce functional recovery, neurons have not only to regrow but also to form connections to constitute neuronal network.

Although no significant difference about functional recovery can be showed between OB-Primary and OM-Purified groups, our study highlights that OECs obtained and purified from OM present the best benefit/risk ratio. This result is a fundamental point for a future human clinical application, due to the fact that OM is the more accessible source for OECs.

In our study, as previously reported, purification of primary cultures has no effect in case of transplantation of OECs obtained from OB (Figures 3–5 and Table 1) which can be explained in several ways [24]. First, deprivation of microenvironment induces a loss of the two distinct subpopulations of OECs present in primary OB cultures, leading to a decrease in the recovery of the treated animals [21]. Secondly the rate of OECs is around 70% in primary OB cultures which might not be a limiting factor for functional and anatomical recovery in our SCI model. Finally, the “fibroblast-like” cells present in primary OB cultures may play an important role for the integration of OECs in the spinal cord [28,45]. Indeed, a recent study has underlined the main role of fibroblasts on SC for axonal regrowth after Wallerian degeneration in peripheral nerve injury (PNI) [46]. It could be reasonably envisaged, due to the common origin of SC and OECs, that “fibroblast-like” cells have the same influence on OECs, even in the case of transplantation in a lesioned spinal cord [14,47].

In contrast, purification of OECs from OM cultures improves significantly both functional and anatomical recoveries which is highly relevant for future clinical applications. Several hypotheses could explain the differences observed between primary and purified cultures upon transplantation. First, primary OM cultures have a relatively low content of OECs (15%) which could explain the poor functional recovery of this group. Nevertheless, several studies have reported benefic functional effects after transplantation of low dose of OECs [16,48]. Another hypothesis is that contaminating cells present in primary OM cultures inhibit axonal regrowth. In our study, histological analyses revealed that Primary OM treated group displayed no difference according to neurofilament staining in comparison to Md group, whereas in the same time Purified OM treated group showed a significant increase for this parameter ( $p < 0.05$ ) (Figure 5). We previously have reported that transplantation of primary OM cultures after PNI induces

functional recovery without improvement of axonal regrowth [23]. The microenvironment present in primary OM cultures could also induce a higher mortality after cellular transplantation. One last hypothesis is that the purification method used, based on privative medium, might induce modification or selection of specific cell subpopulations. A recent study has reported that primary OM cultures contain distinct populations of cells, assumed to be OECs, therefore serum deprivation may select specifically one of them [49]. Complementary studies should be performed to address this specific point.

Previous studies have compared OM and OB-OECs in both *in vitro* cultures and after PNI *in vivo* [23,50,51]. They have shown some differences such as distinct ability to induce axonal regrowth, to modulate ECM and to interact with primary olfactory neurons [23,50,51]. In our present study, no major differences in functional recovery after transplantation of OM and OB-OECs were observed upon SCI (Figures 3–5). However, our histological analyses revealed a significant difference between these groups. In fact, neurocan staining showed that Purified OM group presented a significant reduction of this parameter in comparison to Primary OB and Purified OB treated groups ( $p < 0.05$ ) (Figure 5). Recently, it was discovered that ADAMTS-4 could play a major role in degradation of the glial scar. Indeed, chondroitin sulfate proteoglycans (CSPG) are a major component of the glial scar with axonal growth inhibitory properties. Recently, it was shown that ADAMTS-4 could degrade CSPG as neurocan, brevican and phosphacan *in vitro* and *in vivo* and that local administration of ADAMTS-4 can promote functional recovery after SCI [4]. We have previously shown that ADAMTS-4 is more highly expressed by OM-OECs than by OB-OECs *in vitro* [20]. We have further confirmed this result at the protein level (data not shown). Previous studies have demonstrated the ability of OM-OECs to modulate the ECM [35,52]. Therefore, complementary studies on the capacity of OM-OECs, in particular the potential role of ADAMTS-4 to regulate glial scar, should be conducted.

Visualization of GFP labeled OM-OECs showed that they were present and closely associated to neurofilament+ fibers (Figure 6). We showed that OM-OECs could migrate into the injured spinal cord and survive for up to 60 days. OM-OECs, in our model, migrated up to 3.5 mm, a distance close to previously reported genetically modified SC (4.4 mm) [8]. These results highlight the potential of OM-OECs to migrate and to integrate into the injured spinal cord.

Altogether, the accessibility and the recovery properties of OECs allow to propose them as a future relevant biotherapy for spinal cord repair. Several types of cellular transplantations have been tested to promote SCI recovery in rodent models, however few of these could be proposed for clinical use. In fact for a human application, the cells must be easily sampled and cultured even from adult, must present weak risk of teratogenicity and must induce functional recovery. OECs have all these advantages and criteria. Specifically, OM-OECs can be obtained from nasal biopsies and cultured with high purity and present a high benefit/risk balance due to the fact that OECs are differentiated cells, are stable even after long term cultures from adult primates and induce functional and anatomical recoveries [29,34].

We have demonstrated the potential of different OECs sources. However a better molecular understanding on the culture effect and subpopulations will further strengthen the clinical potential and use of OECs for SCI.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Fanie Barnabé-Heider for editing the manuscript.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AM JPM NG. Performed the experiments: AM CD AH MG LD JCDR NBM LJ EV SL NG. Analyzed

the data: AM MG LD JCDR EE JPM NG. Wrote the paper: AM DV OB JPM NG.

## References

- Horn KP, Busch SA, Hawthorne AL, van Rooijen N, Silver J (2008) Another barrier to regeneration in the CNS: activated macrophages induce extensive retraction of dystrophic axons through direct physical interactions. *J Neurosci* 28: 9330–9341.
- Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5: 146–156.
- Alilain WJ, Horn KP, Hu H, Dick TE, Silver J (2011) Functional regeneration of respiratory pathways after spinal cord injury. *Nature* 475: 196–200.
- Tauchi R, Imagama S, Natori T, Ohgomori T, Muramoto A, et al. (2012) The endogenous proteoglycan-degrading enzyme ADAMTS-4 promotes functional recovery after spinal cord injury. *J Neuroinflammation* 9: 53.
- Resnick DK, Cechvala CF, Yan Y, Witwer BP, Sun D, et al. (2003) Adult olfactory ensheathing cell transplantation for acute spinal cord injury. *J Neurotrauma* 20: 279–285.
- Takeoka A, Jindrich DL, Munoz-Quiles C, Zhong H, van den Brand R, et al. (2011) Axon regeneration can facilitate or suppress hindlimb function after olfactory ensheathing glia transplantation. *J Neurosci* 31: 4298–4310.
- Busch SA, Hamilton JA, Horn KP, Cuascat FX, Cutrone R, et al. (2011) Multipotent adult progenitor cells prevent macrophage-mediated axonal dieback and promote regrowth after spinal cord injury. *J Neurosci* 31: 944–953.
- Ghosh M, Tuesta LM, Puentes R, Patel S, Melendez K, et al. (2012) Extensive cell migration, axon regeneration, and improved function with polysialic acid-modified Schwann cells after spinal cord injury. *Glia* 60: 979–992.
- Fujimoto Y, Abematsu M, Falk A, Tsujimura K, Sanosaka T, et al. (2012) Treatment of a mouse model of spinal cord injury by transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells. *Stem Cells* 30: 1163–1173.
- Perrin FE, Boniface G, Serguera C, Lonjon N, Serre A, et al. (2010) Grafted human embryonic progenitors expressing neurogenin-2 stimulate axonal sprouting and improve motor recovery after severe spinal cord injury. *PLoS One* 5: e15914.
- Lu J, Feron F, Ho SM, Mackay-Sim A, Waite PM (2001) Transplantation of nasal olfactory tissue promotes partial recovery in paraplegic adult rats. *Brain Res* 889: 344–357.
- Steward O, Sharp K, Selvan G, Hadden A, Hofstadter M, et al. (2006) A re-assessment of the consequences of delayed transplantation of olfactory lamina propria following complete spinal cord transection in rats. *Exp Neurol* 198: 483–499.
- Li Y, Field PM, Raisman G (1997) Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* 277: 2000–2002.
- Barraud P, Seferiadis AA, Tyson LD, Zwart MF, Szabo-Rogers HL, et al. (2010) Neural crest origin of olfactory ensheathing glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 21040–21045.
- Polentes J, Stamegna JC, Nieto-Sampedro M, Gauthier P (2004) Phrenic rehabilitation and diaphragm recovery after cervical injury and transplantation of olfactory ensheathing cells. *Neurobiol Dis* 16: 638–653.
- Yamamoto M, Raisman G, Li D, Li Y (2009) Transplanted olfactory mucosal cells restore paw reaching function without regeneration of severed corticospinal tract fibres across the lesion. *Brain Res* 1303: 26–31.
- Ramon-Cueto A, Plant GW, Avila J, Bunge MB (1998) Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci* 18: 3803–3815.
- Lakatos A, Franklin RJ, Barnett SC (2000) Olfactory ensheathing cells and Schwann cells differ in their in vitro interactions with astrocytes. *Glia* 32: 214–225.
- Stamegna JC, Felix MS, Roux-Peyronnet J, Rossi V, Feron F, et al. (2011) Nasal OEC transplantation promotes respiratory recovery in a subchronic rat model of cervical spinal cord contusion. *Exp Neurol* 229: 120–131.
- Guerout N, Derambure C, Drouot L, Bon-Mardion N, Duclos C, et al. (2010) Comparative gene expression profiling of olfactory ensheathing cells from olfactory bulb and olfactory mucosa. *Glia* 58: 1570–1580.
- Honore A, Le Corre S, Derambure C, Normand R, Duclos C, et al. (2012) Isolation, characterization, and genetic profiling of subpopulations of olfactory ensheathing cells from the olfactory bulb. *Glia* 60: 404–413.
- Richter MW, Fletcher PA, Liu J, Tetzlaff W, Roskams AJ (2005) Lamina propria and olfactory bulb ensheathing cells exhibit differential integration and migration and promote differential axon sprouting in the lesioned spinal cord. *J Neurosci* 25: 10700–10711.
- Paviot A, Guerout N, Bon-Mardion N, Duclos C, Jean L, et al. (2011) Efficiency of laryngeal motor nerve repair is greater with bulbar than with mucosal olfactory ensheathing cells. *Neurobiol Dis* 41: 688–694.
- Lakatos A, Smith PM, Barnett SC, Franklin RJ (2003) Meningeal cells enhance limited CNS remyelination by transplanted olfactory ensheathing cells. *Brain* 126: 598–609.
- Ramon-Cueto A, Nieto-Sampedro M (1992) Glial cells from adult rat olfactory bulb: immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells. *Neuroscience* 47: 213–220.
- Jani HR, Raisman G (2004) Ensheathing cell cultures from the olfactory bulb and mucosa. *Glia* 47: 130–137.
- Windus LC, Lineburg KE, Scott SE, Claxton C, Mackay-Sim A, et al. (2010) Lamellipodia mediate the heterogeneity of central olfactory ensheathing cell interactions. *Cell Mol Life Sci* 67: 1735–1750.
- Li Y, Li D, Raisman G (2005) Interaction of olfactory ensheathing cells with astrocytes may be the key to repair of tract injuries in the spinal cord: the 'pathway hypothesis'. *J Neurocytol* 34: 343–351.
- Rubio MP, Munoz-Quiles C, Ramon-Cueto A (2008) Adult olfactory bulbs from primates provide reliable ensheathing glia for cell therapy. *Glia* 56: 539–551.
- Pastrana E, Moreno-Flores MT, Avila J, Wandosell F, Minichiello L, et al. (2007) BDNF production by olfactory ensheathing cells contributes to axonal regeneration of cultured adult CNS neurons. *Neurochem Int* 50: 491–498.
- Radtke C, Lankford KL, Wewetzer K, Imaizumi T, Fodor WL, et al. (2010) Impaired spinal cord remyelination by long-term cultured adult porcine olfactory ensheathing cells correlates with altered in vitro phenotypic properties. *Xenotransplantation* 17: 71–80.
- Nash HH, Borke RC, Anders JJ (2001) New method of purification for establishing primary cultures of ensheathing cells from the adult olfactory bulb. *Glia* 34: 81–87.
- Novikova LN, Lobov S, Wiberg M, Novikov LN (2011) Efficacy of olfactory ensheathing cells to support regeneration after spinal cord injury is influenced by method of culture preparation. *Exp Neurol* 229: 132–142.
- Bianco JI, Perry C, Harkin DG, Mackay-Sim A, Feron F (2004) Neurotrophin 3 promotes purification and proliferation of olfactory ensheathing cells from human nose. *Glia* 45: 111–123.
- Gueye Y, Ferhat L, Sbail O, Bianco J, Ould-Yahoui A, et al. (2011) Trafficking and secretion of matrix metalloproteinase-2 in olfactory ensheathing glial cells: A role in cell migration? *Glia* 59: 750–770.
- do Rego JC, Orta MH, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, et al. (2007) Pharmacological characterization of the receptor mediating the anorexigenic action of the octadecaneuropeptide: evidence for an endozepinergic tone regulating food intake. *Neuropsychopharmacology* 32: 1641–1648.
- Hamers FP, Lankhorst AJ, van Laar TJ, Veldhuis WB, Gispen WH (2001) Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries. *J Neurotrauma* 18: 187–201.
- Toft A, Tome M, Barnett SC, Riddell JS (2013) A comparative study of glial and non-neural cell properties for transplant-mediated repair of the injured spinal cord. *Glia*.
- Fouad K, Schnell L, Bunge MB, Schwab ME, Liebscher T, et al. (2005) Combining Schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord. *J Neurosci* 25: 1169–1178.
- Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J (2000) Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* 25: 425–435.
- Ruitenbergh MJ, Plant GW, Christensen CL, Blits B, Niclou SP, et al. (2002) Viral vector-mediated gene expression in olfactory ensheathing glia implants in the lesioned rat spinal cord. *Gene Ther* 9: 135–146.
- Ramer LM, Au E, Richter MW, Liu J, Tetzlaff W, et al. (2004) Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury. *J Comp Neurol* 473: 1–15.
- Lu P, Wang Y, Graham L, McHale K, Gao M, et al. (2012) Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury. *Cell* 150: 1264–1273.
- Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, Nakamura S, Naruse M, et al. (2012) Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest* 122: 80–90.
- Li Y, Field PM, Raisman G (2005) Olfactory ensheathing cells and olfactory nerve fibroblasts maintain continuous open channels for regrowth of olfactory nerve fibres. *Glia* 52: 245–251.
- Parrinello S, Napoli I, Ribeiro S, Digby PW, Fedorova M, et al. (2010) EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell sorting. *Cell* 143: 145–155.
- Forni PE, Taylor-Burds C, Melvin VS, Williams T, Wray S (2011) Neural crest and ectodermal cells intermix in the nasal placode to give rise to GnRH-1 neurons, sensory neurons, and olfactory ensheathing cells. *J Neurosci* 31: 6915–6927.
- Li BC, Xu C, Zhang JY, Li Y, Duan ZX (2012) Differing Schwann Cells and Olfactory Ensheathing Cells Behaviors, from Interacting with Astrocyte,

- Produce Similar Improvements in Contused Rat Spinal Cord's Motor Function. *J Mol Neurosci*.
49. Kueh JL, Raisman G, Li Y, Stevens R, Li D (2011) Comparison of bulbar and mucosal olfactory ensheathing cells using FACS and simultaneous antigenic bivariate cell cycle analysis. *Glia* 59: 1658–1671.
  50. Windus LC, Lineburg KE, Scott SE, Claxton C, Mackay-Sim A, et al. (2010) Lamellipodia mediate the heterogeneity of central olfactory ensheathing cell interactions. *Cell Mol Life Sci* 67: 1735–1750.
  51. Guerout N, Paviot A, Bon-Mardion N, Duclos C, Genty D, et al. (2011) Co-transplantation of olfactory ensheathing cells from mucosa and bulb origin enhances functional recovery after peripheral nerve lesion. *PLoS One* 6: e22816.
  52. Au E, Richter MW, Vincent AJ, Tetzlaff W, Aebbersold R, et al. (2007) SPARC from olfactory ensheathing cells stimulates Schwann cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair. *J Neurosci* 27: 7208–7221.

## RESUME

Les lésions médullaires traumatiques (LMT) conduisent à une atteinte des voies nerveuses sensibles et motrices. Leur taux de mortalité reste très élevé d'où la nécessité de trouver de nouveaux traitements. Les Cellules Gliales Olfactives (CGOs) représentent un candidat intéressant de part leur fonction au sein du système olfactif primaire. La découverte d'une population de cellule souche neurale bordant le canal central de la moelle spinale (MS) adulte, appelées cellules épendymaires, suscite un nouvel espoir dans le domaine des biothérapies. Ce travail de thèse a permis d'étudier l'effet d'une transplantation de CGOs, sur le comportement des cellules résidentes de la moelle spinale et notamment les cellules souches épendymaires qui, en association avec les astrocytes et les péricytes, participent aux mécanismes de guérison des LMT. L'utilisation du modèle murin hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP (permettant le suivi spécifique des cellules épendymaires et de leur progénie), a montré que les CGOs augmentaient *in vitro* le potentiel d'auto-renouveau des cellules souches de la MS et modifiaient leur voie de différenciation vers un type neural. *In vivo*, la transplantation de CGOs augmente la prolifération des cellules épendymaires ainsi que leur différenciation en astrocytes hypo-réactifs conduisant à la formation d'un environnement post-lésionnel bénéfique à la survie neuronale et l'établissement d'une neurogenèse. Nos travaux ont montré pour la première fois que la transplantation de CGOs après LMT permettait la génération de nouveaux neurones. Ceci constitue un nouvel espoir dans l'établissement de stratégies thérapeutiques pour le traitement des LMT chez l'Homme.

**Mots clés :** Cellule épendymaire, Cellule souche, Cellule gliale olfactive, Lésion médullaire traumatique, neurogenèse.

## ABSTRACT

The spinal cord injuries (SCI) lead to the damages of the spinal cord or nerves and often cause permanent changes in body functions leading to the death. Cell therapies have raised great hope for regenerative medicine. Clinical data showed that the olfactory ensheathing cells (OECs) enhanced functional recovery after SCI and could be a very attractive therapeutic approach. Moreover, the discovery of a new endogenous resident stem cell population, lining the central canal of the spinal cord, named ependymal stem cells, represents a new hope for the therapy. This thesis analyzed the role of OECs transplantation, on the behaviour of ependymal stem cells since these cells, together with astrocytes and pericytes significantly contribute to the recovery of SCI. The use of the mouse model hFoxJ1-CreER<sup>T2</sup>::YFP (allowing to specifically follow the ependymal stem cells and their progeny) showed that OECs increased *in vitro* the self-renewal potential of spinal cord stem cells and modified their differentiation pathway towards a neural type. *In vivo*, OECs transplantation significantly increases the proliferation of ependymal cells and their differentiation into hypo-reactive astrocytes leading to the formation of a beneficial environment to neuronal survival and the neurogenesis establishment. Our results also showed for the first time that OECs transplantation after SCI allows the generation of new neurons by non-ependymal cell-derived progenitors. These results represent a new hope in the establishment of therapeutic strategies for the treatment of SCI in humans.

**Keyword:** Ependymal cell, Stem cell, Olfactory Ensheathing Cells, Spinal Cord Injury, neurogenesis.