



HAL
open science

Implication des connexines gliales dans les atteintes de la Neuromyélie Optique : un rôle dans la démyélinisation et les altérations neuronales

Chloé Richard

► **To cite this version:**

Chloé Richard. Implication des connexines gliales dans les atteintes de la Neuromyélie Optique : un rôle dans la démyélinisation et les altérations neuronales. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1075 . tel-02276888

HAL Id: tel-02276888

<https://theses.hal.science/tel-02276888>

Submitted on 3 Sep 2019

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.

N° Ordre NNT : 2019LYSE1075



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale 476
Neurosciences et Cognition

Spécialité de doctorat : Neurosciences
Discipline : Neuroimmunologie

Soutenue publiquement le 12/06/2019, par :

Chloé Richard

Implication des connexines gliales dans les atteintes de la Neuromyéélite Optique : un rôle dans la démyélinisation et les altérations neuronales

Devant le jury composé de :

Vukusic, Sandra, Professeure des Universités – Praticien Hospitalier, Université Claude Bernard Lyon 1 : Présidente

Pot-Kreis, Caroline, Professeure associée, Université de Lausanne : Rapporteur

Tourdias, Thomas, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Bordeaux : Rapporteur

Cohen-Salmon, Martine, Directrice de Recherche, Université Pierre et Marie Curie : Examinatrice

Pascual, Olivier, Chargé de Recherche, Université Claude Bernard Lyon 1 : Examineur

Marignier, Romain, Maître de Conférence des Universités – Praticien Hospitalier, Université Claude Bernard Lyon 1 : Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tenais tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à vous **Thomas Tourdias** et **Caroline Pot-Kreis** d'avoir accepté d'être rapporteur(e) de mon manuscrit et d'y avoir apporté toute votre attention. Merci également aux examinateurs **Olivier Pascual**, **Martine Cohen-Salmon** et **Sandra Vukusic** d'avoir accepté notre invitation pour évaluer mon travail.

Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans l'encadrement de **Romain Marignier** et **Pascale Giraudon**. J'aimerais grandement les remercier pour leur bienveillance, leur soutien et pour m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet. Merci de m'avoir fait grandir et évoluer dans le monde de la recherche. Merci pour vos précieux conseils qui m'ont permis de toujours retrouver mon chemin. **Romain**, merci de m'avoir encouragée dans ma carrière, dans mes communications et de m'avoir toujours accordé ta confiance pour réaliser cette thèse. **Pascale**, merci pour ton enthousiasme, tes conseils avisés et ton humanité, tu as vraiment été un mentor et un exemple tout au long de cette thèse. Je vous présente à tous les deux toute ma gratitude.

Un grand merci à **Paul Salin**, pour m'avoir initiée à l'électrophysiologie et pour tous ses précieux conseils. Merci d'avoir participé à la relecture du manuscrit et de m'avoir encouragée tout au long de ma thèse. J'ai été très heureuse de participer à cette collaboration avec toi Paul.

Je tenais également à remercier mes collègues avec qui j'ai partagé le quotidien au laboratoire. Merci à ma douce collègue **Anne Ruiz**, pour sa gentillesse, son aide au quotidien dans tous les aspects de la vie au laboratoire, merci d'avoir été ma précieuse alliée dans cette thèse. Merci aussi à **Maxime Bigotte** pour son soutien et pour avoir été mon premier étudiant, je te souhaite de belles réussites et bonne chance dans ta thèse, que la force soit avec toi ! Merci à ma chère collègue maintenant retraitée, **Sylvie Cavagna**, pour tous ces moments passés à compter des gouttes ensemble, tous ces gels et ces grands moments de révélation en pièce noire. Merci d'avoir partagé ton savoir-faire avec moi. Je n'oublie pas non plus tous mes autres compagnons de Laennec que je remercie grandement pour leur joie de vivre et leur sens de l'humour, j'ai vraiment apprécié le quotidien au laboratoire avec vous.

Je vais à présent remercier ma famille et mes amis.

Merci à **Cédric**, l'homme qui partage ma vie, d'avoir aussi partagé cette thèse avec moi, les bons comme les moins bons aspects et moments de celle-ci. Oui merci de ne pas être parti en courant face à ma folie qui n'est, parfois, pas si passagère. Merci d'être drôle, passionné, enthousiaste et puis aussi un peu fou

comme moi. Personne d'autre n'aurait pu mieux comprendre ce que je traversais que toi. Merci d'avoir été ma petite oasis en plein milieu du désert, cet endroit où je peux me ressourcer, c'est avec toi. Et maintenant nous allons pouvoir commencer une nouvelle histoire, avec de nouvelles aventures, ensemble.

Je tiens aussi à remercier ma famille, merci à mes parents de m'avoir permis de faire des études et surtout de m'avoir donné le courage de me lancer dans une thèse. Je pense surtout à toi **maman**, tu es une source d'inspiration pour moi, depuis toujours. Je crois que cette ténacité je la tiens de toi, tu as toujours été si courageuse et si forte dans toutes les situations, je ne pouvais trouver meilleur exemple. Merci d'avoir continué de m'inspirer cette force, de croire en moi, de me coucouner quand j'en ai besoin, j'ai vraiment de la chance d'être ta fille. Merci à toi aussi **Patrice**, pour ton énergie positive et ton amour du métal. Ces hellfest avec toi ont été des moments privilégiés qui m'ont aidé à prendre du repos bien mérité quand j'en avais le plus besoin. Merci aussi à mon petit frère, **Nicolas**, pour nos discussions scientifiques passionnées, pour son soutien inébranlable dans tout ce que je fais. Merci d'être aussi têtu que moi et d'avoir cru en moi, j'ai énormément d'admiration pour toi, tu es vraiment une personne brillante et tu feras de très belles choses, et je serai là quand tu auras besoin de moi, futur thésard. Merci aussi à toi **papa**, le parcours académique n'était pas ton premier choix, mais je sais que tu as cru en moi, en ma capacité à persévérer et je suis ici aussi grâce à toi.

Merci aussi à mes amis thésards d'avoir partagé ces quatre années avec moi, car oui quatre ans c'est long. Merci à toi ma **Yago**, ou devrais-je dire, docteur Saint-Martin, d'avoir été là pour moi, et surtout merci pour ta bonne humeur au quotidien ! Merci à toi **Elodie**, et encore bravo pour ta thèse, tu as été un modèle pour moi : j'ai toujours admiré ta persévérance et ta rigueur, ton esprit plein de malice. Merci aussi à toi **Laurent**, d'être un si bon ami, toujours à l'écoute et toujours un mot gentil, une bonne intention tu es déjà aux Etats-Unis mais je ne t'oublie pas.

Enfin, qui serais-je si j'oubliais de remercier mon petit poney chéri, merci à toi **Quidam**, d'avoir partagé des moments de détente et de me faire progresser pour devenir une meilleure personne plus patiente, plus persévérante, plus exigeante et plus rigoureuse tout en respectant ma sensibilité.

Table des matières

Remerciements	
Table des matières	
Liste des abbréviations	
Préambule	1
Introduction et rappels bibliographiques.....	2
I. Les astrocytes et les oligodendrocytes.....	3
A. L'astrocyte : une cellule au centre des fonctions du système nerveux central	3
i) Son origine et ses caractéristiques	3
ii) Ses fonctions physiologiques.....	7
B. L'oligodendrocyte : cellule myélinisante du SNC	15
i) Description, origine et différenciation	15
ii) Signaux régulant la myélinisation.....	18
iii) L'oligodendrocyte : un support trophique de l'axone.....	20
C. Les relations neurone-glie et glio-gliales.....	21
i) Le neurone : unité fonctionnelle du SNC	21
ii) L'astrocyte une source de métabolites énergétiques pour le neurone	22
iii) L'astrocyte : un membre de la synapse tripartite.	23
iv) L'astrocyte : un partenaire de la myélinisation	25
v) L'astrocyte au nœud de Ranvier.....	26
D. La dysfonction astrocytaire et son implication en pathologie	29
i) L'astrogliose réactive.....	29
ii) La dysfonction astrocytaire comme mécanisme de physiopathogenèse	30
II. Les connexines, support du réseau neuroglial	34
A. Définition des connexines	34

i)	Fonctions hémicanal et jonction communicante	34
ii)	Fonctions indépendantes du canal.....	39
B.	Perméabilité et ouverture des connexines	40
i)	Perméabilité et sélectivité des connexines	40
ii)	Contrôle de l'ouverture	41
C.	Synthèse et trafic intracellulaire des connexines.....	41
D.	L'expression tissulaire des connexines.....	42
i)	Les connexines en périphérie	42
ii)	Les connexines du système nerveux central	43
E.	Mécanismes de régulation	48
i)	Les modifications post-traductionnelles	48
ii)	Facteurs extrinsèques régulant les fonctions des connexines dans le SNC	53
F.	Rôles des connexines dans le fonctionnement du SNC.....	55
i)	Expression et rôle des connexines durant le développement du SNC.....	55
ii)	Réseau astrocytaire et réseau neuroglial	58
iii)	Les connexines au sein de l'unité neuro-glio-vasculaire	61
iv)	Connexines, activité synaptique et cognition	62
v)	Les connexines et la myélinisation	65
G.	Connexines, inflammation et pathologies.....	71
III.	Neuroinflammation et autoimmunité.....	72
A.	Définition de l'immunité et ses composantes.....	72
B.	La neuroinflammation et son implication en contexte pathologique.....	73
i)	Neuroinflammation : définition	74
ii)	Cellules gliales et neuroinflammation.....	74
iii)	Neuroinflammation et pathologie.....	78
C.	Autoimmunité et pathologies auto-immunes du SNC	79

i) Autoimmunité	79
ii) La sclérose en plaques : le prototype des pathologies auto-immunes du SNC	79
iii) Pathologies à auto-anticorps du SNC	80
D. Mécanismes d'action des auto-anticorps	81
E. La Neuromyéélite Optique	84
i) Description, clinique et traitements.....	84
ii) Spectre de la NMO (NMOSD) :	84
iii) Anatomopathologie et mécanismes	86
iv) Auto-anticorps et NMO	89
v) Dysfonction astrocytaire	90
vi) Déficit cognitif dans la Neuromyéélite Optique.....	91
vii) L'implication des connexines dans la Neuromyéélite Optique	93
Questions clés, Hypothèse de travail et objectifs	94
Quelles sont les caractéristiques de l'astrocytopathie auto-immune dans la NMO ?.....	95
Quels sont les mécanismes associant dysfonction astrocytaire et démyélinisation ?.....	97
Quels sont les mécanismes à l'origine des troubles cognitifs chez les patients ?	99
Résultats	101
I. Caractérisation d'un phénotype astrocytaire spécifique de la Neuromyéélite optique, induit par les autoanticorps de patients (<i>Ruiz et al., en préparation</i>)	102
Contexte de l'étude	102
Principaux résultats	102
i) Les IgG-NMO induisent un phénotype astrocytaire réactif et dysfonctionnel spécifique	103
ii) Ce phénotype est cependant réversible et peut être modulé par une cytokine proinflammatoire le TGF- β 1	104
Conclusion	104
ARTICLE.....	105

Disease-specific reactive astrocytes revealed by Neuromyelitis Optica Immunoglobulin	106
ABSTRACT:	106
1 INTRODUCTION	107
2 MATERIAL AND METHODS	108
3 RESULTS	111
4 DISCUSSION	118
REFERENCES	120
SUPPLEMENTARY MATERIAL :	123
II. Les connexines dans la neuromyérite optique : un lien entre démyélinisation et astrocytopathie (Richard et al., soumis en 2019)	124
Contexte de l'étude	124
Principaux résultats	124
i) Les IgG-NMO sont capables d'induire une démyélinisation sans addition de complément	124
ii) Les IgG-NMO altèrent l'expression et la fonction des connexines gliales	124
iii) Les connexines gliales sont impliquées dans la démyélinisation induite par les IgG-NMO..	125
Conclusion	125
ARTICLE	127
Connexins in Neuromyelitis Optica: a link between astrocytopathy and demyelination	128
Abstract :	128
INTRODUCTION	129
MATERIAL AND METHODS	130
RESULTS	134
DISCUSSION	142
Acknowledgements	144
REFERENCES	145
SUPPLEMENTARY MATERIAL	147

III. Altération de la transmission synaptique glutamatergique induite par les autoanticorps de patients NMO : un rôle pour les connexines ?	151
Contexte de l'étude	151
Matériel et méthodes.....	152
Echantillons de patients et purification d'IgG	152
Protocole d'électrophysiologie	153
Analyses de signaux et statistiques	154
Résultats préliminaires.....	155
i) Les IgG-NMO induisent une forte diminution de la transmission glutamatergique basale dans l'hippocampe.....	155
ii) L'effet des IgG-NMO est bloqué en présence de bloqueurs de connexines.....	157
Discussion	159
Discussion et perspectives	162
Quels sont les mécanismes d'induction de l'« astrocyte NMO » par les autoanticorps de patients ? .	163
Quels sont les mécanismes d'induction du phénotype astrocytaire spécifique induit par IgG-NMO ?	163
Comment l'IgG-NMO pénètre-t-il dans le SNC et atteint-il sa cible ?.....	166
Qu'est ce qui caractérise la dysfonction astrocytaire induite par IgG-NMO ?.....	167
Production de cytokines proinflammatoires.....	167
L'altération de l'homéostasie hydrique et ionique	168
L'altération de la recapture du glutamate	169
La NMO est-elle une « connexinopathie » ?	170
L'altération des connexines : une nouvelle caractéristique de l'« astrocyte NMO »	170
Dysfonction astrocytaire, connexinopathie et démyélinisation	171
Dysfonction astrocytaire et transmission synaptique : un rôle pour les connexines ?.....	173
Vers de nouvelles voies thérapeutiques de protection de la myéline et des neurones dans la NMO ?	177

Réversion du phénotype astrocytaire	177
Modulation des fonctions des connexines.....	178
REFERENCES	180

LISTE DES ABBREVIATIONS

- Ac : anticorps
- ADCC : cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
- ADEM : *acute disseminated encephalomyelitis*
- Ag : antigène
- Aldh1l1: *aldehyde dehydrogenase 1 family member L1*
- AMPA: *alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*
- AQP4 : aquaporine-4
- AMPc : adénosine monophosphate cyclique
- ATP : adénosine triphosphate
- BDNF: *brain derived neurotrophic factor*
- BET: bromure d'éthidium
- BHE : barrière hémato-encéphalique
- CAMKII : protéine kinase Ca²⁺/calmoduline dépendante
- Caspr2: *contactin-associated protein-like 2*
- CBX: Carbenoxolone
- CK1: caséine kinase 1
- CN: caclineurine
- CNTF: *ciliary neurotrophic factor*
- CPA: cellule présentatrice de l'antigène
- CSN : cellule souche neurale
- Cx : connexine
- EAAT : *excitatory amino-acid transporter*
- EAE : encéphalite autoimmune expérimentale
- EGF: *epidermal growth factor*
- ESCRT: *endosomal sorting complex required for transport*
- EtBr: *ethidium bromide*
- Fab: *Fragment antigen-binding*
- Fc: Fragment cristallisable
- FGF: *fibroblast growth factor*
- GFAP: *glial fibrillary acidic protein*
- GLAST: *glutamate aspartate transporter (=EAAT1)*
- GLT-1 : *glutamate transporter type 1 (=EAAT2)*
- GLUT-1 : transporteur au glucose de type 1
- GDNF: *glial cell line derived neurotrophic factor*
- GS: Glutamine synthétase
- HC : hémicanal
- IFN : interféron
- IGF : *insulin growth factor*
- IgG : immunoglobuline de type G
- IL : interleukine
- IP3 : inositol triphosphate
- IRM : imagerie par résonance magnétique
- JC : jonction communicante

- K2P : *two-pore domain potassium channel*
- Kir : *inward rectifier potassium channel*
- KO : *knock out*
- LB : lymphocyte B
- LCN2 : lipocaline 2
- LCR : liquide céphalo rachidien
- LGI-1: *leucine-rich glioma inactivated 1*
- LIF: *leukemia inhibitory factor*
- LPS: lipopolysaccharide
- LT : lymphocyte T
- LTD : dépression à long terme
- LTP : potentialisation à long terme
- LY : lucifer yellow
- MAPK: *mitogen-activated protein kinase*
- MBP: *myelin basic protein*
- MCT: transporteur aux monocarboxylates
- mGluR: récepteur métabotrope au glutamate
- MIP : *macrophage activated protein*
- MOG: *myelin oligodendrocyte glycoprotein*
- MAG: *myelin-associated glycoprotein*
- 2-NDBG: 2-N-7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-Amino-2-Deoxyglucose
- Nfasc: Neurofascine
- NFκB: *nuclear factor kappa B*
- NGV : neuro-glio-vasculaire
- NG2 : *neural/glial antigen 2*
- NK : *natural killer*
- NKCC: Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporteur
- NMDA: N-méthyl-D-aspartate
- NMO : Neuromyélie Optique
- NO : oxyde nitrique
- NR : nœud de Ranvier
- NT3 : neurotrophine 3
- OAP: *orthogonal array of particles*
- OPC : cellule précurseur d'oligodendrocytes
- PAMP : *pathogen associated molecular pattern*
- PDGF: *platelet derived growth factor*
- PKA/PKC: protéine kinase A/C
- PLP : *proteolipid protein*
- pNF : neurofilament phosphorylé
- PRR : *pathogen recognition receptor*
- RANTES : *regulated upon activation and normal T-cell expressed and secreted*
- RE : réticulum endoplasmique
- ROS : espèces réactives de l'oxygène
- SEP : sclérose en plaques
- SI : système immunitaire
- SNC : système nerveux central

- SOX: *sry-related high mobility group box*
- SNP : système nerveux périphérique
- SVZ: zone sous-ventriculaire
- TCR: récepteur de lymphocyte T
- TGF: *transforming growth factor*
- TβR: *transforming growth factor beta receptor*
- TNF: *tumor necrosis factor*
- Wnt : *wingless integrated*
- ZO : *Zona occludin-protein*

PREAMBULE

Le contexte local est très favorable à l'étude des pathologies du système nerveux central (SNC), grâce à l'interaction étroite entre les Hospices Civils de Lyon et les laboratoires de recherche en neurosciences, en particulier le Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CRNL).

Depuis de nombreuses années, notre équipe de recherche s'intéresse aux pathologies auto-immunes démyélinisantes du SNC, qui touchent des jeunes adultes et sont à l'origine de graves handicaps physiques associés à un impact très négatif sur la qualité de vie des patients. Parmi ce spectre de maladies, nous avons développé une expertise sur la Neuromyéélite Optique (NMO) de Devic, une pathologie associée à la présence d'auto-anticorps pathogènes dirigés contre le canal hydrique astrocytaire aquaporine 4 (AQP4), aujourd'hui définie comme une astrocytopathie auto-immune.

La mise en place d'une cohorte de patients NMO avec le projet NOMADMUS, coordonné au sein des Hospices Civils de Lyon par le Dr Romain Marignier, nous a permis de développer une approche de recherche translationnelle par l'accès à des prélèvements de patients (plasmaphérèses, liquide céphalo rachidien, sérum) parfaitement caractérisés. Cela a facilité le développement de modèle d'études *in vivo* et *in vitro* originaux, basés sur des prélèvements de patients, permettant l'étude des mécanismes physiopathologiques de la NMO.

Mes travaux de thèse ont permis de développer un nouvel axe de recherche au sein de l'équipe par l'étude des connexines gliales, les interactions intercellulaires et leur implication dans la physiopathogenèse de la NMO. J'ai aussi développé de nouvelles méthodologies (culture myélinisante, techniques d'analyse fonctionnelle des connexines) pour l'étude du rôle des connexines dans la démyélinisation et la transmission synaptique.

Après un rappel bibliographique sur l'astrocyte et l'oligodendrocyte, les relations neurone-glie, la présentation des connexines et de leurs fonctions dans le SNC, ainsi que la définition de la neuroinflammation et l'auto-immunité caractérisant la NMO, nous présenterons les questions clés qui nous ont conduit à réaliser ce travail, portant sur le rôle des connexines gliales dans les mécanismes physiopathologiques de la NMO.

INTRODUCTION ET RAPPELS

BIBLIOGRAPHIQUES

I. Les astrocytes et les oligodendrocytes

Les cellules gliales ont pour objectif de contrôler l'homéostasie du système nerveux central (SNC) et de fournir aux neurones les conditions optimales pour fonctionner. Ces cellules, dont le nombre dépasse largement celui des neurones au sein du SNC, ont longtemps été considérées comme une simple « glue » pour maintenir l'intégrité physique du tissu nerveux. De nombreuses études ont permis de montrer leur diversité, leur hétérogénéité et de révéler leurs nombreuses fonctions en contexte physiologique et les placent comme cibles thérapeutiques privilégiées en contexte pathologique (**Figure 1**).

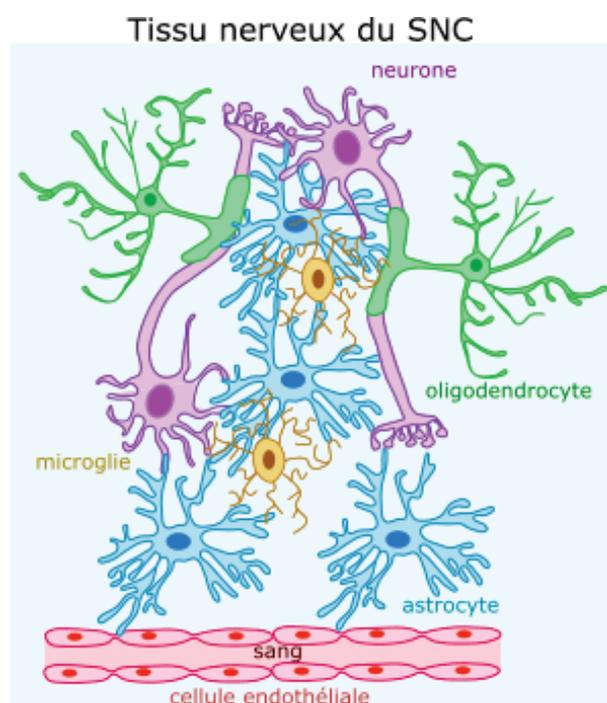


Figure 1 : Les cellules gliales au sein du tissu nerveux du SNC. Le parenchyme cérébral est composé d'un réseau de neurones formant des synapses et de cellules gliales. Les astrocytes (en bleu) contactent à la fois les cellules endothéliales (en rouge) des micro-vaisseaux et les neurones (en violet) ainsi que les oligodendrocytes (en vert) qui forment la gaine de myéline autour des axones des neurones. Les cellules microgliales (en jaune), sont également en contact avec les neurones et les astrocytes. Toutes ces cellules participent au maintien de l'intégrité et au fonctionnement du SNC. Schéma adapté de Kiray *et al.* 2016.

A. L'astrocyte : une cellule au centre des fonctions du système nerveux central

i) Son origine et ses caractéristiques

Astrocyte : L'astrocyte est une cellule gliale très abondante et présente dans tout le système nerveux central. La découverte des astrocytes a commencé par la définition des cellules gliales regroupées sous le terme neuroglie, inventé par Virchow (1826, 1827). Les premières cellules gliales, décrites en 1851, sont les cellules de Müller présentes dans la rétine. Puis les cellules astrogliales du parenchyme cérébral ont

été décrites mais ont porté des noms différents avant que le nom d'astrocyte ne soit proposé par Michael von Lenhossék en 1895. Ce terme a été popularisé par Santiago Ramon y Cajal qui a développé une technique de marquage spécifique de la protéine du cytosquelette « *glial fibrillary acidic protein* » (GFAP) au sein des astrocytes. Au fur et à mesure des années, les divers rôles des astrocytes ont été identifiés, grâce à des études physiologiques développées à partir des années 1950, puis avec la mise en place de cultures gliales dans les années 1980 par Jean de Villis (Verkhatsky and Nedergaard, 2018).

Gliogenèse : Durant le développement, la neurogénèse a lieu avant la gliogénèse, et dans ces processus, les cellules souches neurales (CSN) donnent naissance aux cellules de la glie radiale qui non seulement permettent la migration des cellules mais peuvent se différencier et générer des neurones et des cellules gliales, à l'exception des cellules microgliales dont l'origine est mésenchymateuse. Si les mécanismes permettant le développement des neurones et des oligodendrocytes ont été largement étudiés, ceux des astrocytes ne sont pas encore complètement élucidés, du fait de difficultés technologiques pour étudier l'astrocytogenèse sans affecter la neurogénèse (Chaboub and Deneen, 2013).

Deux grands mécanismes permettant la différenciation des CSN en astrocyte ont été identifiés pendant le développement et correspondent à : i) des modifications épigénétique permettant l'expression et de gènes astrocytaires ii) l'activation de voies de signalisation de cytokines par le biais de l'activation du système JAK-STAT3 (pour gp130-Janus kinase – signal transducteur et activateur de la transcription 3) (Namihira and Nakashima, 2013; Yang et al., 2013) (**Figure 2**). Cela aboutit à la différenciation en astrocyte avec l'expression de gènes spécifiques de l'astrocytes comme celui de la GFAP. Fait intéressant, seule la moitié des astrocytes proviennent de cette phase embryonnaire de gliogénèse. L'autre moitié des astrocytes provient d'une vague postnatale de transformation cellules de la glie radiale et de la division symétrique d'astrocytes différenciés qui conservent des capacités prolifératives. Une autre source d'astrocyte, plus locale au sein du cerveau antérieur ventral, proviendrait de la différenciation de cellules NG2 pour « *neuro/glial antigen 2* » (Verkhatsky and Nedergaard, 2018).

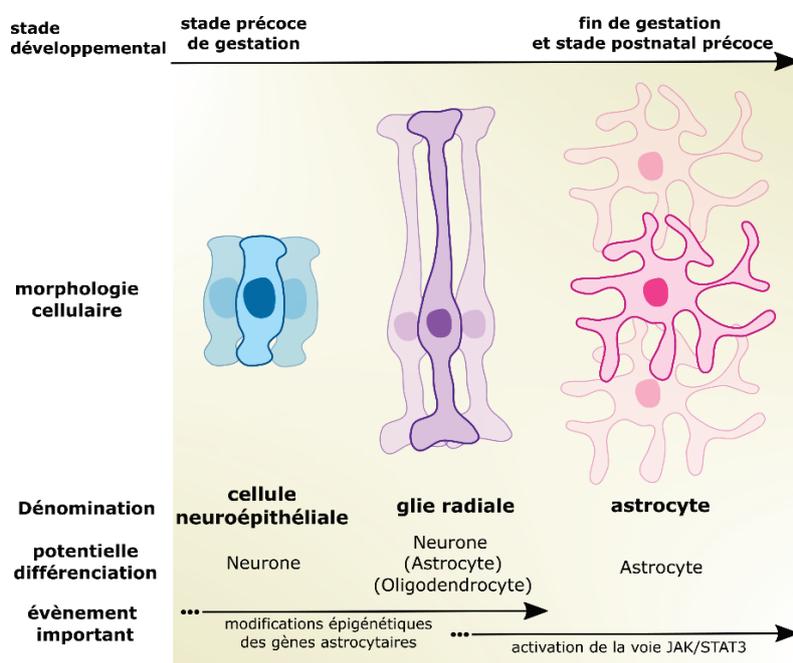


Figure 2 : Etapes de gliogénèse astrocytaire. Les neurones et cellules gliales dérivent des cellules neuroépithéliales de la zone sous ventriculaire qui donnent naissance aux cellules de la glie radiale. La différenciation astrocytaire se traduit par deux événements majeurs : i) l'activation de gènes astrocytaires par des modifications épigénétiques puis ii) l'activation, par des cytokines, de la voie JAK/STAT3 qui permet la différenciation en astrocyte. Figure adaptée de Namihira and Nakashima, 2013.

Marqueurs astrocytaires : Les astrocytes sont identifiés par de nombreux marqueurs, l'un des premiers identifiés étant la GFAP, un filament intermédiaire du cytosquelette de l'astrocyte, exprimé durant différents stades de maturation de l'astrocyte (Raponi et al., 2007; Sofroniew and Vinters, 2010). L'augmentation de son expression est généralement associée à une forme réactive des astrocytes (Wilhelmsson, 2004; Sofroniew, 2009; Pekny and Pekna, 2014). De plus, il existe différentes formes de GFAP (isoformes et épissages alternatifs : α , β , γ , δ , κ) qui peuvent être exprimées dans différents astrocytes. L'expression de la GFAP n'est donc ni requise ni suffisante pour identifier les astrocytes différenciés et matures (Khakh and Sofroniew, 2015). C'est également le cas de la vimentine, un autre filament intermédiaire exprimé chez les astrocytes réactifs (Wilhelmsson, 2004; Pekny and Pekna, 2014). La protéine S100 β (Raponi et al., 2007, p 100) est un autre marqueur astrocytaire mais son expression n'est pas limitée à l'astrocyte dans le SNC.

Les transporteur au glutamate (EAAT : transporteur aux acides aminés excitateurs) de type 1 et 2, aussi connus sous les noms de GLT1 (pour « *glutamate transporter type 1* ») et GLAST (pour « *glutamate aspartate transporter* ») respectivement chez les rongeurs (Williams et al., 2005; Verkhratsky and Nedergaard, 2018), ainsi que la glutamine synthétase (Norenberg and Martinez-Hernandez, 1979; Rose et al., 2013) sont fortement exprimés par les astrocytes et sont impliqués dans la régulation du glutamate. L'aquaporine-4 (AQP4) est sûrement le marqueur astrocytaire le plus connu : ce canal hydrique est exprimé par un grand nombre d'astrocyte et son expression est enrichie au niveau des pieds astrocytaires (Nicchia et al., 2005; Nagelhus and Ottersen, 2013a). Enfin les connexines (Cx) 43 et 30 sont également fortement exprimées par l'astrocyte (Dermietzel et al., 1991; Abrams and Rash, 2009; Vicario et al., 2017). Plus récemment, un autre marqueur astrocytaire a été identifié, il s'agit de l'aldehyde dehydrogenase (Aldh1l1) qui est largement exprimée dans le SNC adulte (John Lin et al., 2017).

Hétérogénéité astrocytaire : Chez les mammifères, il existe une grande hétérogénéité de phénotype astrocytaire et leur classification fait encore l'objet de débats (Kimelberg, 2004). Cependant deux types principaux d'astrocyte ont tout d'abord été distingués grâce à leurs caractéristiques morphologiques et à leur localisation. Le premier grand type est l'astrocyte **protoplasmique**, présent dans la substance grise du SNC, et caractérisé par un corps cellulaire de petite taille et une morphologie très complexe avec de nombreux branchements et prolongements dont les plus périphériques contactent les synapses (Bushong et al., 2002; Halassa et al., 2007b), les vaisseaux et participent à la glie *limitans* au niveau de la surface de la pie mère. Les astrocytes protoplasmiques ne contactent pas uniquement les neurones mais se contactent les uns les autres et occupent des territoires qui ne se recouvrent pas (Bushong et al., 2002; Nedergaard et al., 2003).

Le second grand type est l'astrocyte **fibreux**, qui est lui présent dans la substance blanche et caractérisé par des prolongements de très grande taille (jusque 100µm) orientés dans le même sens que les axones (Lundgaard et al., 2014). Les prolongements des astrocytes fibreux sont moins nombreux mais participent aussi à la glie *limitans* et contactent les vaisseaux. D'autres prolongements dit péri-nodaux contactent les axones des neurones myélinisés au niveau des nœuds de Ranvier.

Nous savons maintenant qu'il existe une très grande hétérogénéité de phénotype astrocytaires ayant des spécificités différentes selon les régions du SNC, ce qui en fait une cellule extrêmement plastique et adaptative (Bachoo et al., 2004; Hewett, 2009). La complexité de morphologie est également variable selon les espèces, en effet, les astrocytes humains sont plus larges et plus complexes que ceux des rongeurs (Oberheim et al., 2009, 2012).

ii) Ses fonctions physiologiques

Cette hétérogénéité de phénotypes astrocytaires est à associer aux multiples fonctions de l'astrocyte en condition physiologique, qui peuvent être modifiées en condition pathologique. Ces grandes fonctions physiologiques ont été largement étudiées et sont résumées dans les prochains paragraphes.

Maintien de l'homéostasie du SNC

Un rôle majeur de l'astrocyte est de maintenir l'homéostasie du SNC. La régulation homéostatique exercée par les astrocytes est à la fois moléculaire, cellulaire, métabolique, spécifique d'un organe ou systémique (Verkhratsky and Nedergaard, 2018). Elle dépend de la localisation tissulaire de l'astrocyte et de ses interactions avec les autres astrocytes ainsi qu'avec les neurones, les oligodendrocytes ou les cellules de barrière.

Homéostasie hydrique: Un des principaux marqueurs de l'astrocyte est l'aquaporine-4 (AQP4), un canal hydrique très fortement concentré au niveau des pieds astrocytaires au niveau de la glie *limitans* et proche des vaisseaux sanguins. L'AQP4 est également exprimé par l'épendymocyte bordant les ventricules cérébraux en contact avec le liquide céphalo-rachidien (**Figure 3A**). Il existe deux isoformes principales de l'AQP4, une longue et l'autre plus courte, appelées respectivement M1 et M23 du fait des méthionines présentes à l'extrémité N-terminale (**Figure 3B**). Un monomère d'AQP4 a un poids moléculaire d'environ 30 kilo dalton (kDa). Ces deux isoformes, M1 et M23, s'assemblent pour former des hétérotétramères. L'AQP4 est exprimée à la membrane dans des domaines appelés « *orthogonal array of particles* » (OAPs) (Verkman et al., 2011).

Certaines études par microscopie électronique sur cellules cryofracturées (technique connue sous le nom de « *freeze fracture electron microscopy* ») ont montré que la transfection de plasmides codant l'isoforme M1 conduit à une expression dispersée de l'AQP4 alors que l'isoforme M23 permet l'assemblage sous forme d'OAPs de grande taille (Crane et al., 2008; Verkman et al., 2011) (**Figure 3C**). Cela a été confirmé dans des cultures astrocytaires où la présence de l'isoforme M1 ne forme pas ou réduit la taille des OAPs (Furman et al., 2003) (**Figure 3D**). D'autres méthodologies telles que le « *single particle tracking* » ont permis de suivre la diffusion de l'AQP4 et de démontrer que les tétramères d'AQP4 sont relativement mobiles alors que l'AQP4 sous forme d'OAPs reste relativement immobiles. Comme supposé par les précédentes observations, l'isoforme M1 a une diffusion rapide alors que l'isoforme M23 reste immobile (Crane et al., 2008).

Rappels bibliographiques

Cependant la fonction de ces OAPs est encore discutée, les canaux d'AQP4 étant normalement constitutivement ouverts, la concentration d'un grand nombre de canaux ne semble pas nécessaire pour réaliser les fonctions de l'AQP4.

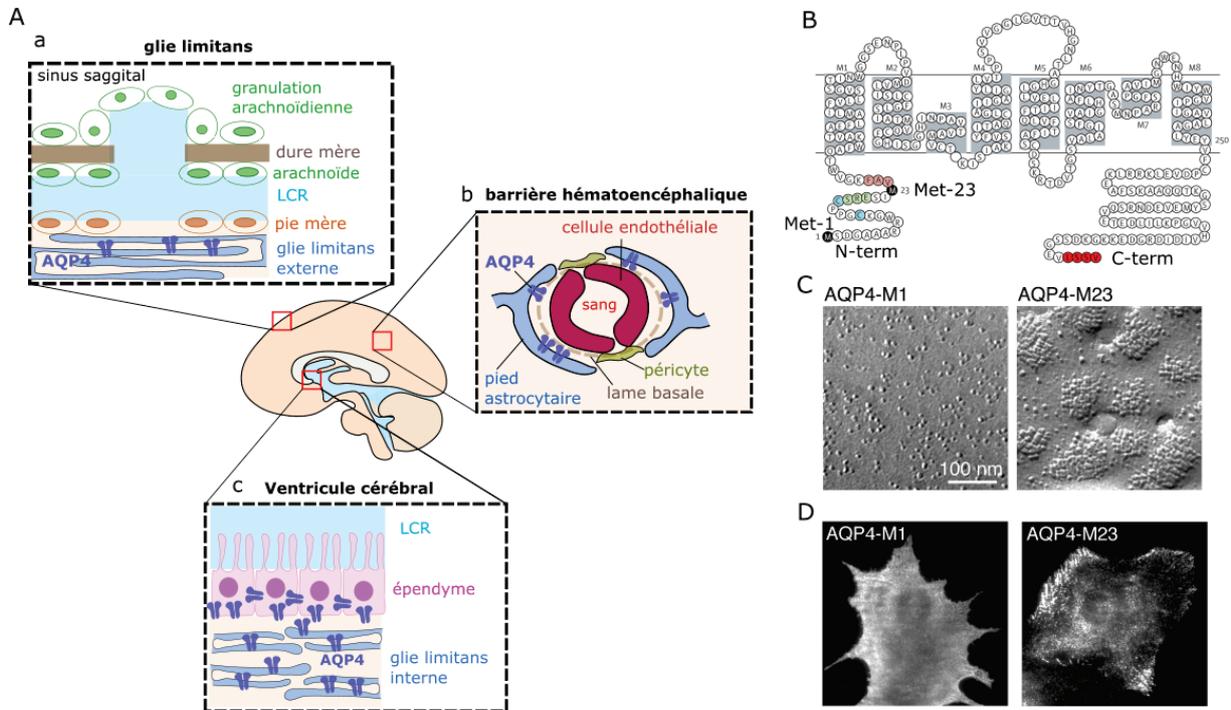


Figure 3 : Localisation de l'AQP4 dans le SNC et sa structure membranaire **A)** L'AQP4 est exprimée par les astrocytes et les épendymocytes préférentiellement au niveau des interfaces du SNC. Au niveau de la surface sous piaie, la glié *limitans*, formée de replis membranaire de l'astrocyte très denses, exprime fortement l'AQP4 (a). L'AQP4 est aussi exprimée par les astrocytes au niveau des pieds astrocytaires qui participent, avec les péricytes, à la formation de la barrière hématoencéphalique en entourant les cellules endothéliales (b). L'AQP4 est également exprimée au niveau des glié *limitans* interne, située juste en dessous de l'épendyme bordant les ventricules cérébraux, les épendymocytes exprimant aussi l'AQP4 à leur membrane basolatérale (c) (Figure adaptée de Verkmann *et al.* 2011) **B)** Séquence protéique de l'AQP4. Les deux sites d'inhibition de la traduction, les méthionines (Met) 1 et 23, sont situés à l'extrémité N-terminale. L'AQP4 possède huit domaines transmembranaires (M1-M8), trois boucles extracellulaires et un domaine PDZ à l'extrémité C-terminale (schéma issu de Papadopoulos and Verkmann, 2012). **C)** image de cellules par microscopie à cryofracture de la lignée COS-7 transfectées avec les isoformes M1 ou M23 et montrant la formation d'OAPs uniquement en présence de l'isoforme M23 **D)** Image de microscopie à fluorescence par réflexion totale interne de l'expression des isoformes M1 et M23 de l'AQP4 dans une culture primaire d'astrocytes. (C-D : issues de Crane *et al.*, 2008)

Rappels bibliographiques

L'AQP4 a deux principales fonctions : l'**élimination** des molécules présentes dans le **milieu interstitiel** cérébral ainsi que le **contrôle du volume extracellulaire** (Nagelhus and Ottersen, 2013b). En effet, pendant la formation d'œdèmes l'augmentation de l'expression d'AQP4 est corrélée avec l'augmentation du coefficient de diffusion apparent et le volume des ventricules cérébraux (Tourdias et al., 2009). Cette augmentation d'AQP4 perdure durant la résolution de l'œdème avec diminution du coefficient de diffusion apparent et formation d'une cicatrice gliale (Tourdias et al., 2011). De plus, chez des animaux n'exprimant pas l'AQP4 (AQP4^{-/-}), l'élimination de molécules et protéines solubles est diminuée : par exemple, la clairance du mannitol est fortement diminuée chez les animaux AQP4^{-/-} (Iloff et al., 2012). Par ailleurs, chez les souris AQP4^{-/-}, le volume extracellulaire est augmenté et le cerveau contient plus d'eau que chez les animaux exprimant l'AQP4. Les auteurs suggèrent que l'AQP4, en générant un flux hydrique permet le transport des molécules et protéines solubles (ou solutés) depuis l'espace interstitiel vers les espaces périvasculaires afin d'être éliminés (**Figure 4**). De nouvelles fonctions de l'AQP4 ont récemment été révélées et dépassent largement les fonctions de canal hydrique (**Boite 1**).

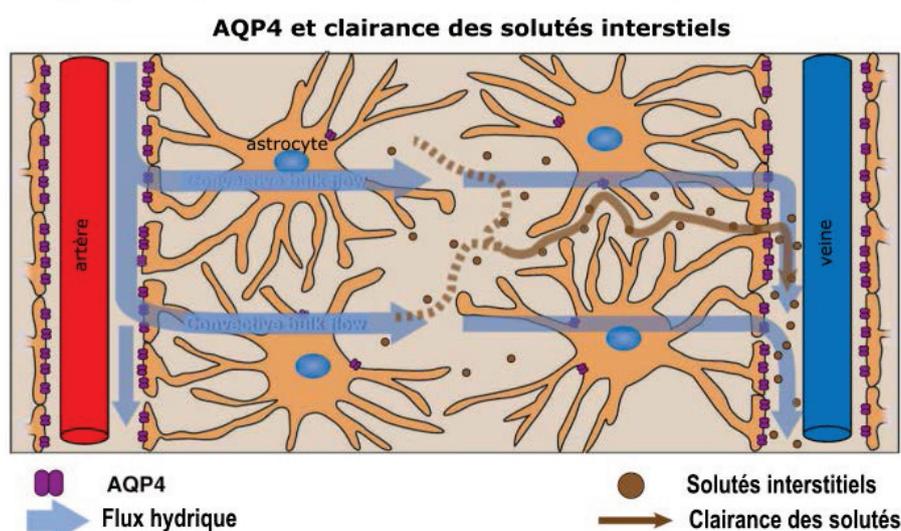


Figure 4 : Voie hypothétique de régulation du volume de liquide interstitiel et de la clairance des solutés par des flux hydriques sous-tendus par AQP4. Les auteurs ont proposé, avec une étude de la diffusion d'un traceur fluorescent, réalisée en microscopie à 2-photon, que l'AQP4 permet la mise en place d'un flux hydrique depuis l'espace périvasculaire artériel vers l'espace périvasculaire veineux. Cela permettrait d'éliminer les solutés interstitiels, transportés par le flux hydrique. En effet, les animaux AQP4^{-/-} présentent une accumulation du traceur au sein du parenchyme dans le milieu interstitiel. (Figure adaptée de Iliff et al., 2012)

Boite 1 : L'AQP4, de nouvelles fonctions au-delà de l'homéostasie hydrique

Un rôle inattendu de l'AQP4 a été suggéré dans la migration des astrocytes, avec l'expression polarisée de l'AQP4 à la membrane guidant la direction de migration et la délétion de l'AQP4 conduisant à une diminution de la migration des astrocytes (Saadoun, 2005). Par ailleurs, une autre étude a montré qu'en diminuant l'expression d'AQP4, avec des petits ARN interférant, les astrocytes ont une morphologie très différente, associée à une dépolymérisation des filaments d'actine, suggérant un rôle de l'AQP4 dans l'organisation du cytosquelette (Nicchia *et al.*, 2005). Récemment, un rôle de l'AQP4 dans l'excitabilité neuronale a été suggéré du fait de son rôle dans la régulation de l'homéostasie du potassium. L'analyse d'hippocampes de patients souffrant d'épilepsie du lobe temporal médian montrant une forte perte d'AQP4 associée à une perte de Kir4.1 (pour « *inward rectifier potassium channel* »), un canal potassique coexprimé avec l'AQP4 au pied astrocytaire (Eid *et al.*, 2005; Heuser *et al.*, 2012). Cette perte d'AQP4 et de Kir4.1 au niveau du pied astrocytaire pourrait être responsable d'une rupture de l'homéostasie potassique participant ainsi à une modification de l'excitabilité neuronale. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour savoir si cette observation chez le patient découle de sa pathologie ou si elle en est à l'origine. Enfin l'implication de l'AQP4 dans la plasticité synaptique a été démontrée. En effet l'expression d'AQP4 est très importante au niveau des prolongements astrocytaires à proximité des synapses. De plus, chez les animaux AQP4^{-/-} les mécanismes de potentialisation et de dépression à long terme sont impactés et sont associés à des troubles mnésiques (Skucas *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2013).

Homéostasie ionique et « potassium spatial buffering » : Les astrocytes expriment de nombreux canaux ioniques leur permettant de réguler les concentrations ioniques du tissu nerveux. Le contrôle des concentrations interstitielles de **potassium** est crucial pour maintenir l'excitabilité neuronale. Lors de l'activité neuronale, les concentrations extracellulaires de potassium $[K^+]_e$ augmentent localement au niveau des nœuds de Ranvier et des synapses actives. Cette augmentation $[K^+]_e$ peut être délétère pour le maintien de l'excitabilité neuronale et doit donc être régulée. La redistribution du potassium est effectuée par l'astrocyte par un mécanisme appelé « spatial buffering ». Dans un premier temps, les pompes $Na^+/K^+/ATPase$ sont activées par l'augmentation de $[K^+]_e$ et de sodium intracellulaire $[Na^+]_i$ et permettent de récupérer l'excès de K^+ extracellulaire (Hertz and Chen, 2016). Les canaux Kir (pour « *inward rectifier potassium channel* ») et les pompes NKCC (pour $Na^+-K^+-2Cl^-$ cotransporteur) sont également impliqués

Rappels bibliographiques

dans l'absorption du K^+ dans l'astrocyte (Bellot-Saez et al., 2017). Le K^+ est ensuite redistribué dans le réseau astrocytaire, couplé par des jonctions communicantes (décrites plus tard), et libéré dans le compartiment extracellulaire à proximité des vaisseaux sanguins (Seifert et al., 2018). Les canaux Kir4.1 sont par ailleurs responsables de la forte conductance au K^+ des astrocytes leur conférant leur très faible résistance membranaire ($<5M\Omega$). Ce mouvement d'ions est accompagné d'un mouvement d'eau via l'AQP4 fortement exprimée au niveau des pieds astrocytaires et permet de réguler les volumes extracellulaires. D'autres canaux potassiques sont également impliqués dans la conductance passive au K^+ et sont les canaux à deux domaines de pores (K2P) qui sont ouverts lorsque la membrane est à son potentiel de repos, tout comme les canaux Kir. Il existe également d'autres types de canaux sélectifs au K^+ exprimés par l'astrocyte, sensibles au calcium et voltage-dépendants, qui participent dans une moindre mesure à la conductance au K^+ des astrocytes.

Les astrocytes participent également à la régulation des concentrations d'autres ions. C'est le cas du **Chlore** qui est libéré par les astrocytes en cas de forte activité de neurones inhibiteurs, où la stimulation des récepteurs GABA provoque l'entrée d'ions Cl^- , pour maintenir une concentration extracellulaire physiologique de Cl^- . C'est également le cas du **calcium** dont la concentration extracellulaire $[Ca^{2+}]_e$ diminue au niveau de la synapse du fait de l'entrée de Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique. La détection d'une baisse de $[Ca^{2+}]_e$ peut provoquer une libération d'adénosine triphosphate (ATP) par l'astrocyte mais également la libération de Ca^{2+} depuis le réticulum endoplasmique qui pourra être libéré dans le milieu extracellulaire via des pompes au Ca^{2+} ou des échangeurs Na^+/Ca^{2+} (Verkhratsky and Nedergaard, 2018). Le Ca^{2+} est crucial dans les communications intercellulaires par le biais de la propagation de vagues calciques entre les astrocytes (**Boîte 2**).

Par ailleurs, les astrocytes peuvent réguler le **pH** du milieu interstitiel en faisant entrer ou sortir des protons par le biais d'échangeurs Na^+/H^+ , de transporteurs au bicarbonate, de transporteurs à l'acide monocarboxylique et d'ATPase proton de type vacuolaire (Obara et al., 2008).

Boite 2 : La communication astrocytaire via les vagues calciques.

Les canaux ioniques, exprimés par l'astrocyte, sont responsables de courants entrants évoqués, modifiant le potentiel de membrane mais qui, contrairement aux neurones, n'aboutissent pas à la formation de potentiels d'action. Cependant les astrocytes présentent une certaine forme d'excitabilité identifiée par la présence de d'une signalisation calcique entre astrocytes qui leur permet de communiquer entre eux et avec les neurones (Sofroniew and Vinters, 2010). Cette signalisation calcique correspond soit à une augmentation transitoire, soit à des oscillations, de concentration intracytoplasmique de calcium $[Ca^{2+}]_i$ qui peuvent être déclenchées par certains neurotransmetteurs comme le glutamate, ou par des purines comme l'ATP. Une vague calcique est une augmentation locale de la $[Ca^{2+}]_i$ suivie d'une succession d'évènements similaires se propageant comme une vague entre les cellules voisines. L'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ est initiée par une activation de récepteurs aux protéines G : ils activent la phospholipase C permettant ainsi la production d'inositol triphosphate (IP3) qui va permettre la libération de Ca^{2+} depuis le réticulum endoplasmique (Ben Achour and Pascual, 2012). Puis cette augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ est propagée par deux voies différentes : la première implique la communication via les jonctions communicantes (décrites ultérieurement) et le passage direct du Ca^{2+} et de l'IP3 d'un astrocyte à l'autre en mobilisant les messagers secondaires déjà présents ; la seconde implique la génération « de novo » de messagers secondaires entre les cellules voisines par activation de récepteurs membranaires via la diffusion d'agonistes dans le milieu extracellulaire. Ces deux voies coopèrent pour la propagation des vagues calciques d'un astrocyte à l'autre et permettent une communication à distance entre astrocytes et leur coordination (Scemes and Giaume, 2006) (**Figure 5**). Ce mécanisme est simplifié car la présence d'oscillations calciques peut aussi être observée à l'échelle subcellulaire, au sein des prolongements astrocytaires, et faire intervenir d'autres mécanismes ne dépendant pas de l'IP3 (Bazargani and Attwell, 2016). Ainsi la complexité des mécanismes à l'origine des vagues calciques n'est pas encore entièrement élucidée.

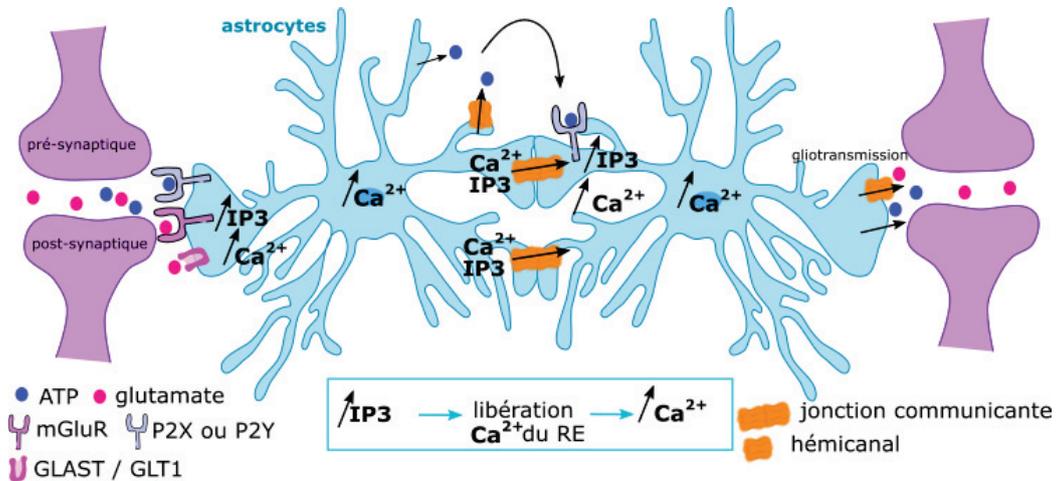


Figure 5 : Schéma simplifié de la communication astrocytaire via les vagues calciques. L'activité synaptique et la présence de neurotransmetteurs ou purines, comme le glutamate ou l'ATP, provoque une activation de récepteurs couplés aux protéines G activant la phospholipase C à l'origine de la production d'IP3 qui provoque une augmentation du Ca^{2+} libéré depuis le réticulum endoplasmique. Le Ca^{2+} peut également directement être augmenté par l'entrée de Ca^{2+} via des récepteurs ionotropiques ou des échangeurs. Cette augmentation de Ca^{2+} peut être directement propagée aux astrocytes voisins à travers les jonctions communicantes ou via libération de gliotransmetteurs comme l'ATP activant les récepteurs métabotropiques de la cellule voisine provoquant, par le même mécanisme dépendant de l'IP3, une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire. Cette augmentation de Ca^{2+} serait responsable de la libération de gliotransmetteurs via les hémicanaux ou par voie vésiculaire.

Homéostasie des espèces réactives de l'oxygène : Enfin les astrocytes sont responsables de l'homéostasie des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour « *reactive oxygen species* ») : produites par le métabolisme des neurones, elles peuvent générer des dommages aux cellules. Le système antioxydant du SNC repose principalement sur le glutathion et l'acide ascorbique. Les astrocytes contiennent plus de glutathion que les neurones (Dringen, 2000) et la synthèse du glutathion par les neurones dépend de l'astrocyte qui lui fournit la cystéine. Le glutathion intervient dans la détoxification et l'élimination des ROS et agit comme un donneur d'électron pour la peroxydase du glutathion qui réduit les ROS comme le peroxyde d'hydrogène donnant de l'eau. Un seul astrocyte est ainsi capable de protéger jusqu'à 20 neurones. L'astrocyte est aussi une source majeure d'acide ascorbique (Covarrubias-Pinto et al., 2015), forme réduite de la vitamine C, qui est le substrat de l'ascorbate peroxydase, lui permettant de neutraliser le peroxyde d'hydrogène.

Connexines et syncytium neuroglial : Les mouvements d'ions et de petites molécules entre les astrocytes et les autres cellules du SNC sont assurées par la présence de connexines. Elles permettent l'échange rapide de molécules et les communications intercellulaires : elles participent ainsi à toutes les régulations homéostatiques précédemment citées. Le rôle des connexines dans la régulation de l'homéostasie sera décrit en détail dans la section « connexines : support du réseau neuroglial ».

Maintien de l'intégrité des interfaces

L'astrocyte à l'interface sang-cerveau

La barrière hémato-encéphalique (BHE) permet la protection du parenchyme cérébral contre l'entrée de composants potentiellement toxiques ou dangereux (médicaments, pathogènes, cellules immunes...). Cette barrière est composée i) des cellules endothéliales du capillaire sanguin qui forment des jonctions serrées (Ballabh et al., 2004) et qui sont entourées par une lame basale, ii) de péricytes périvasculaires et iii) des pieds astrocytaires. Le rôle de l'astrocyte à la barrière hémato-encéphalique reste débattu mais de nombreuses études ont montré que l'astrocyte participe à l'établissement de cette barrière et à sa régulation (Abbott et al., 2006) (**Figure 6**). Il a notamment été montré que la libération de certains facteurs tels que le facteur de croissance transformant beta (TGF- β), le facteur de croissance fibroblastique (FGF-2), le facteur de croissance neurotrophique dérivant des cellules gliales (GDNF), peuvent induire des propriétés de barrière *in vitro* (Lee et al., 2003). A l'inverse d'autres agents pouvant être libérés par l'astrocyte sont susceptibles de modifier les propriétés de barrière, c'est notamment le cas des purines (comme l'ATP) (Braet et al., 2004; Simard and Nedergaard, 2004; Leybaert, 2005), des interleukines (IL) comme IL-1 α , IL-1 β , IL-6 (Gaillard et al., 2003; Didier et al., 2004) et de cytokines/chimiokines comme le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) (Deli et al., 1995).

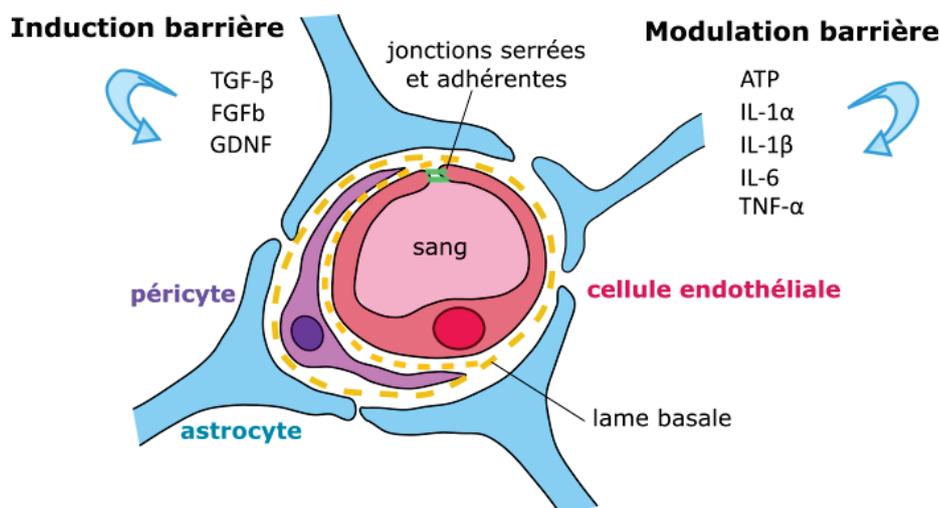


Figure 6 : Rôle de l'astrocyte à la barrière hématoencéphalique : Les pieds astrocytaires entourant les vaisseaux participent à la régulation des propriétés de barrière par la production de facteurs de croissances, de purines ou de cytokines participant soit à l'induction de la barrière soit à sa modulation en contexte physiologique ou pathologique (Schéma adapté de Abbott et al. 2006).

B. L'oligodendrocyte : cellule myélinisante du SNC

La myélinisation est un processus permettant de former une gaine de myéline autour des axones des neurones, interrompue au niveau des nœuds de Ranvier. Elle est réalisée par la cellule de Schwann dans le système nerveux périphérique (SNP) et par l'oligodendrocyte dans le SNC (Bercury and Macklin, 2015). La myéline permet d'isoler l'axone et ainsi d'augmenter la vitesse de propagation des signaux électriques (potentiels d'action) d'un neurone à l'autre, dans le SNC, ou d'une cellule nerveuse à un organe effecteur comme un muscle, dans le SNP. Une cellule de Schwann ne myélinise qu'un seul axone alors qu'un oligodendrocyte myélinise de nombreux axones à la fois. Nous concentrerons ce chapitre sur l'oligodendrocyte, cellule impactée dans les pathologies démyélinisantes du SNC.

i) Description, origine et différenciation

L'oligodendrocyte dérive, comme l'astrocyte, des cellules souches neurales qui donnent naissance aux cellules précurseur d'oligodendrocyte (OPC) en fin de gestation (Bercury and Macklin, 2015). Durant le développement les oligodendrocytes migrent le long de la vascularisation cérébrale par le biais du signal Wnt (« *wingless integrated* ») et du récepteur à la chémokine CXCR4 permettant l'interaction entre l'OPC et la cellule endothéliale (Hughes and Appel, 2016). L'OPC est identifié par l'expression de NG2 et du

Rappels bibliographiques

« platelet-derived growth factor receptor alpha » (PDGFR α). Récemment, il a été montré que NG2 régule la polarité et la migration de ces précurseurs oligodendrocytaires (Hughes and Appel, 2016). Ces cellules, qui ont conservé leurs capacités de prolifération, se divisent puis se différencient, passant par un stade pré-oligodendrocyte puis pré-myélinisant, pour devenir des oligodendrocytes matures et enfin des oligodendrocytes myélinisants.

Au cours de sa différenciation, l'oligodendrocyte exprime différents marqueurs : par exemple les oligodendrocytes immatures pré-myélinisants expriment la 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) et les oligodendrocytes myélinisants expriment la protéine de myéline basique (MBP) (Barateiro and Fernandes, 2014; Traiffort et al., 2016) (**Figure 7**). Tout comme pour l'astrocyte, la maturation des oligodendrocytes et la myélinisation a lieu en fin de grossesse et s'étend pendant l'enfance. Chez l'homme, la myélinisation se met en place entre 28 et 40 semaines de grossesse (Back et al., 2001) avec l'apparition d'oligodendrocytes MBP⁺. Chez le rongeur, les premiers oligodendrocytes MBP⁺ dans le cerveau apparaissent à 7 jours après la naissance et leur nombre augmente jusqu'à 14 jours, avec un taux de myélinisation équivalent à celui d'un enfant arrivé à terme (Bjelke and Seiger, 1989). Ainsi, la myélinisation est un processus qui a lieu tout au long de la vie et elle peut être induite en contexte physiologique et pathologique. En effet dans le SNC, la présence d'OPCs conservant leurs capacités de prolifération et de migration, forment de nouveaux oligodendrocytes en condition physiologique ou pathologique après une atteinte démyélinisante.

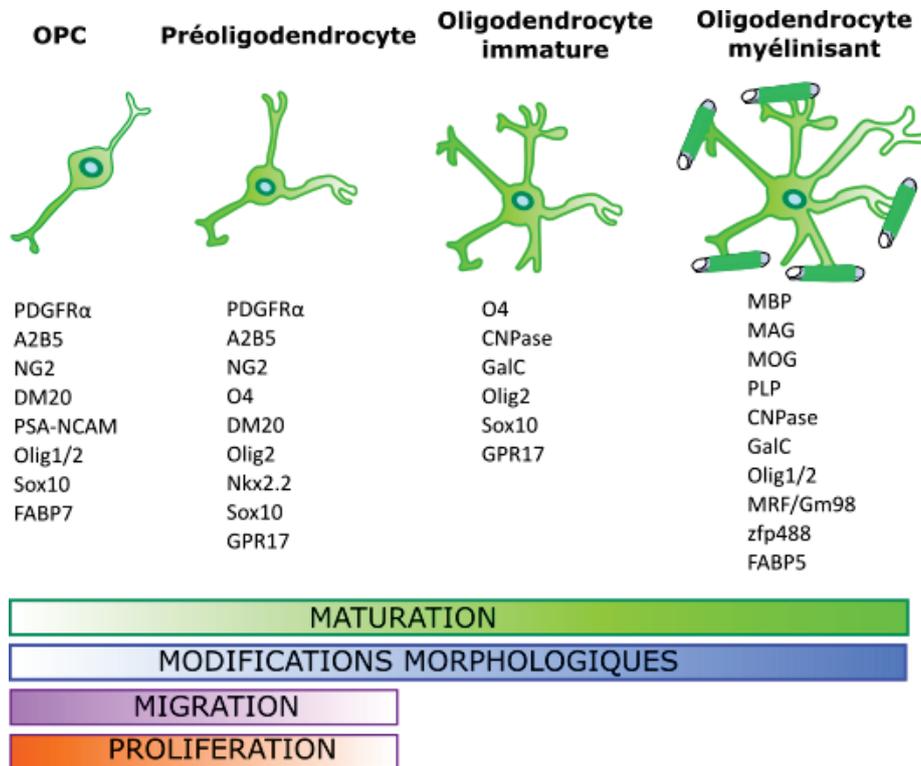


Figure 7 : Différents stades de différenciation des oligodendrocytes et leurs marqueurs spécifiques. Les oligodendrocytes proviennent des cellules souches neurales qui donnent naissance aux précurseurs d'oligodendrocytes (OPC) puis au cours de la maturation l'OPC se transforme en préoligodendrocyte puis en oligodendrocyte immature et enfin en oligodendrocyte mature myélinisant. Au cours de la maturation les oligodendrocytes n'expriment pas les mêmes marqueurs et acquièrent une plus grande complexité morphologique. CNPase : 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase ; DM20 : isoforme plus courte de PLP ; FABP : fatty-acid-binding protein ; GalC : galactocerebroside C ; GPR17 : Uracil nucleotide/cysteinyl leukotriene receptor ; MAG : myelin associated glycoprotein; MBP : myelin basic protein; MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein ; MRF : myelin gene regulatory factor; NG2 : Neural/glial antigen 2 ; Olig: facteur de transcription oligodendrocytaire ; PDGF-R : platelet-derived growth factor receptor; PLP: proteolipid protein; PSA-NCAM: polysialic acid-neural cell adhesion molecule; Sox : SRY-related HMG-box ; zfp: zinc finger proteins. Schéma adapté de Barateiro and Fernandes, 2014.

ii) Signaux régulant la myélinisation

Les oligodendrocytes sont capables de se différencier en absence d'axone et myéliniser des fibres synthétiques (Lee et al., 2012a; Klingseisen and Lyons, 2018). Cependant, en présence de neurones, les oligodendrocytes ne myélinisent que les axones et non les dendrites, et ce même en culture cellulaire, ce qui suppose que les oligodendrocytes reçoivent des signaux afin d'initier la myélinisation (Lubetzki et al., 1993). Aussi, tous les axones ne sont pas myélinisés ce qui démontre que, malgré une certaine forme de programmation de l'oligodendrocyte à la myélinisation, celle-ci est régulée par des signaux externes. Ces signaux peuvent provenir de l'axone directement mais pas uniquement. Au sein du SNP, l'expression de neuréguline-1 est suffisante pour donner le signal à la cellule de Schwann de myéliniser un axone, cependant dans le SNC les signaux sont multiples (Almeida, 2018). Dans le SNC, les axones et les oligodendrocytes expriment des molécules d'adhésion et des récepteurs acteurs de l'interaction cellulaire et régulant la formation d'une gaine de myéline. Certaines interactions seront attractives et d'autres répulsives, conditionnant le choix des axones à myéliniser.

Des études récentes ont montré l'implication de l'activité neuronale dans la prolifération des OPC, leur différenciation en oligodendrocyte et leur survie, et enfin le déclenchement de la myélinisation (de Faria et al., 2019). En effet, le nombre d'OPC en division est drastiquement réduit quand l'activité électrique axonale est bloquée (Barres and Raff, 1999) et la survie de ces cellules est également affectée (Gary et al., 2012). L'utilisation d'approches telles que l'optogénétique a également permis de montrer qu'une stimulation de l'activité neuronale augmente le nombre d'OPCs en division et ne modifie pas la prolifération d'autres cellules gliales (Gibson et al., 2014). Une augmentation du nombre d'oligodendrocytes différenciés a également été observée.

Par ailleurs, les oligodendrocytes forment des connections de type synaptiques avec les neurones et expriment des récepteurs aux neurotransmetteur, tels qu'au GABA et au glutamate, qui peuvent influencer la prolifération et la survie des OPCs (de Faria et al., 2019). L'activité axonale induit également la libération de facteurs de croissance qui stimulent la survie des oligodendrocytes. Enfin, l'augmentation de l'activité neuronale provoque la libération d'ATP qui, convertie en adénosine, inhibe la prolifération des OPCs et stimule leur différenciation (Stevens et al., 2002; Simons and Trajkovic, 2006). Toutes ces observations indiquent que de nombreux signaux axonaux peuvent réguler la myélinisation, conférant une forme de plasticité à la myéline au sein du SNC adulte (**Figure 8**). Cette plasticité de la myéline est d'ailleurs impliquée dans les fonctions cognitives (McKenzie et al., 2014). Enfin, en condition pathologique, la

Rappels bibliographiques

démyélinisation est suivie d'une remyélinisation qui peut être influencée par l'activité neuronale (Gautier et al., 2015).

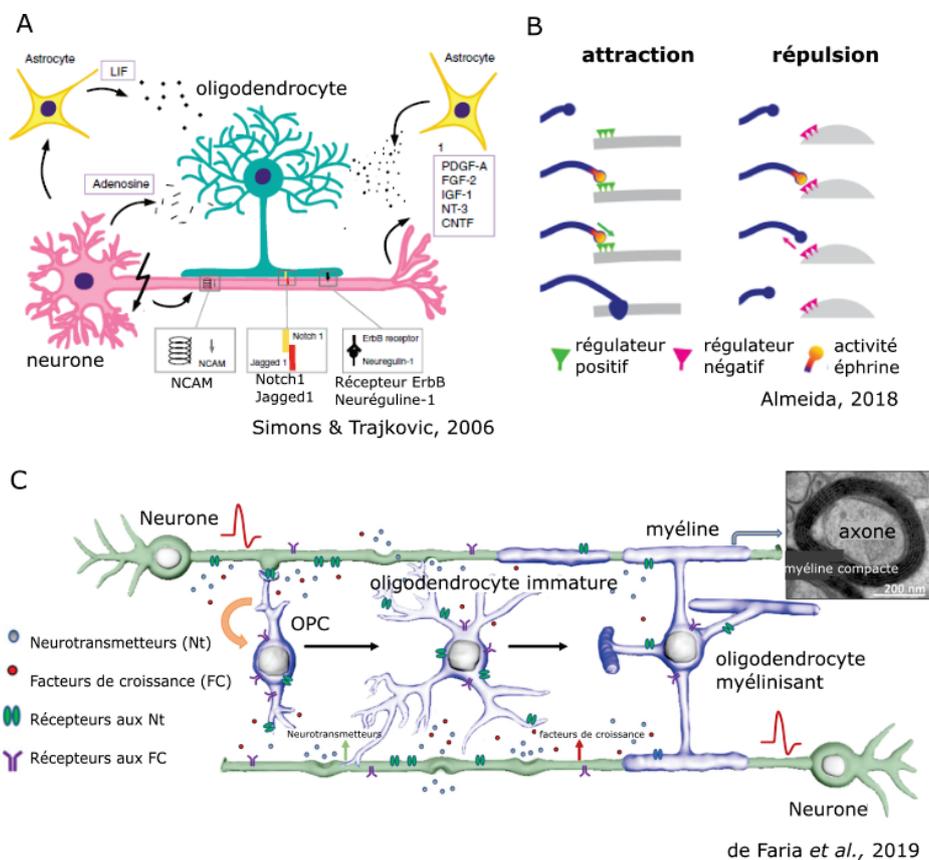


Figure 8 : Signaux de différenciation des oligodendrocytes et de myélinisation dans le SNC. **A)** Les neurones et/ou les astrocytes libèrent des facteurs de croissance comme le PDGF, le FGF-2, l'IGF-1, le NT-3 ou le CNTF qui régulent la prolifération, la différenciation et la survie des oligodendrocytes. Les interactions entre récepteurs membranaires et ligand exprimés par l'axone ou l'oligodendrocyte régulent également la maturation oligodendrocytaire (Notch-1/Jagged1 : inhibiteur et récepteur ErbB/neuréguline : activateur). L'activité neuronale induit la diminution de l'expression de la protéine d'adhésion N-CAM et la production d'adénosine par le neurone et de LIF par l'astrocyte favorisant la myélinisation **B)** Des signaux d'attraction ou de répulsion à la membrane des axones déterminent quels axones doivent être myélinisés probablement via une cinétique de signalisation dépendant de l'éphrine. **C)** La différenciation de la lignée oligodendrocytaire dépend de l'activité neuronale via la libération de neurotransmetteurs et de facteurs de croissance qui participent à la myélinisation au cours du développement et dans le SNC mature. Schémas adaptés de Simons and Trajkovic, 2006 ; Almeida, 2018 ; de Faria et al. 2019

iii) L'oligodendrocyte : un support trophique de l'axone

En plus de leur rôle de myélinisation, les oligodendrocytes sont essentiels pour le fonctionnement et la survie de l'axone et ce indépendamment de la présence d'une gaine de myéline (Nave, 2010). En effet, les oligodendrocytes sécrètent des facteurs tels que « *insulin-like growth factor* » (IGF-1), « *brain derived neurotrophic factor* » (BDNF) ou la neurotrophine 3 (NT-3) qui augmentent la survie et l'activité neuronale (Wilkins et al., 2001; Dai et al., 2003). Les neurones, et plus particulièrement leur axone, consomment de grandes quantités d'ATP du fait de la forte activité de pompes telles que la $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$: ils doivent donc être réapprovisionnés en métabolites tels que le pyruvate ou le lactate pour le fonctionnement mitochondrial au sein de l'axone (Nave, 2010). Les oligodendrocytes, ainsi que les astrocytes, sont une source de métabolites énergétiques pour les neurones. Les oligodendrocytes forment un compartiment cytosolique le long de l'axone, l'espace périaxonal, essentiel pour l'échange de métabolites (Simons and Nave, 2016). Les oligodendrocytes expriment des transporteurs au glucose de type 1 (GLUT1) et des transporteurs aux monocarboxylates de type 1 et 2 (MCT1 et MCT2), permettant le transport du glucose, sa transformation en lactate dans l'oligodendrocyte, et sa redistribution à l'axone (Figure 9). Les oligodendrocytes peuvent également obtenir ces métabolites énergétiques via les astrocytes grâce à leur couplage par des jonctions communicantes (Figure 9).

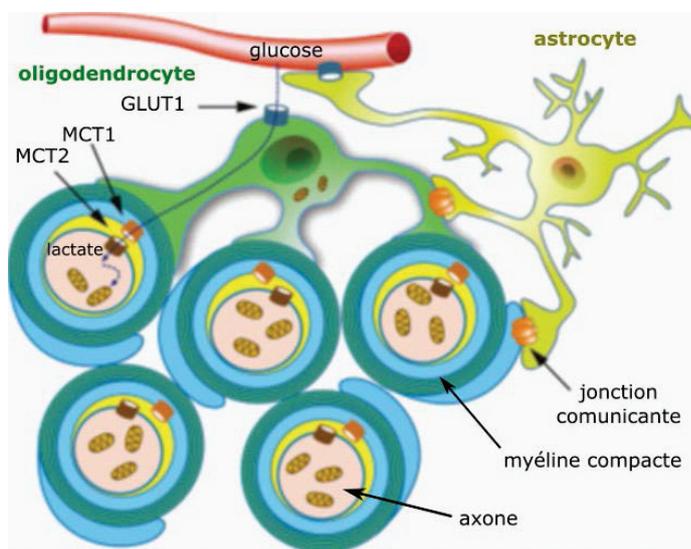


Schéma issu de Simons and Nave, 2016

Figure 9 : Les astrocytes et les oligodendrocytes apportent un soutien trophique à l'axone. Les métabolites énergétiques tels que le glucose sont prélevés dans le sang par les astrocytes et les oligodendrocytes par les transporteurs au glucose GLUT1. Puis ce glucose est transformé en lactate et est transporté à travers la gaine de myéline puis dans l'axone via des transporteurs aux monocarboxylates MCT1 et MCT2. Les échanges de métabolites entre astrocytes et oligodendrocytes sont assurés par les jonctions communicantes.

C. Les relations neurone-glie et glio-gliales

i) Le neurone : unité fonctionnelle du SNC

Nous allons faire un court rappel sur le fonctionnement basique des neurones dont les fonctions sont très finement régulées, notamment par les cellules gliales.

Les neurones sont les cellules excitables du SNC, recevant et transmettant informations qui sous-tendent toutes les grandes fonctions cérébrales (mémoire, prise de décision, émotions, apprentissages etc.). Ils sont en effet capables de déclencher et propager des potentiels d'action (PA). La propagation du PA se fait soit de proche en proche, dans les axones des neurones non myélinisés, soit de manière saltatoire, dans les axones myélinisés. Ce signal électrique doit ensuite être transformé en signal chimique afin d'être transmis à un autre neurone. Cette conversion est opérée au travers de synapses composées d'un élément pré-synaptique, la terminaison axonale et de l'élément post-synaptique, qui est généralement une épine dendritique, mais peut aussi être la dendrite ou le corps cellulaire du neurone post-synaptique. L'arrivée du PA à la terminaison axonale déclenche une série de mécanismes aboutissant à la libération de neurotransmetteurs par le neurone pré-synaptique dans la fente synaptique. La synapse la mieux décrite est la synapse excitatrice glutamatergique.

Le glutamate, principal neurotransmetteur exciteur du SNC, se fixe à des récepteurs ionotropiques α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate (AMPA) et N-méthyl-D-aspartate (NMDA) ou à des récepteurs métabotropiques (mGluR), couplés à des protéines G, situés à la membrane du neurone post-synaptique. Les récepteurs AMPA et NMDA sont responsables d'une entrée d'ions qui provoque une dépolarisation de la membrane du neurone post-synaptique : le potentiel post-synaptique exciteur (PPSE). La sommation spatiale et temporelle de nombreuses activités synaptiques va permettre au neurone post-synaptique, à son tour, d'initier un PA au niveau du segment initial, si l'amplitude de la dépolarisation est supraliminaire.

Cependant, les récepteurs AMPA et NMDA ont des modes de fonctionnement et des rôles différents. Tout d'abord, les récepteurs AMPA sont activés par le glutamate seul laissant entrer des ions Na^+ , et permettent ainsi une forte dépolarisation de courte durée de la membrane post-synaptique. Les récepteurs NMDA, quant à eux, possèdent deux sites d'activation, l'un pour le glutamate (agoniste), et l'autre pour la glycine ou la D-Sérine (co-agonistes) et ils ne sont activés que lorsque ces deux sites sont occupés (Furukawa et al., 2005). De plus, un ion Mg^{2+} bloque le canal : il ne peut être délogé qu'en présence d'une dépolarisation

de la membrane du neurone post-synaptique. Ainsi les récepteurs NMDA sont des détecteurs de coïncidences, et une fois ouverts, laissent entrer des ions Ca^{2+} provoquant une dépolarisation plus lente et plus longue que celle des récepteurs AMPA. Cette entrée de Ca^{2+} va également participer à la plasticité synaptique par un mécanisme de potentialisation à long terme (LTP), en induisant la synthèse et le trafic de récepteurs AMPA au niveau de la synapse. L'augmentation de densité en récepteur AMPA post-synaptique potentialise l'effet du glutamate à la synapse en augmente l'amplitude du PPSE (Schwartz, 2001; Siddoway et al., 2011).

Le glutamate peut aussi avoir un effet excitotoxique s'il active des récepteurs en dehors de la fente synaptique ou s'il y reste trop longtemps. C'est pourquoi il est recapturé et éliminé par le neurone pré-synaptique et surtout par l'astrocyte présent à la synapse.

Ainsi la régulation de la transmission synaptique est cruciale pour le bon fonctionnement neuronal et des réseaux neuronaux qui sous-tendent les grandes fonctions cérébrales et sera discutée dans le chapitre « l'astrocyte et la synapse tripartite »

ii) L'astrocyte une source de métabolites énergétiques pour le neurone

L'astrocyte fait partie de l'unité neuro-glio-vasculaire (NGV), qui lui permet de contacter à la fois les vaisseaux sanguins et les neurones, au niveau du corps cellulaire, des dendrites ou de leur axone comme au niveau des nœuds de Ranvier des neurones myélinisés. Les astrocytes peuvent ainsi prélever le glucose depuis les vaisseaux sanguins, le transformer en lactate, via le cycle de Krebs, et le redistribuer aux neurones. De plus, les astrocytes sont les seules cellules capables de stocker et transformer du glycogène dans le SNC. L'accumulation de glycogène a lieu principalement dans les zones à forte densité synaptique. Ce glycogène peut être transformé en lactate : il est alors utilisé pour palier une hypoglycémie ou bien en cas de forte activité neuronale. Enfin, l'astrocyte possède des transporteurs au glucose : le principal, GLUT1/SLC2A1, est exprimé au niveau des pieds astrocytaires, permettant une entrée de glucose (Morgello et al., 1995). Le lactate, peut également être prélevé ou libéré par les astrocytes via des transporteurs des monocarboxylates. L'expression de ces deux types de transporteurs peut être modifiée en condition pathologique et notamment dans les lésions de patients atteints de sclérose en plaques (SEP) (Nijland et al., 2014). Les astrocytes peuvent aussi réguler le débit sanguin en induisant une vasoconstriction ou une vasodilatation en réponse à une modification d'activité synaptique (Koehler et al., 2009). Cette modulation de flux sanguin est régulée par la libération, au niveau des pieds astrocytaires

entourant les vaisseaux, de prostaglandines, d'oxyde nitrique, d'acide arachidonique (Iadecola and Nedergaard, 2007), d'ATP (Kim et al., 2015) ou de potassium (Filosa et al., 2006) (**Figure 10**).

Ainsi, les astrocytes sont capables de détecter une augmentation d'activité neuronale et de fournir immédiatement l'apport énergétique essentiel au fonctionnement des neurones de manière spécifique et locale.

iii) L'astrocyte : un membre de la synapse tripartite.

Les astrocytes régulent également la présence de neurotransmetteurs dans les synapses. En effet le pied astrocytaire, au niveau de la synapse tripartite, exprime fortement les transporteurs au glutamate (GLAST et GLT1) (Sattler and Rothstein, 2006), au GABA (Xin and Bonci, 2018) et à la glycine (López-Corcuera et al., 2017), permettant de réguler la présence de neurotransmetteurs à la synapse. Du fait de son effet excitotoxique, il est essentiel de contrôler la concentration de glutamate. Celui-ci est recapturé par l'astrocyte et transformé en glutamine via l'action de la glutamine synthétase (Norenberg and Martinez-Hernandez, 1979).

L'astrocyte peut également libérer des molécules actives à la synapse, appelées **gliotransmetteurs**, tels que le glutamate, les purines (ATP et adénosine), le GABA et la D-Sérine. La **gliotransmission** correspond à la libération de gliotransmetteurs faisant suite à la détection d'une modification d'activité synaptique : par la baisse de concentration extracellulaire de Ca^{2+} ou via l'activation de récepteurs métabotropiques à la membrane de l'astrocyte (Ben Achour et al., 2010; Ben Achour and Pascual, 2012) provoquant une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} dans l'astrocyte (Nedergaard et al., 2003; Halassa et al., 2007a; Perea et al., 2009).

L'astrocyte joue un rôle prédominant dans la transmission synaptique : on considère qu'il peut interagir avec 1×10^5 à 2×10^6 synapses à la fois (Oberheim et al., 2009). Les cellules gliales et neurones entretiennent des « conversations croisées » qui permettent des interactions bidirectionnelles. Les astrocytes sont capables de détecter la libération de neurotransmetteurs dans tous les types de synapses, excitatrices ou inhibitrices. Par exemple, l'activité synaptique glutamatergique provoque la libération de glutamate, de D-Sérine, d'ATP ou d'adénosine par l'astrocyte. Ces molécules activent des récepteurs pré- ou post-synaptiques, contrôlant ainsi le seuil de transmission synaptique mais participant aussi à la plasticité synaptique (**Figure 10**). Ainsi, un gliotransmetteur peut avoir plusieurs mécanismes d'action en fonction du type de synapse et du (des) récepteur(s) qu'il active (Araque et al., 2014). Par ailleurs, les astrocytes

peuvent libérer des facteurs de croissance et des cytokines (telles que le TNF- α) capable de modifier à long terme l'activité synaptique par des mécanismes de potentialisation ou de dépression à long terme (Stellwagen and Malenka, 2006).

Enfin, les astrocytes peuvent réguler la formation et l'élimination de synapses. En effet les astrocytes sécrètent des facteurs qui induisent la formation de synapse fonctionnelles entre neurones et augmentent la taille des neurites (Buosi et al., 2018). Ce processus a été mis en évidence pendant le développement mais pourrait également être impliqué chez l'adulte, lors d'apprentissages, de changements environnementaux ou dans des contextes pathologiques (Xin and Bonci, 2018). Ce processus est également soutenu par les cellules microgliales qui ont une forte activité phagocytaire (**Boite n°3**).

Boite n° 3 : Les cellules microgliales, des architectes des circuits neuronaux

Les cellules microgliales jouent un rôle très important pour la mise en place et la régulation des connections synaptiques, notamment durant le développement et dans les premières semaines post-natales. Le « *synaptic pruning* » est un processus développemental au cours duquel un certain nombre de synapses sont éliminées alors que les synapses conservées sont renforcées (Schafer and Stevens, 2013). La microglie est particulièrement impliquée dans ce processus grâce à son activité phagocytaire. En effet elles forment de nombreux prolongements contactant les synapses et « engloutissent » les éléments synaptiques devant être éliminés (Paolicelli *et al.*, 2011). Les éléments du complément C1q et C3 seraient également impliqués en « marquant » les synapses indésirable qui sont destinées à être phagocytées (Schafer et al., 2012; Bialas and Stevens, 2013). Ainsi les microglies sont essentielles à l'affinage des circuits neuronaux durant le développement et en condition physiologique. Dans le SNC adulte, les microglies seraient également impliquées dans le renforcement ou l'élimination de synapses, comme au cours d'apprentissages nécessitant un réarrangement des connections synaptiques. Les microglies « surveillent » un très grand nombre de synapses grâce à leurs très nombreux prolongements et adaptent leur motilité à l'activité neuronale (Wu *et al.*, 2015; Hristovska and Pascual, 2016). Elles peuvent également interagir avec les neurones via des interactions avec entre le récepteur CX3CL1 neuronal et CX3CR1 microglial. Elles sont également susceptibles de libérer de molécules actives à la synapse telles que l'ATP ou des cytokines proinflammatoires (IL-1 β et TNF- α) qui modulent la force des synapses (Wu *et al.*, 2015; Hristovska and Pascual, 2016).

iv) L'astrocyte : un partenaire de la myélinisation

Le rôle de l'astrocyte dans la myélinisation a été d'abord proposé par Müller en 1904 qui associait la démyélinisation, observée dans la sclérose en plaques, à une dysfonction astrocytaire. Cela a été validé par l'observation d'une surexpression de la GFAP, indiquant la présence d'astrocytes réactifs, dans les lésions actives chroniques en comparaison avec la substance blanche d'apparence normale (Webster et al., 1985). Le rôle de l'astrocyte dans la myélinisation a alors été étudié.

Dans un premier temps les études sur la myélinisation se sont concentré sur la différenciation des oligodendrocytes, cellule myélinisante du SNC, en l'absence d'axones à myéliniser (Barnett and Linington, 2013). Cela a ainsi permis de montrer que la prolifération et la survie des oligodendrocytes dépend de facteurs tels que le PDGF- α et le FGF-2 qui peuvent être produits par l'astrocyte (Moore et al., 2011). Ces deux facteurs seraient impliqués dans la remyélinisation en permettant la prolifération et le recrutement d'OPC, cependant ils ne sont pas suffisants pour induire la myélinisation et auraient même des effets délétères sur les oligodendrocytes matures. L'implication des astrocytes dans la myélinisation a aussi été suggérée par l'association entre une mutation de la GFAP et la maladie d'Alexander caractérisée par une dégénérescence neuronale et une démyélinisation (Brenner et al 2001, Li et al. 2002).

Cependant, la myélinisation est un processus complexe qui implique aussi l'activité électrique des neurones, la présence d'une matrice extracellulaire et la signalisation entre l'axone et les cellules gliales. Ainsi des cocultures ont été développées, associant oligodendrocytes et neurones puis en ajoutant les astrocytes et les cellules microgliales afin de mimer le processus de myélinisation en condition physiologique (Sorensen et al., 2008). Dans ces modèles de culture dite « myélinisante », il est possible d'induire une démyélinisation pour ensuite étudier la remyélinisation : celle-ci étant meilleure en présence d'astrocytes (Nash et al., 2011). Également, l'activité neuronale, en stimulant la libération du facteur LIF (pour « *leukemia inhibitory factor* ») par les astrocytes, favorise la myélinisation (Ishibashi et al., 2006) (**Figure 8**). Par ailleurs, il est possible de contrôler le phénotype des astrocytes présents dans ces cultures et de le modifier. Cela a permis d'identifier les facteurs pro-myélinisants ou inhibant la myélinisation, produits par les astrocytes (**tableau 1**)

Facteurs promyélinisants	Facteurs inhibant la myélinisation
γ-sécrétase	TGF-α
TIMP-1	IL-1β
CNTF & LIF (famille de l'IL-6)	BMP2/4
IGF-1	Ténascine C
BDNF	Hyaluronine / CD44
Neuréguline 1	PDGF-α / FGF-2
Collagène fibrillaire et laminine	CXCL10, CXCL12, CXCL1
Neurotrophine-3	CTGF
GDNF	TROY
NGF	Lingo-1

Tableau 1 : Facteurs produits par les astrocytes modulant la myélinisation. BMP: bone morphogenic protein, CNTF: ciliary neurotrophic factor, CTGF: connective tissue growth factor, FGF: fibroblast growth factor, GDNF: glial cell-derived neurotrophic factor, LIF: leukemia inhibitory factor, IL: interleukine, NGF: nerve growth factor, PDGF: platelet-derived growth factor, TGF: transforming growth factor, TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase. Tableau issu de Barnett and Linington, 2013.

v) *L'astrocyte au nœud de Ranvier*

La gaine de myéline est interrompue au niveau des nœuds de Ranvier (NR) qui sont caractérisés par une très forte concentration en canaux sodiques, permettant la conduction saltatoire du potentiel d'action. Ces structures sont formées par l'interaction de molécules d'adhésion appartenant à l'axone et à la cellule myélinisante formant des complexes d'adhésion. La présence de prolongements astrocytaires contactant les NR souligne leur rôle potentiel dans la régulation du métabolisme, des concentrations ioniques extracellulaires et la production de substance régulant les fonctions du nœud de Ranvier (Waxman, 1986). En effet la spécialisation moléculaire des prolongements astrocytaires au niveau des NR a été démontrée avec l'expression de la glycoprotéine J1 qui est impliquée dans les interactions entre astrocytes et neurones et participerait à la formation et au maintien des NR (Ffrench-Constant et al., 1986).

Plus récemment, une étude a montré la présence des prolongements astrocytaires dans plus de 95% des NR avec ou non présence de cellules gliales NG2 (Serwanski et al., 2017). Ces prolongements astrocytaires pourraient jouer un rôle dans la régulation du K⁺ extracellulaire libéré pendant l'activité neuronale (Kimelberg, 2010).

Enfin, il a été très récemment démontré que l'astrocyte peut moduler la vitesse de conduction des potentiels d'action en modifiant la structure des NR. En effet, les astrocytes périnodaux sont capables de

Rappels bibliographiques

libérer, par exocytose, une molécule inhibant l'action de la thrombine qui est responsable du clivage de la neurofascine 155 (NFasc155). La NFasc155, une molécule d'adhésion exprimée au paranoeud, est essentielle à l'ancrage des boucles de myéline paranodales et ainsi au maintien de la structure du NR. Ainsi les auteurs ont pu démontrer qu'en inhibant l'exocytose astrocytaire la structure du NR est altérée : avec un détachement de boucles paranodales, une augmentation de la taille des NR et une diminution de l'épaisseur de la gaine de myéline. Ces modifications sont associées à une augmentation de la latence de réponse neuronale, due à une diminution de la vitesse de conduction des PA. Par ailleurs, la présence des prolongements astrocytaires aux NR suggère également qu'ils pourraient être une source locale de métabolites énergétiques via le couplage neurovasculaire (Dutta et al., 2018).

L'étendue des fonctions de l'astrocyte au NR reste mal connue mais il semblerait que l'astrocyte joue un rôle prépondérant dans le fonctionnement neuronal en régulant la structure des NR et la conduction saltatoire des potentiels d'action.

Ainsi nous commençons seulement à éclaircir l'étendue des fonctions des astrocytes dans le SNC qui mettent en jeu leurs interactions avec les autres cellules gliales, les neurones et les interfaces (**Figure 10**). Une altération du phénotype et des fonctions de l'astrocyte peut ainsi s'avérer délétère pour le fonctionnement du SNC et participer dans de nombreuses pathologies.

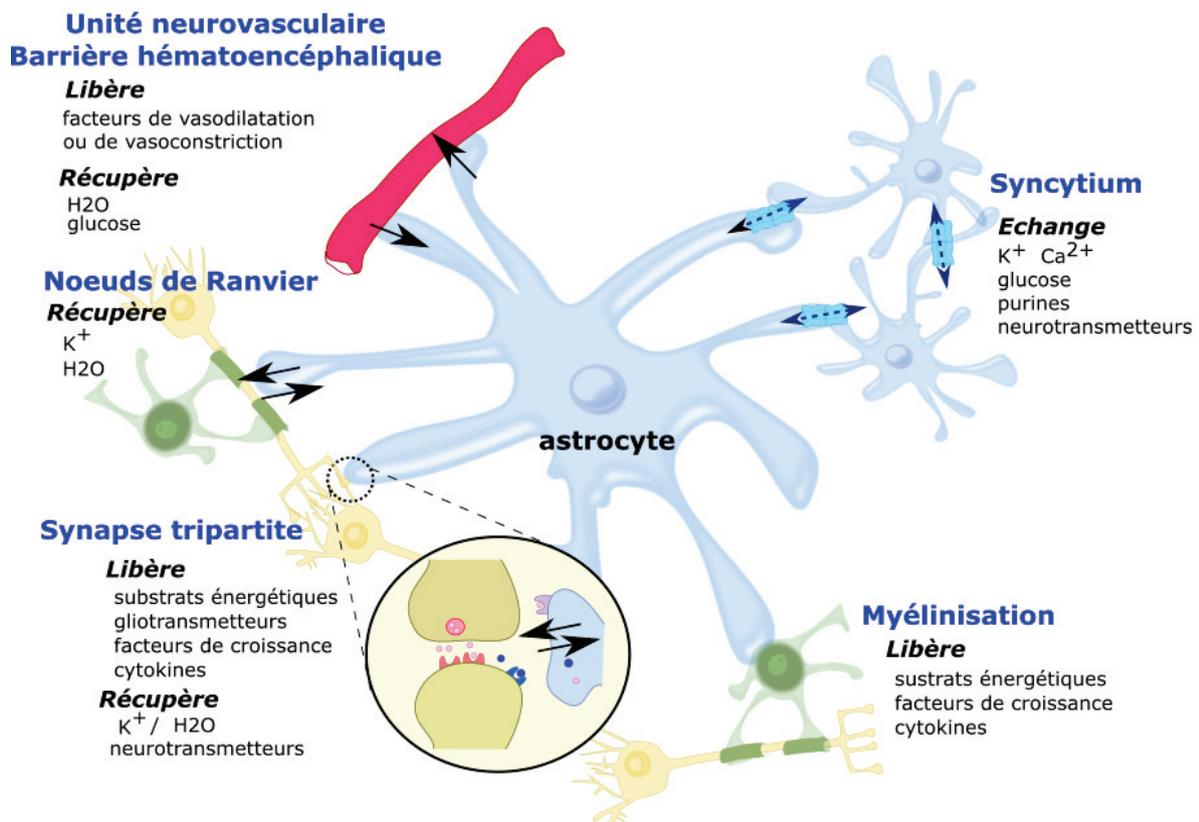


Figure 10 : Schéma récapitulatif des fonctions de l'astrocyte dans le SNC. L'astrocyte interagit avec les cellules gliales et les neurones, pour maintenir et réguler : le réseau neuroglial, la myélinisation, l'activité synaptique, la structure du nœud de Ranvier, la barrière hématoencéphalique. Toutes ces interactions se font par le biais de l'échange, la libération ou la récupération de molécules et d'ions entre les cellules ou avec le milieu extracellulaire.

D. La dysfonction astrocytaire et son implication en pathologie

i) L'astrogliose réactive

Les cellules gliales, et plus spécialement les astrocytes, sont très plastiques et s'adaptent lorsque le SNC est soumis à des conditions non physiologiques. L'astrogliose réactive est un mécanisme défensif par lequel les astrocytes modifient leur phénotype afin de s'adapter à un contexte particulier. Ce terme d'astrogliose réactive ou d'**astrocyte réactif** regroupe toutes les formes de réactions de l'astrocyte en cas d'atteinte touchant le SNC telles que le trauma, l'ischémie cérébrale, la neuroinflammation ou la dégénérescence neuronale (Pekny and Pekna, 2014). Elle peut être qualifiée de constitutive, graduée et évolutive. L'hétérogénéité des astrocytes réactifs rend la définition du concept difficile et il reste encore de nombreux aspects à élucider pour comprendre leur implication dans les pathologies affectant le SNC. De la même façon il est encore difficile d'identifier la part bénéfique et néfaste des astrocytes réactifs. En effet, au cours d'une même atteinte du SNC, la réactivité astrocytaire peut être dans un premier temps bénéfique pour limiter les dégâts aux neurones, puis devenir néfaste, si elle persiste. De la même façon, les caractéristiques de la réactivité astrocytaire sont très différentes entre les différentes atteintes précédemment citées. Les astrocytes qualifiés de réactifs sont caractérisés par une modification de leur transcription génique, de leur morphologie et de leur fonction.

L'analyse du profil d'**expression génique** d'astrocytes réactifs a été largement étudiée. L'expression de nombreux gènes peut ainsi être modulée positivement ou négativement et dépend du contexte dans lequel l'astrocyte réactif est produit (Anderson et al., 2014). Deux gènes principaux sont induits chez des astrocytes réactifs en condition ischémique ou neuroinflammatoire : *Lcn2* (pour « *lipocalin-2* ») et *Serpina3n* (Zamanian et al., 2012). Cette étude montre également que les profils géniques des astrocytes réactifs sont très différents selon la condition d'induction : ischémie ou neuroinflammation, cependant, une partie des gènes induits est commune aux deux. Comparés aux astrocytes sains ou en condition ischémique, les astrocytes réactifs en condition neuroinflammatoire (+ lipopolysaccharide) expriment, par exemple, spécifiquement des gènes impliqués dans la présentation de l'antigène et ceux de la cascade du complément.

Au niveau morphologique, l'astrocyte réactif présente une **hypertrophie** graduelle : il est possible de distinguer trois stades d'astrogliose : légère, modérée à sévère (**Figure 11B**). Un marqueur connu de réactivité astrocytaire est l'augmentation de l'expression de la GFAP (Eng and Ghirnikar, 1994) qui est alors exprimée par un grand nombre d'astrocytes. Les astrocytes réactifs expriment aussi la vimentine

(Wilhelmsson, 2004). Les domaines occupés par les astrocytes ne se recouvrent pas en condition physiologique et sont préservés quand l'astrogliose est légère à modérée. En revanche, en cas d'astrogliose sévère, une prolifération astrocytaire donne lieu à la formation d'une cicatrice gliale et les prolongements astrocytaires se superposent (Sofroniew, 2009; Ceyzériat et al., 2016). Cette cicatrice gliale est formée d'astrocytes et d'autres cellules gliales, comme les cellules NG2, et forme une barrière contre les agents potentiellement nocifs pour les neurones. Elle persiste généralement longtemps, et ce même après disparition de l'atteinte qui l'avait initialement déclenchée, empêchant certains remaniements neuronaux.

L'**activation astrocytaire** dénote de la réponse d'un astrocyte en condition physiologique ou pathologique et peut être déclenchée par de nombreuses molécules libérées par toutes les cellules du SNC (Sofroniew, 2009). Certaines cytokines telles que l'IL-6, LIF, CNTF, TNF- α , interféron gamma (IFN- γ), IL-1 β , IL-10, TGF- β 1, et FGF-2 peuvent notamment être citées (John et al., 2003). D'autres facteurs tels que des agents bactériens, comme le lipopolysaccharide (LPS) (Farina et al., 2007) ou certaines molécules de signalisation : les neurotransmetteurs, tel que le glutamate (Cornell-Bell et al., 1990), ou des purines, comme l'ATP (Neary et al., 2003), peuvent également être impliqués (**Figure 11B**). Ces déclencheurs n'auront pas tous les mêmes effets sur l'activation astrocytaire et pourront modifier les fonctions de l'astrocyte de manière différente, voire opposée.

Aussi il est difficile de distinguer l'activation astrocytaire de la réactivité astrocytaire en contexte pathologique car elles sont toutes deux synonymes de modification des fonctions astrocytaires.

ii) La dysfonction astrocytaire comme mécanisme de physiopathogénèse

La dysfonction astrocytaire, ou **astrocytopathie**, est associée à de nombreuses pathologies du SNC et se caractérise souvent par une perte de fonctions bénéfiques et un gain de fonctions nocives (Sofroniew, 2009; Verkhratsky et al., 2016). Du fait de l'étendue des fonctions physiologiques supportées par l'astrocyte, la dysfonction astrocytaire est au centre, ou même parfois à l'origine des mécanismes de certaines pathologies. Dans l'accident vasculaire cérébral (AVC), la sclérose latérale amyotrophique ou l'épilepsie, la dégradation ou la perte de certaines fonctions astrocytaires participe à la dysfonction neuronale et à celle d'autres cellules gliales (Seifert et al., 2006).

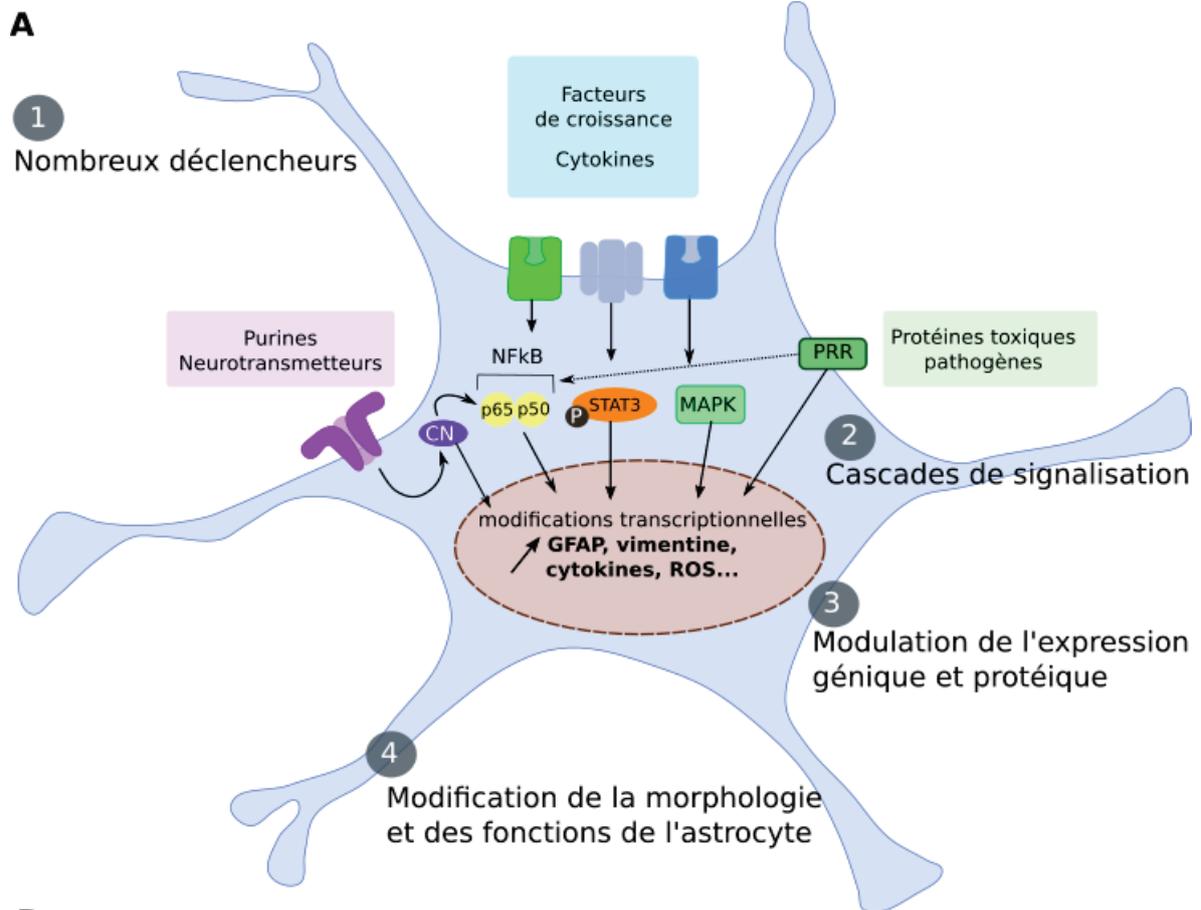
Parmi les pertes de fonction caractéristiques de l'astrocytopathie, la régulation fonctionnelle de l'homéostasie, essentiellement supportée par l'astrocyte, peut être fortement altérée par une

modification de l'expression et de la fonction (augmentation ou diminution) de l'AQP4, des connexines (Retamal et al., 2007a), ou de transporteurs comme ceux au glutamate (Hinson et al., 2008; Murugan et al., 2013). Une altération de l'expression de la glutamine synthétase astrocytaire a été rapportée dans des pathologies telles que l'hypoxie, la schizophrénie, l'épilepsie ou des maladies neurodégénératives comme Alzheimer et Parkinson (Rose et al., 2013). Par ailleurs, l'astrocyte peut avoir une morphologie atrophiée associée à une complexité plus faible : il est ainsi moins à même d'exercer ses fonctions à la synapse et aux interfaces (Sofroniew and Vinters, 2010; Verkhratsky et al., 2016).

Les astrocytes dysfonctionnels peuvent également développer des fonctions anormales ou augmenter certaines fonctions qui auront alors des effets négatifs sur le fonctionnement neuronal. Par exemple, une production plus importante de cytokines proinflammatoires (Brambilla et al., 2009) ou d'espèces réactives de l'oxygène (Hamby et al., 2006) ou encore la libération de glutamate excitotoxique (Orellana et al., 2011) participant à la physiopathogenèse de certaines atteintes du SNC.

Le **degré de réactivité** astrocytaire est variable et participe à sa pathogénicité. Ainsi, la présence d'un astrocyte très réactif comme au sein de la cicatrice gliale va empêcher la réparation tissulaire en inhibant la repousse axonale (Bush et al., 1999) et la remyélinisation (Wang et al., 2011) par la production de protéoglycanes dans la matrice extracellulaire (Silver and Miller, 2004). Il a notamment été montré que, dans des modèles où les filaments intermédiaires, la vimentine et la GFAP, ne sont pas exprimés, les astrocytes réactifs présente une hypertrophie modérée et la réparation tissulaire est meilleure (Wilhelmsson, 2004). De même, les astrocytes fortement réactifs sécrètent des cytokines et chimiokines proinflammatoires comme le TNF- α , l'INF- γ ou CXCL10 aux effets néfastes sur les oligodendrocytes et la myéline, empêchant la remyélinisation (**Figure 11B**). En revanche, les astrocytes peu réactifs sécrètent des facteurs comme LIF, FGF-2, CNTF ou des cytokines comme l'IL-6 qui ont des effets bénéfiques sur la survie neuronale et oligodendrocytaire, ainsi que sur la prolifération, la maturation et la différenciation des précurseurs oligodendrocytaires, participant ainsi à la remyélinisation (**Figure 11B**). Les astrocytes peu réactifs favorisent aussi la repousse axonale (Kiray et al., 2016).

Rappels bibliographiques



B

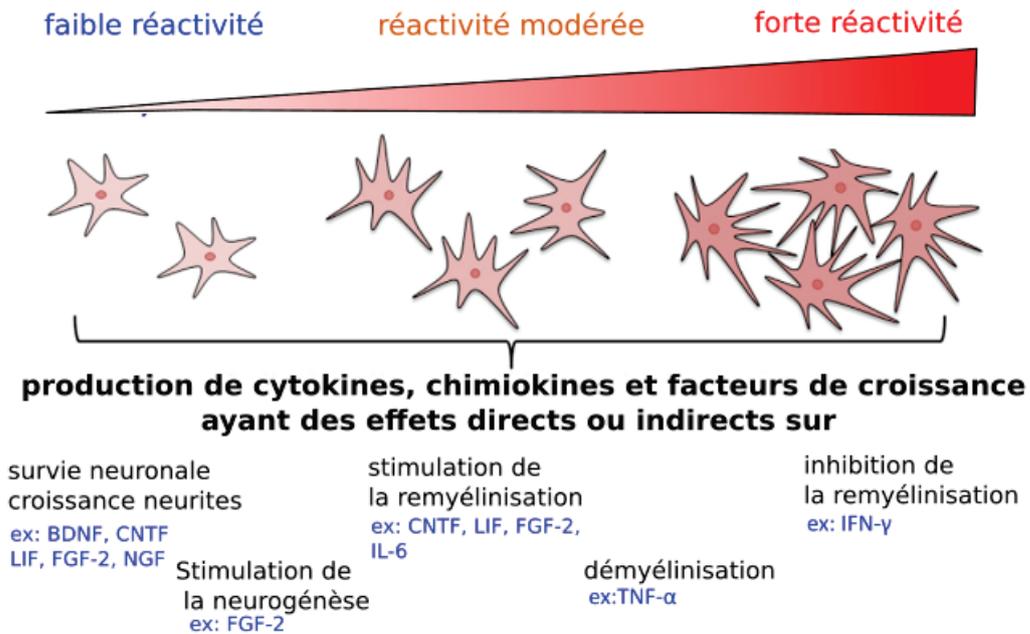


Figure 11 (légende ci contre)

Figure 11 : Mécanisme de réactivité astrocytaire et ses conséquences sur le SNC. A) L'astrocyte exprime de nombreux récepteurs aux cytokines, facteurs de croissances, neurotransmetteurs, purines ainsi qu'aux agents pathogènes (1). L'activation de ces divers récepteurs conduit à l'activation de voies de signalisation comme celles du facteur nucléaire kappa B (NFκB), des kinases « mitogen-activated protein » (MAPK), du « signal transducer and activator of transcription 3 » (STAT3) ou de la calcineurine (CN) (2). Cela conduit, directement ou indirectement, à la modification de la transcription de certains gènes comme ceux de la GFAP et de la vimentine ainsi que ceux de certaines cytokines ou d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à une synthèse protéique (3) qui aboutissent à un gain ou une perte de certaines fonctions de l'astrocyte (4). **B)** La réactivité astrocytaire est graduelle et peut être faible, modérée ou forte conduisant à la libération de différents facteurs de croissances, cytokines et chimiokines dont les effets peuvent être bénéfiques (survie neuronale, stimulation de la neurogénèse et de la remyélinisation) ou délétères (démyélinisation, inhibition de la remyélinisation). Schémas adaptés de Kiray *et al.*, 2016 et de Ben Haim *et al.*, 2015.

Toutes les grandes fonctions de l'astrocyte dépendent de l'établissement d'un réseau neuroglial permettant une bonne communication intercellulaire. Ce réseau dépend essentiellement de la présence de connexines gliales, dont l'expression et la fonction sont très précisément régulées, en condition physiologique et peuvent être sujettes à des altérations en contexte pathologique. Nous allons décrire la structure, le fonctionnement et les rôles des connexines gliales en nous concentrant sur leur implication dans le fonctionnement du SNC. Nous abordons également brièvement les pannexines (Boite 5).

II. Les connexines, support du réseau neuroglial

A. Définition des connexines

De nombreux types cellulaires peuvent établir des jonctions communicantes, essentielles aux communications intercellulaires. Celles-ci sont formées de protéines appelées connexines et font partie d'une famille multigénique dont une vingtaine d'isoformes ont été identifiées chez les mammifères : 21 connexines ont été identifiées chez l'homme et 20 chez la souris (Sohl, 2004). Ce sont des molécules transmembranaires composées de quatre domaines transmembranaires (M1 à M4), de deux boucles extracellulaires (E1 et E2), d'une boucle intracytoplasmique (C) ainsi que de deux extrémités C-terminale et N-terminale intracytoplasmiques (**Figure 12A**) (Simon and Goodenough, 1998). Les deux boucles extracellulaires sont très conservées parmi les différents membres de la famille des connexines alors que la boucle intracytoplasmique et l'extrémité C-terminale présentent une grande diversité de séquence. La nomenclature des connexines est basée sur leur masse moléculaire allant de 26 à 60 kDa.

i) Fonctions hémicanal et jonction communicante

L'assemblage des connexines à la membrane conduit à la formation d'hexamères, appelés connexons qui sont homotypiques ou hétérotypiques selon qu'ils sont formés d'un seul ou plusieurs types de connexine. Ces connexons sont organisés en hémicanaux ou en jonctions communicantes, permettant le passage de petites molécules de taille inférieure à 1kDa (**Figure 12B et C**). Ces deux organisations permettent des échanges paracellulaires (fonction *hémicanal*) ou intercellulaires (fonction *jonction communicante*).

Ainsi, les jonctions communicantes (aussi appelées « *gap junctions* ») se caractérisent par un espace intercellulaire très réduit entre les membranes de deux cellules couplées par les connexines. Elles sont composées du rassemblement d'un grand nombre de connexons : ils s'assemblent via des interactions non covalentes aux connexons d'une cellule voisine, formant ainsi des plaques de jonction communicantes visibles par microscopie électronique ou à cryofracture (**Figure 12D et E**). Il existe des jonctions communicantes homotypiques ou hétérotypiques, selon que les connexons des deux cellules sont composés du même type de connexines ou de types différents (**Figure 12C**) (Bai and Wang, 2014). Par exemple une jonction communicante homotypique sera composée de connexons de Cx43 dans les deux cellules et une jonction hétérotypique sera composée de connexons de Cx43 dans une cellule et de connexons de Cx47 dans l'autre cellule.

Rappels bibliographiques

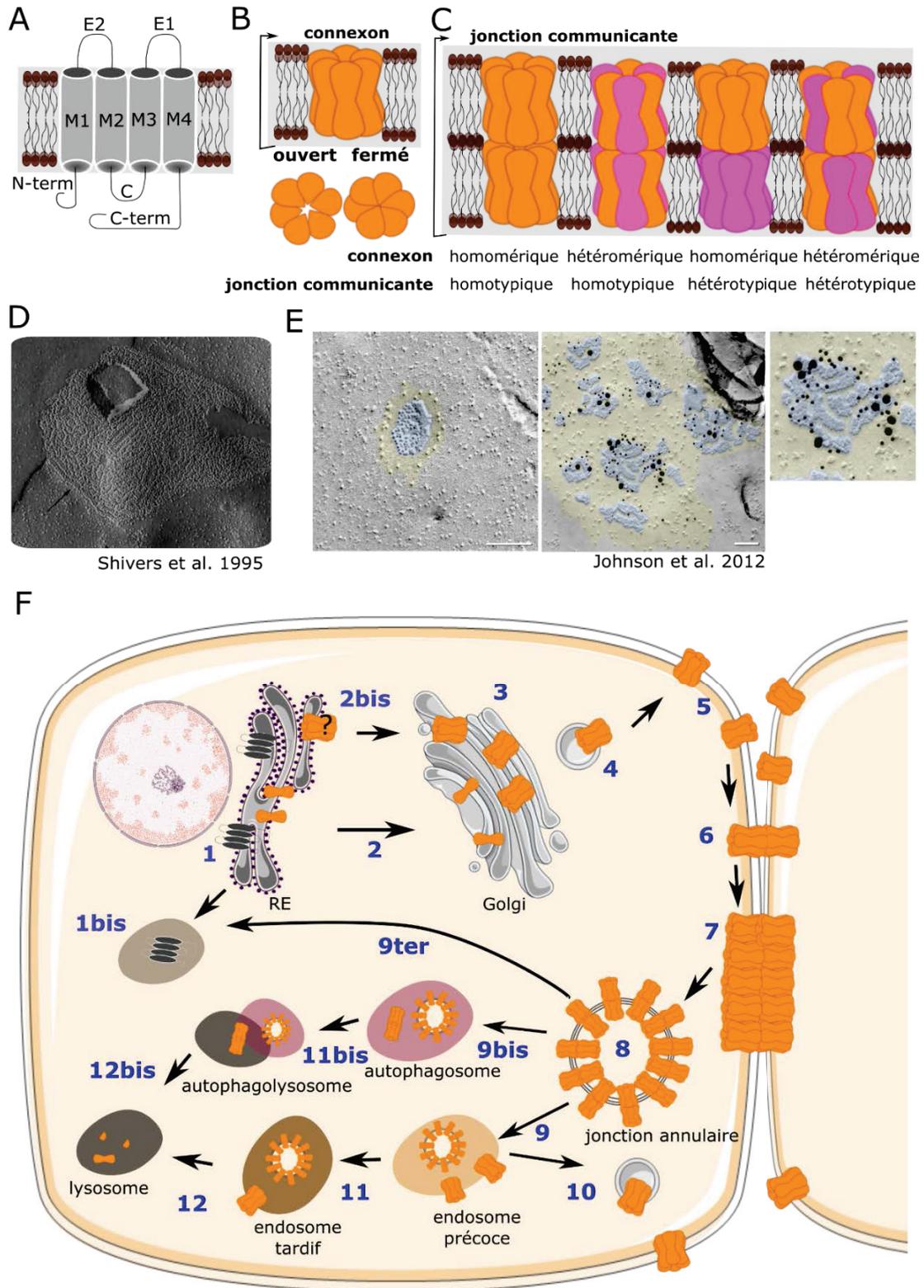


Figure 12 (légende ci-contre)

Figure 12 : Structure, expression et régulation des connexines. **A)** Structure d'une molécule de connexine insérée dans la membrane cellulaire : une connexine est composée de 4 segments transmembranaires M1 à M4, de 2 boucles extracellulaires E1 et E2, d'une boucle intracytoplasmique C, et d'extrémités N- et C-terminales. **B)** Six monomères de connexines s'assemblent pour former un hexamère appelé connexon qui peut être ouvert ou fermé. **C)** Les jonctions communicantes sont formées de la juxtaposition de deux connexons appartenant à deux cellules voisines : les jonctions communicantes peuvent être homo- ou hétérotypique si les connexons sont identiques ou différents et homomérique ou hétéromérique si les molécules de connexines composant les connexons sont identiques ou différentes. **D)** Structure d'une jonction communicante entre des cellules hépatiques de bœuf par microscopie électronique à cryo fracturation (illustration de Shivers et McVicar de 1995). **E)** Structure d'une jonction communicante entre cellules transfectées par une technique de « freeze fracture replica immunolabeling (FRIL) où la Cx43 est ici marquée par technique d'immunogold au sein des plaques de jonction communicante (image issue de Johnson *et al.* 2012). **F)** Schéma récapitulatif du cycle de vie d'une connexine : Les ARN messagers sont d'abord traduits en protéines au sein du réticulum endoplasmique (RE) où elles adoptent leur conformation tridimensionnelle (1). En cas de mauvaise conformation les connexines sont dégradées par le protéasome (1bis). Les connexons sont assemblés au sein du RE ou de l'appareil de Golgi (2, 2bis). Puis sont adressés à la membrane plasmique (4) où ils forment des hémicanaux (5). Les hémicanaux s'apposent aux connexons d'une cellule voisine (6) et s'agrègent au sein des et pour former les plaques de jonction communicante (7). Les jonctions communicantes sont endocytées sous forme de jonctions annulaires (8) et seront soit dégradées par dans le lysosome en passant par des endosomes (11-12) ou des autophagosomes (9bis à 11bis) ou sont dégradées dans le protéasome (9ter). Les connexines peuvent également être recyclées à la membrane depuis les endosomes précoces (10). Figure adaptée de précédentes études (Shivers and McVicar, 1995; Sohl, 2004; Evans et al., 2006; Johnson et al., 2012; Nielsen et al., 2012; Falk et al., 2014)

La **composition en connexines** des hémicanaux et des jonctions communicantes influence leur perméabilité. Leur ouverture permet l'échange rapide molécules et d'ions de taille inférieure à 1kDa. La formation de jonction communicante dépend du type de connexine exprimé. Toutes les connexines ne sont pas compatibles, seules certaines sont capables de former des jonctions communicantes : cela dépend essentiellement de la composition de leurs domaines intra-, extra-cytoplasmiques et l'extrémité C-terminale (Bruzzone et al., 1994). Les connexines sont essentiellement connues pour former des jonctions communicantes qui permettent un couplage entre les cytoplasmes de deux cellules et la transmission rapide d'informations par le biais de l'échange de molécules et d'ions décrits dans le prochain paragraphe « perméabilité et ouverture des connexines ».

Plus récemment, un intérêt grandissant a été porté aux hémicanaux, longtemps considérés comme non fonctionnels, mais dont l'ouverture peut être modulée en condition physiologique ou pathologique. Ces hémicanaux peuvent, en effet, coordonner fonctionnellement différents types cellulaires par le biais de la libération de molécules de signalisation fournies aux cellules environnantes, sans couplage par des jonctions communicantes. Le rôle des connexines dans les fonctions du SNC sera abordé dans le paragraphe « rôle des connexines dans le fonctionnement du SNC » et comprend à la fois les fonctions *hémicanal* et *jonction communicante* mais pourrait aussi faire intervenir des fonctions indépendantes du canal. Des techniques d'analyse permettent d'étudier les fonctions *hémicanal* et *jonction communicante* et sont résumées dans la **Boite 4**.

Boite 4 : techniques d'étude des fonctions des connexines

L'étude des connexines met, la plupart du temps, en œuvre l'utilisation de traceurs fluorescents perméables aux connexines. L'activité *jonction communicante* peut être étudiée par des protocoles de « dye coupling » avec les traceurs biocytine ou « lucifer yellow » dans une pipette d'injection intracellulaire et la mesure du nombre de cellules couplées ; et de « scrap loading dye transfer » correspondant à la déchirure de la membrane cellulaire et l'analyse du transfert intercellulaire du « lucifer yellow » mis dans la solution extracellulaire. L'activité *hémicanal* est plus généralement étudiée par des techniques de « dye uptake » ou capture de traceurs comme le bromure d'éthidium par des cellules en culture ou sur tranche de cerveau. Certaines techniques d'enregistrement électrophysiologique peuvent également être utilisées et permettent d'enregistrer les courants ioniques macroscopiques ou unitaires (Giaume *et al.*, 2012)

ii) Fonctions indépendantes du canal

Cependant les fonctions des connexines vont bien au-delà de leurs fonctions *hémicanal* et *jonction communicante*. Les connexines peuvent exercer leurs effets en tant que protéine elle-même (sans fonction *canal*) ou via ses interactions avec d'autres protéines membranaires ou du cytosquelette.

Des études basées sur des cellules tumorales ont notamment démontré un effet antitumoral des connexines ne dépendant pas de la fonctionnalité des canaux (Zhou and Jiang, 2014). C'est également le cas pour l'implication des connexines dans la différenciation des cellules de la lentille qui dépend de l'expression de la Cx45.6, plus spécifiquement de sa partie C-terminale, et non de sa fonctionnalité en tant que canal (Jiang and Gu, 2005). Les connexines sont également susceptibles d'interagir avec les éléments du cytosquelette. En effet, la Cx43 possède un domaine d'interaction avec l' α - et la β -tubuline : l'interaction des Cx avec les microtubules participerait à leur transport à la membrane. La Cx43 peut également interagir avec l'actine ou la drebrin (pour « *developmentally regulated brain protein* ») stabilisant son expression à la membrane (Dbouk et al., 2009).

De plus, un lien fonctionnel entre certaines connexines et d'autres protéines membranaires a été mis en évidence, notamment dans les cellules de la lentille. Une colocalisation des Cx45,6 et Cx56 avec l'aquaporine-0, et leur interaction par l'extrémité C-terminale, ne modifie pas la fonction de la Cx45,6 mais semble jouer un rôle dans la différenciation des cellules de la lentille (Chanson et al., 2007).

Par ailleurs, une relation fonctionnelle entre les Cx35/Cx36 et les récepteurs ionotropiques au glutamate NMDA a été identifiée : ces deux protéines sont exprimées dans les densités post synaptiques avec une grande proximité (Chanson et al., 2007). Enfin, une co-régulation de l'expression de l'AQP4 et de la Cx43 est observée dans des cultures primaires d'astrocytes murins (Nicchia et al., 2005). En effet, le « knock-down » de l'expression d'AQP4 par des ARN interférant diminue l'expression de la Cx43 et à une diminution du couplage intercellulaire. Ce couplage fonctionnel pourrait être expliqué par le rôle synergique des connexines et des aquaporines dans la régulation des mouvements d'eau et d'ions, essentiels à l'homéostasie du SNC.

B. Perméabilité et ouverture des connexines

La perméabilité et l'ouverture des canaux peut être modulée en contexte physiologique et pathologique. En tant que molécules membranaires, les connexines peuvent être régulées par des facteurs extracellulaires et intracellulaires. La modulation de leur expression et de leur ouverture peut modifier la perméabilité membranaire.

i) Perméabilité et sélectivité des connexines

La perméabilité et la sélectivité des différents types de connexines a été largement étudiée. De nombreuses études ont décrypté les mécanismes modulant la sélectivité et de perméabilité des connexines. Ainsi, la perméabilité et la sélectivité des connexines repose essentiellement sur la taille et la charge des molécules et ions (Nicholson et al., 2000). Les connexines sont plus perméables aux cations qu'aux anions, mais le ratio de perméabilité ou de conductance cation/anion dépend du type de connexine exprimé. Par exemple le ratio de conductance cation/ anion est de 1,3 pour la Cx43 alors qu'il est de 4,5 pour la Cx40 (Harris and Locke, 2009). De même, le diamètre du pore est différent selon les connexines : la Cx43 a un pore plus large que celui de la Cx40 ou de la Cx26 (Harris, 2007).

Les connexines permettent le passage de nombreuses molécules et d'ions résumés ci-dessous :

- Des précurseurs ou des molécules de signalisation comme le NAD⁺ (pour « *nicotinamide adénine dinucléotide* »), les purines comme l'adénosine, l'Adénosine monophosphate cyclique (AMPC), l'adénosine diphosphate (ADP) ou l'ATP, l'IP₃.
- Des métabolites comme le glucose, le glutathion, l'acide ascorbique
- Des nucléotides et microARN (Harris, 2007; Kanaporis et al., 2008; Katakowski et al., 2010)
- Des ions tels que le Ca²⁺ et le K⁺
- De neurotransmetteurs / gliotransmetteurs comme le glutamate, la D-sérine ou l'ATP (Abudara et al., 2018)
- Certaines molécules synthétiques telles que le lucifer yellow, le bromure d'éthidium, la calcéine, le iodo-propidium ou le 2-NDBG (pour « 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxy-D-glucose » un analogue fluorescent du D-glucose).

La régulation du passage peut également faire intervenir des interactions de ces molécules avec le pore du canal lui-même.

ii) Contrôle de l'ouverture

L'**ouverture** des connexines est très régulée par le pH, le voltage ou encore leurs phosphorylations (Eghbali et al., 1990; Barrio et al., 1991) : les connexons sont à l'état ouverts ou fermés (**Figure 12B**). Il a également pu être montré que les différents domaines des connexines participent à la régulation de l'ouverture des canaux. Notamment, l'ouverture régulée par le **voltage** (polarisation membranaire) implique une large partie de la molécule du domaine N-terminal jusqu'à la boucle M2. Alors que la régulation en fonction du **pH** implique la boucle CL et le domaine C-terminal. Par ailleurs, la compatibilité hétérotypique est régulée par la boucle extracellulaire E2. Enfin, l'extrémité C-terminale régule l'ouverture du canal via la phosphorylation d'acide aminés : sérine, thréonine et tyrosines (White & Bruzzone, 1996) et seront décrites plus en détail dans le chapitre « mécanismes de régulation ».

Les **concentrations de Ca²⁺** extra- et intra-cellulaires sont également très impliquées dans la régulation de l'ouvertures des connexines. Notamment, l'ouverture des hémicanaux est déclenchée par une baisse du Ca²⁺ extracellulaire (Giaume et al., 2013). Cela fait intervenir un processus appelé « *loop gating* » du fait de l'interaction des boucles extracellulaires, sites de fixation au Ca²⁺. Ces sites sont spécifique au Ca²⁺ car d'autres cations bivalents, comme le Mg²⁺, n'ont pas le même effet (Nielsen et al., 2012). Le Ca²⁺ intracellulaire serait également important car une augmentation de sa concentration inférieure à 500nM augmenterait l'ouverture des connexines alors qu'une augmentation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire a l'effet inverse (De Vuyst et al., 2009; De Bock et al., 2012). Les cations monovalents comme le K⁺ peuvent également réguler l'ouverture des jonctions communicantes (Roux et al., 2011).

C. Synthèse et trafic intracellulaire des connexines

Les **gènes** codants pour les connexines ont presque tous la même structure et sont composés de deux exons séparés par un intron de taille variable. Les promoteurs sont souvent tissu spécifique et peuvent donc influencer la transcription (Dbouk et al., 2009). Certains facteurs de transcription ubiquitaires peuvent réguler l'expression des connexines tels que Sp1, la protéine activatrice AP-1 (composée des facteurs Jun et Fos) ou l'AMPc (Oyamada et al., 2005). D'autres facteurs de transcription, spécifiques d'un type cellulaire, sont également susceptibles de réguler l'expression des connexines c'est notamment le cas de Mist1 (Rukstalis, 2003), SOX10 (Bondurand, 2001) et du CNTF (Ozog et al., 2004). Les transcrits sont traduits en séquences polypeptidiques par les ribosomes du réticulum endoplasmique et la traduction se termine avec le repliement ayant lieu dans la lumière du réticulum endoplasmique et donnant la structure tridimensionnelle de la connexine (**Figure 12F**). Si la structure de la protéine ainsi traduite n'est pas

conforme elle est dégradée par le protéasome. Les monomères de connexine sont ensuite oligomérisés en hexamères : les connexons. Cette oligomérisation peut avoir lieu à la fois dans le réticulum endoplasmique ou dans l'appareil de Golgi (Evans et al., 2006; Koval, 2006; Nielsen et al., 2012). Les connexons sont ensuite stockés dans l'appareil de Golgi (trans) avant d'être adressés à la membrane. Les connexons exprimés à la membrane et non apposés à d'autres connexons forment les hémicanaux. Puis l'accrétion de nombreux connexons qui s'apposent aux connexons d'une cellule voisine forme les plaques de jonction communicantes (Lauf et al., 2002).

Les connexines sont des protéines membranaires à la **durée de vie** particulièrement courte évaluée à 1 à 5h (Su and Lau, 2014) et variable selon le type cellulaire. Des mécanismes d'endocytose et de dégradation se mettent en place, permettant un renouvellement rapide des connexines. L'endocytose des connexines, et plus particulièrement des jonctions communicantes, se fait par le centre de la plaque donnant naissance à des **jonctions annulaires** (aussi appelés connexosomes). Ces jonctions annulaires sont formées des connexons juxtaposés (n'appartenant pas à la même cellule) qui sont endocytés ensemble pour ensuite être dégradés (Falk et al., 2009). Le devenir de ces jonctions annulaires n'est pas encore totalement élucidé, cependant trois voies principales sont actuellement proposées, et sont plus largement décrites pour la Cx43. Il s'agit des voies endosomales/lysosomales, phago/lysosomales et protéasomales. Deux mécanismes sont susceptibles d'induire l'endocytose de Cx43 i) l'ubiquitination par des ligases d'ubiquitine et ii) la phosphorylation par des kinases. Ces deux modifications post-traductionnelles conduisent à l'endocytose au sein de vésicules de clathrine. Puis, les connexines endocytées sont dirigées soit vers le lysosome/ endosome soit vers l'autophagosome qui fusionne ensuite avec le lysosome (**Figure 12F**). Les connexines ubiquitinées des jonctions annulaires endocytées sont adressées dans la voie endosomale et sont reconnues par les composants du complexe ESCRT (pour « *endosomal sorting complex required for transport* ») qui adressent les protéines ubiquitinées vers les endosomes tardifs. Ceux fusionneront avec le lysosome, empêchant leur recyclage à la membrane (Su and Lau, 2014). Les connexines n'ayant pas été ubiquitinées, mais co-endocytées dans les jonctions annulaires, seront recyclées à la membrane.

D. L'expression tissulaire des connexines

i) Les connexines en périphérie

Étant donné leur rôle essentiel dans les communications intercellulaires, les connexines sont exprimées par la quasi-totalité des cellules de l'organisme chez les mammifères.

Des mutations dominantes des connexines sont notamment responsables de maladies de peau, comme le keratoderme, et d'une perte auditive ou d'une surdité. C'est notamment le cas de mutations du gène codant pour la Cx26 dont l'expression est très élevée dans les cellules de l'oreille interne et dans l'épiderme (Kelsell et al., 2001).

L'**utérus** est aussi l'un des tissus dans lequel le rôle des connexines est bien connu car le myomètre exprime la Cx43, essentielle à la synchronisation des cellules, et permet de coordonner la contraction utérine durant l'accouchement. Il a également été montré que les connexines participent dans la **lactation** : l'expression de Cx43 et Cx26 dans les différents types cellulaires de la glande mammaire permettent une réorganisation du tissu de la glande mammaire et la contraction des cellules musculaires lisses permettant l'éjection du lait (Kidder and Winterhager, 2015). Les connexines sont également essentielles au bon fonctionnement du **cœur**. En effet, le myocarde exprimant essentiellement la Cx43, il a été montré qu'une délétion totale de la Cx43, dans un modèle murin, conduit à la mort de l'animal à la naissance (Lambiase and Tinker, 2015).

Dans le système nerveux périphérique (SNP), les cellules de **Schwann** expriment la Cx32 principalement au niveau du para-nœud, où la myéline n'est pas compacte, ainsi que dans les incisures de Schmidt-Lanterman. Les cellules de Schwann expriment également Cx29 dans les couches profondes de la myéline, proche de l'axone, ainsi que dans les incisures de Schmidt-Lanterman. Du fait de leurs localisations, leurs rôles diffèrent : la Cx32 forme de voies réfléchies intracellulaires entre les différentes couches de myéline, permettant ainsi une communication depuis l'axone vers le cytoplasme des cellules de Schwann (Nagy et al., 2004).

ii) Les connexines du système nerveux central

L'expression des connexines est particulièrement élevée au sein du système nerveux central (**Figure 13, Tableau 2**). Leur identification et leur spécificité dans un type cellulaire donné a été déterminée grâce à l'utilisation de techniques d'imagerie : microscopie confocale, microscopie électronique couplée à un immunomarquage des connexines avec des anticorps couplés à des métaux (tel que l'or, technique appelée « *immunogold* »). Ces diverses techniques montrent la présence de connexines et jonctions communicantes entre différents types cellulaires du SNC (Nagy et al., 2004).

Rappels bibliographiques

Au sein du SNC, les **astrocytes** sont les cellules les plus fortement couplées par des jonctions communicantes qui est 10 à 40 fois supérieur aux autres cellules du SNC. Les Cx43, Cx30 et Cx26 ont été identifiées dans les astrocytes matures exprimant la GFAP et l'AQP4. Ces connexines forment également des hémicanaux à la membrane des astrocytes (Giaume et al., 2013). En ce qui concerne leur distribution dans le SNC, la Cx43 et la Cx30 sont toutes deux exprimées dans la substance grise alors que seule la Cx43 est exprimée dans la substance blanche. La Cx26 est, quant à elle, retrouvée dans quelques régions sous corticales mais à un très faible niveau d'expression (Li et al., 2014). Les astrocytes forment entre eux des jonctions communicantes (plus de 4000 par astrocyte) dont la grande majorité est de type homotypique. Les Cx30 et Cx26 sont également exprimées au sein des jonctions communicantes entre astrocytes (Rash et al., 2001).

L'**oligodendrocyte** exprime trois types de connexines, les Cx47, Cx32 et Cx29 (Rash et al., 2001; Li et al., 2014). Ces connexines ne sont pas exprimées de la même façon dans toutes les régions du SNC ni au même niveau de la cellule. La Cx29 est retrouvée à la membrane interne de fines gaines de myéline alors que la Cx32 est située au niveau de la membrane externe de larges gaines de myéline et entre les différentes couches de myéline au niveau des paranœuds. La Cx47, principale connexine oligodendrocytaire, est principalement exprimée dans le corps cellulaire et dans quelques prolongements. Les oligodendrocytes forment des jonctions communicantes de type homotypiques.

Etant donné que les astrocytes et les oligodendrocytes expriment des connexines de type différent, les jonctions communicantes entre astrocyte et oligodendrocyte sont hétérotypiques. La Cx47 oligodendrocytaire forme des jonctions communicantes avec la Cx43 ou la Cx30 mais pas avec la Cx26 astrocytaires. La Cx32 oligodendrocytaire forme des jonctions communicantes avec la Cx30 ou la Cx26 mais pas avec la Cx43 astrocytaires. Ainsi, le **couplage astrocyte-oligodendrocyte** reposerait principalement sur des jonctions communicantes Cx43/Cx47 et Cx30/Cx32 (Abrams and Rash, 2009). De plus des jonctions communicantes dites « réfléchies » ou « autologues » sont formées au sein d'une même cellule ou entre différentes couches de myéline. Il a été démontré que la Cx32 forme des hémicanaux, la présence d'hémicanaux de Cx29 et Cx47 reste cependant hypothétique (Giaume et al., 2013).

L'étude du **couplage intercellulaire** dans des modèles de KO des connexines astrocytaires et oligodendrocytaires a montré la participation des différentes connexines dans le couplage intercellulaire. Notamment le KO de la Cx47 diminue de 78% le couplage entre oligodendrocytes alors que les KO Cx29 ou Cx32 ne le modifient pas ou peu. De plus, le double KO de la Cx47 et de la Cx32 conduit à l'abolition du couplage entre oligodendrocytes (Maglione et al., 2010). La délétion de Cx43 conduit à une baisse de 50%

Rappels bibliographiques

du couplage astrocytaire (Theis et al., 2003) et le KO de la Cx30 à une baisse de 22% du couplage astrocytaire (Gosejacob et al., 2011). Le KO de la Cx43 dans l'astrocyte combiné au KO global de la Cx30 conduisait à une perte totale de couplage entre les astrocytes et à une très importante diminution du couplage entre astrocytes et oligodendrocytes et entre oligodendrocytes (Wallraff, 2006; Maglione et al., 2010)

Les **cellules microgliales** expriment les Cx32 et Cx36 à l'état de repos et n'expriment la Cx43 et la Cx29 qu'à l'état activé. L'expression des Cx32 et Cx36 est également augmentée chez les microglies activées. Mais aussi, les cellules microgliales activées sont couplées par des jonctions communicantes de Cx43 (Gajardo-Gómez et al., 2016).

Les **neurones** expriment de nombreuses connexines. Les Cx35 et Cx34.7 ont été les premières clonées, et sont identifiées dans les cellules bipolaires et les fibres nerveuses. Les neurones du SNC expriment principalement les Cx36, Cx45 et dans une moindre mesure la Cx50 (Vicario et al., 2017). Les ARN messagers codant pour les Cx36, Cx37, Cx40, Cx43 ainsi que l'expression protéique des Cx40, Cx43 et Cx45 ont été détectées dans les motoneurones de la moelle épinière, mais ceux-ci ne présentent pas de couplage intercellulaire. Aussi l'expression des Cx26, Cx32 et Cx43 a été démontrée par immunocytochimie par certaines équipes mais n'a pas été retrouvée par d'autres (Abrams and Rash, 2009). Les neurones forment entre eux des jonctions communicantes, composées de Cx36 et Cx45 (Rash et al., 2001; Abrams and Rash, 2009). Cependant, le couplage entre cellules gliales et neurones reste encore à démontrer (Abrams and Rash, 2009).

Dans les vaisseaux, les cellules **endothéliales** expriment principalement les Cx37, Cx40 et Cx43 (Zhao et al., 2018). Les Cx37 et Cx40 sont fortement exprimées dans les artères et artérioles alors que la Cx43 est plus exprimée dans des régions associées à des flux sanguins turbulents. Les Cx40 et Cx43 sont capables de former des jonctions communicantes et sont associées à des protéines des jonctions dans les complexes jonctionnels entre cellules endothéliales.

Les neurones et les cellules gliales expriment également des pannexines (**Boite 5, Figure 13 et Figure 14**) qui participent également aux communications intercellulaires.

Rappels bibliographiques

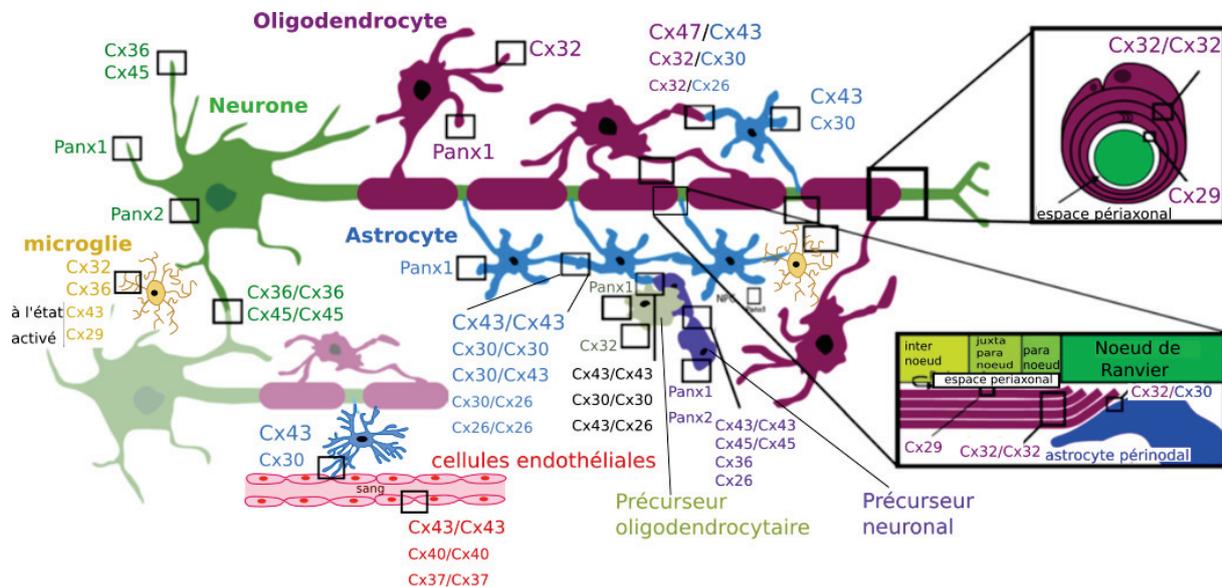


Figure 13 : Expression des connexines et pannexines et la formation de jonctions communicantes entre cellules du SNC. Les connexines sont largement exprimées par toutes les cellules gliales, les neurones, les précurseurs ainsi que les cellules endothéliales. Les astrocytes expriment les Cx43, Cx30 et Cx26 dans une moindre mesure. Les oligodendrocytes expriment les Cx47, Cx32 et Cx29 et leur expression est différente au niveau du corps cellulaire, de la myéline ou de l'espace périaxonale. Les cellules microgliales expriment les Cx32 et Cx36 à l'état quiescent, mais aussi les Cx43 et Cx29 à l'état activé. Les neurones expriment principalement les Cx36 et Cx45. Les cellules endothéliales expriment les Cx43, Cx40 et Cx37 et leur expression varie selon le type de vaisseau. Les astrocytes, oligodendrocytes et cellules microgliales expriment la pannexine 1 et les neurones expriment les pannexines 1 et 2. Schéma modifié de Swayne and Bennett, 2015

Rappels bibliographiques

Type cellulaire	Astrocyte	Oligodendrocyte	Neurone	Microglie	Cellule endothéliale
Type de connexine	Cx43	Cx47	Cx36	Cx32	Cx43
	Cx30	Cx32	Cx45	Cx36	Cx40
	Cx26	Cx29	Cx50	Cx43°	Cx37
			Cx40*	Cx29°	
			Cx43*		

Tableau 2 : Expression des principales connexines dans cellules du SNC. * : expression démontrée dans les motoneurons de la moelle épinière. ° : expression par les microglies à l'état activé.

Boite 5 : Les pannexines : un cousin des connexines

Les pannexines sont les équivalents chez les mammifères des innexines exprimées chez les invertébrés. Elles s'assemblent sous forme hexamérique, comme les connexines, ou octamérique et forment des canaux à la membrane appelés pannexons qui ont des propriétés similaires aux hémicanaux de connexine (**Figure 14**). Il existe trois membres de la famille des pannexines : les pannexines 1 à 3. La pannexine 1 est la plus largement exprimée dans le SNC dans les neurones et les cellules microgliales mais aussi par les astrocytes et oligodendrocytes. La pannexine 2 est exprimée uniquement par les neurones (Abudara *et al.* 2018 ; Swayne and Bennett, 2015). A l'inverse des hémicanaux, composés de connexines, les pannexons sont fonctionnels au potentiel membranaire de repos. Par ailleurs, les pannexons ne sont pas régulés par la concentration extracellulaire en calcium et peuvent être ouverts en conditions physiologiques alors que les hémicanaux nécessitent une diminution de la $[Ca^{2+}]$ extracellulaire pour être fonctionnels.

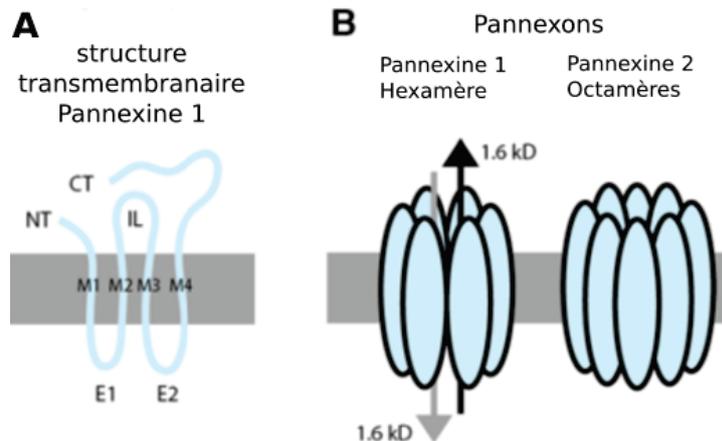


Figure 14 : Structure des pannexines. **A)** Les pannexines sont des molécules transmembranaires composées d'extrémités N- et C-terminales intracellulaires, de 4 segments transmembranaires (M1 à M4) de deux boucles extracellulaires (E1 et E2) et d'une boucle intracellulaire (IL). **B)** La pannexine 1 s'assemble sous forme hexamérique et la pannexine 2 sous forme octamérique pour former un canal à la membrane (pannexon) responsable de l'échange de petites molécules de taille inférieure à 1,6kDa. Schéma issu de Swayne and Benett, 2015.

En conclusion, au sein du SNC, les cellules gliales sont très fortement couplées par les connexines et forment un réseau neuroglial. Ainsi, des mécanismes de régulation, de l'expression et de la fonction des connexines sont mis en place afin de maintenir la fonctionnalité du réseau neuroglial.

E. Mécanismes de régulation

La régulation de l'expression et de la fonction des connexines est très complexe et implique de nombreux mécanismes divers comme la régulation de la transcription, les modifications post-traductionnelles ou encore certains facteurs extra et intracellulaires. Tous ces mécanismes peuvent intervenir à la fois sur l'expression, la présence à la membrane et l'ouverture des connexines. Elles ont fait l'objet de nombreuses études que nous allons résumer dans ce chapitre.

i) Les modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles sont courantes et ont pour but de moduler la fonction d'une protéine, les connexines n'y font pas exception. Elles peuvent en effet être phosphorylées, glycosylées, nitrosylées, ubiquitinées. Les effets de ces différentes modifications post-traductionnelles sont divers et résumés ci-dessous.

Phosphorylation

La phosphorylation est peut-être la modification post-traductionnelle des connexines la plus courante et la plus étudiée. Elle consiste en l'ajout d'un groupement phosphate sur un site de phosphorylation qui peut être une Serine (S), Thréonine (T) ou une Tyrosine (Y) au niveau de l'extrémité C-terminale, par le biais d'une kinase. Cela conduit à une modification du caractère hydrophobique, de la charge et de la structure de la protéine pouvant impacter sa fonction. L'étude de la phosphorylation des connexines a permis de montrer son implication dans l'oligomérisation, le trafic cellulaire, l'insertion à la membrane (avec ou sans agrégation dans les jonctions communicantes), les fonctions (*hémicanal* et *jonction communicante*) et l'internalisation des connexines. La phosphorylation peut avoir lieu à différentes étapes du cycle de vie de la connexine : durant sa synthèse au sein du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, pendant son transport ou une fois insérée à la membrane. C'est également le cas de la déphosphorylation impliquant des phosphatases.

Concernant la Cx43, la plus largement exprimée chez les mammifères, 21 sites de phosphorylation ont été identifiés : dont deux tyrosines impliquant la protéine kinase Src et 19 sérines impliquant les protéines kinases C (PKC), A (PKA) et G (PKG), la « *calcium/calmoduline-dependent kinase II* » (CAMKII), la caséine kinase 1 (CK1) et la « *mitogen-activated protein kinase* » (MAPK) (Axelsen et al., 2013) (**Figure 15A**). Dans le cerveau les phosphorylations des Sérines 325, 328, 330, 365 et 368 ont été identifiées (Márquez-Rosado et al., 2012) et ont des effets différents sur l'expression et la fonction de la Cx43. En effet, en général la phosphorylation par CK1 induit une augmentation de l'activité *jonction communicante* alors que la phosphorylation par la PKC induit une diminution de l'activité *jonction communicante* (Johnstone et al., 2012). En effet, la phosphorylation de la sérine 365 conduit permet la phosphorylation des sérines 325, 328 et/ou 330 qui permettent une augmentation de l'activité *jonction communicante* alors que la phosphorylation de la sérine 368 par la PKC conduit à une diminution de l'agrégation et de l'activité des jonctions communicantes (Solan and Lampe, 2005, 2009) (**Figure 15B et C**)

Rappels bibliographiques

A

Extrémité C-terminale Cx43
aa 227-382

Ser325, 328 & 330 : CK1

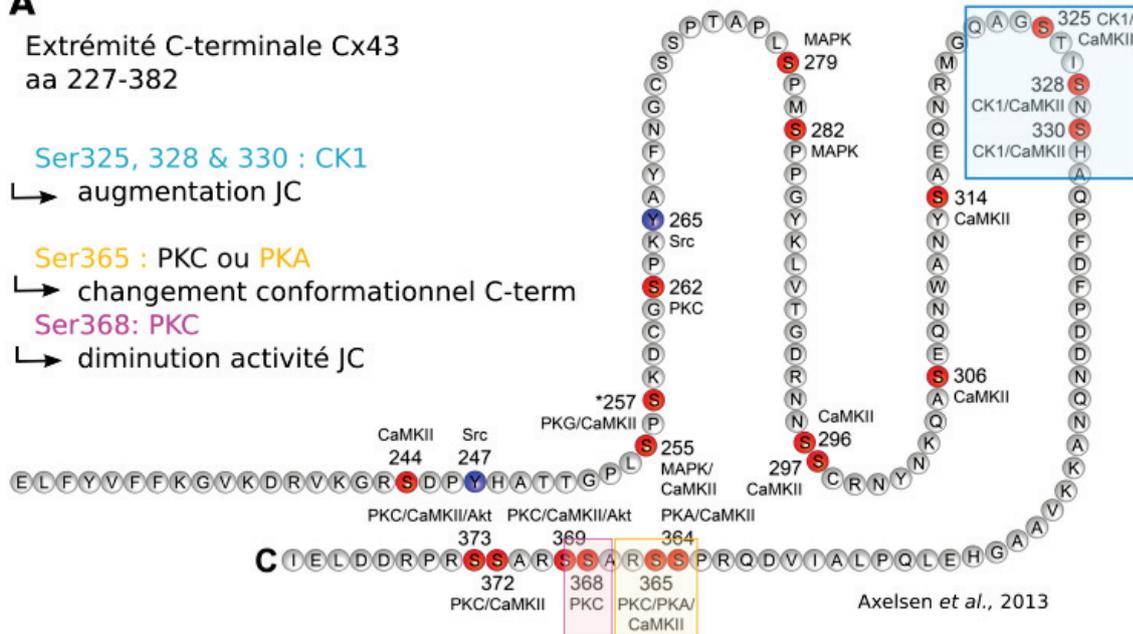
↳ augmentation JC

Ser365 : PKC ou PKA

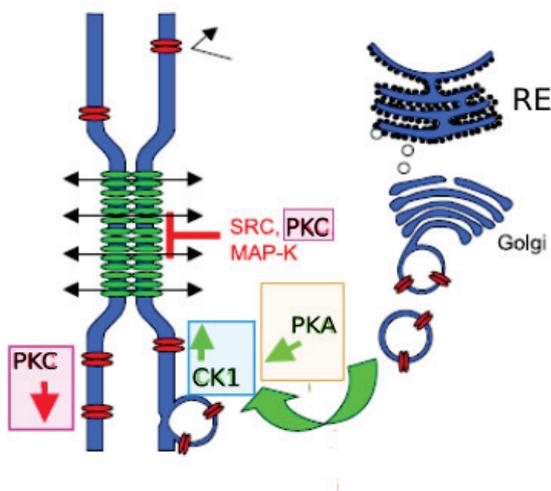
↳ changement conformationnel C-term

Ser368: PKC

↳ diminution activité JC

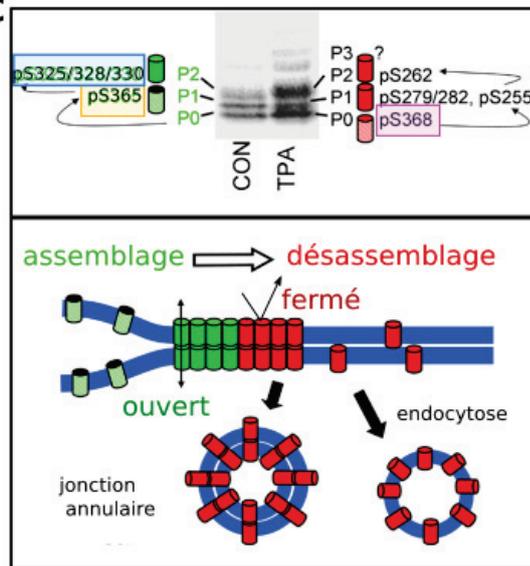


B



Solan and Lampe, 2005

C



Solan and Lampe, 2009

Figure 15 (légende ci-contre)

Figure 15 : Sites de phosphorylation de la Cx43 et effets sur sa fonction. A) La Cx43 peut être phosphorylée sur 21 sites dont 5 principaux ont été identifiés dans le cerveau. Les sérines 325, 328 et 338 sont phosphorylées par la CK1 et leur phosphorylation est associée à une augmentation du couplage par les jonctions communicantes (JC). Les sérines 365 et 368 sont principalement phosphorylées par la PKC bien que la sérine 365 puisse être phosphorylée par la PKA dans une moindre mesure. La phosphorylation de la sérine 365 conduit à une modification de la conformation de l'extrémité C-terminale favorisant la phosphorylation d'autres résidus et celle de la sérine 368 à une diminution de l'activité jonction communicante. Schéma adapté de Axelsen *et al.*, 2013 et complété avec les informations de Marqués-Rosado *et al.*, 2012 et Johnstone *et al.* 2012. **B)** La phosphorylation de Cx43 par la PKA conduit à la phosphorylation par la CK1 et à une augmentation de l'agrégation au sein des plaques de jonction communicantes. En revanche la phosphorylation par la PKC conduit à une diminution d'agrégation et une diminution du couplage par jonctions communicantes. **C)** En condition physiologique (CON) la phosphorylation de la sérine 365 conduit à la phosphorylation des sérines 325, 328 et/ou 330 qui permettent l'assemblage en jonctions communicantes et l'ouverture des canaux (schéma adapté de Solan and Lampe, 2005). La stimulation de la PKC par le 12-O-Tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) induit une phosphorylation de la sérine 368 qui conduit à d'autres phosphorylations qui aboutissent à une fermeture des canaux et à leur endocytose sous forme de jonction annulaire ou sous forme unitaire (schéma adapté de Solan and Lampe, 2009).

Pour les autres connexines, les sites de phosphorylation ont été identifiés mais leur rôle reste méconnu. C'est notamment le cas de la Cx26 qui a une extrémité C-terminale très courte et dont les sites de phosphorylation ont été identifiés au niveau de l'extrémité N-terminale, de la boucle intra-cytoplasmique et la boucle extra-cytoplasmique E2. Tout comme la Cx26, la Cx32 possède des sites de phosphorylation au niveau de l'extrémité N-terminale ainsi qu'à l'extrémité C-terminale mais leurs effets n'ont pas été identifiés.

Ubiquitination

L'ubiquitination consiste en l'ajout d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine, un polypeptide de 76 acides aminés, à une protéine cible au niveau d'un ou plusieurs résidus de lysines (Johnstone *et al.*, 2012). L'ubiquitination d'une protéine est généralement associée au trafic cellulaire et plus particulièrement l'adressage au protéasome. L'ubiquitination fait intervenir divers enzymes dont l'E1 enzyme d'activation de l'ubiquitine, l'E2 enzyme de conjugaison de l'ubiquitine et l'E3 la ligase d'ubiquitine. Une seule ubiquitine ou une chaîne d'ubiquitine peuvent être ajoutées à une protéine. Deux résidus de lysine

peuvent être ubiquitinés chez les connexines, les lysines 9 et 303, et leur ubiquitination peut être déclenchée à différentes étapes du cycle de vie d'une connexine. Dès sa synthèse, en cas de mauvais repliement, la protéine est ubiquitinée et adressée au protéasome pour dégradation. Une fois intégrée à la membrane, et dans des plaques de jonction communicante, l'ubiquitination provoque son endocytose et sa dégradation par le lysosome (Axelsen et al., 2013). La phosphorylation favorisant l'interaction des connexines avec la ligase d'ubiquitine Nedd4 (Leykauf 2006), l'ubiquitination associée à la phosphorylation est un signal conduit à l'adressage des connexines dans le protéasome ou le lysosome pour y être dégradées (Falk et al., 2014).

SUMOylation

La SUMOylation est une modification post-traductionnelle moins connue qui consiste en l'ajout de « small ubiquitin-like modifiers », (SUMO) faisant partie d'une famille de protéine « ubiquitin-like » qui sont capables de se lier à une lysine. La SUMOylation est un processus très proche de l'ubiquitination mais dont les effets sont très différents car ils n'induisent pas forcément une dégradation de la protéine cible dans le protéasome. Il a notamment été montré qu'elle participait à de nombreux processus tels que la transcription, la traduction ou encore le trafic cellulaire de protéines (Flotho and Melchior, 2013). Deux sites de SUMOylation ont été identifiés chez la Cx43 : les lysines 144 et 237, au niveau de la boucle intracellulaire et de l'extrémité C-terminale respectivement. Le remplacement de ces lysines par des arginines conduit à une réduction de l'expression de la Cx43 ainsi qu'à une augmentation de la présence de cette protéine dans la fraction soluble suggérant une réduction de la formation de jonctions communicantes (Kjenseth et al., 2012). Cependant les mécanismes restent méconnus et l'identification du compartiment dans lequel a lieu la SUMOylation pourrait permettre de comprendre comment celle-ci affecte le trafic intracellulaire de la Cx43.

Nitrosylation

La S-nitrosylation est une modification post-traductionnelle mettant en jeu l'oxyde nitrique (NO) qui peut se lier à la fonction thiol d'une cystéine réactive et produire un S-nitrosothiol. L'effet du NO sur les hémicanaux et les jonctions communicantes a d'abord été étudié dans le système vasculaire et a permis de montrer que le NO diminue le couplage des jonctions composées de Cx37 dans les cellules endothéliales microvasculaires (McKinnon et al., 2009). Dans les cellules de la jonction myoendothéliale, l'expression de Cx43 est augmentée et celle-ci est constitutivement nitrosylée au niveau de la cystéine 271 : la dé-nitrosylation diminue le couplage à la jonction myoendothéliale (Straub et al., 2011). Enfin la S-nitrosylation a aussi un effet sur les hémicanaux astrocytaires composés de Cx43 : l'inhibition métabolique

des astrocytes corticaux provoque à la fois une déphosphorylation de la Cx43 mais aussi une S-nitrosylation, conduisant à une augmentation de l'ouverture des hémicanaux (Retamal et al., 2006).

Glycosylation

La Glycosylation est une modification post-traductionnelle ayant lieu dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi et qui consiste en l'ajout d'un glucide à une protéine qui sera alors dite glycosylée. Il existe deux types de glycosylation : i) la N-glycosylation qui consiste à l'ajout d'un sucre sur une asparagine et la ii) O-glycosylation qui consiste en l'ajout d'un sucre sur une sérine ou une thréonine. La glycosylation peut affecter la structure tridimensionnelle, le trafic intracellulaire, la stabilité d'une protéine ainsi que ses interactions avec ses partenaires. Seule la glycosylation de la Cx43 a été démontrée et son inhibition induit une augmentation de son expression membranaire. Elle provoque également la phosphorylation de la Cx43 et une augmentation de son ouverture via la voie de l'AMP cyclique (Wang and Rose, 1995; Wang et al., 1995).

Méthylation et acétylation

L'épigénétique consiste en la modification de la transcription de certains gènes et notamment par le biais de méthylation de l'ADN ou par l'acétylation des protéines d'histones. Cependant ces modifications peuvent directement affecter d'autres protéines comme les connexines. En effet six sites de méthylation ont été détectés par spectrométrie de masse sur la Cx26. Un de ces sites est l'arginine 75, qui par mutation donne lieu à des canaux non fonctionnels (Axelsen et al., 2013).

ii) Facteurs extrinsèques régulant les fonctions des connexines dans le SNC

En plus de facteurs intrinsèques, de nombreux facteurs présents dans l'environnement sont susceptibles de modifier l'expression et les fonctions *hémicanal* et *jonction communicante* des connexines dans le SNC. Ces facteurs peuvent provenir des cellules environnantes ou de cellules infiltrantes et peuvent à la fois être impliqués en condition physiologique (facteurs de croissance, cytokines anti-inflammatoires) ou pathologique (neuroinflammation, hypoxie ischémie ...).

Cytokines et facteurs de croissance

Les cytokines et les facteurs de croissance peuvent moduler l'expression et la fonction des connexines. Dans le SNC, l'activité des connexines est modulée par les **cytokines proinflammatoires** telles que l'IL-1 β et le TNF- α qui, combinées, réduisent drastiquement l'activité jonction communicante mais augmentent l'activité hémicanal (Hinkerohe et al., 2005; Même et al., 2006; Retamal et al., 2007a; Froger et al., 2009,

2010; Orellana et al., 2013). De la même façon l'IL-6, le TNF- α et le TGF- β 3 et l'IFN- γ diminuent également le couplage intercellulaire via les jonctions communicantes et ce plus efficacement si elles sont combinées (Reuss and Unsicker, 1998; Mème et al., 2006; Guo et al., 2007; Retamal et al., 2007a; Haghikia et al., 2008; Froger et al., 2009). Ces effets peuvent être bloqués par la présence de **cytokines anti-inflammatoires** telles que le TGF- β 1 et l'IFN- β (Robe et al., 2000; Hinkerohe et al., 2005).

Par ailleurs, les **facteurs de croissances** sont également capables de réguler les fonctions des connexines. Le FGF-2, qui participe à la différenciation et la survie des cellules gliales et des neurones, diminue le couplage intercellulaire (Reuss and Unsicker, 1998; Reuss et al., 2000). Le FGF-1 augmente l'activité hémicanal alors que le FGF-2 et l'EGF (pour « *epidermal growth factor* ») la diminuent (Morita et al., 2007; Garre et al., 2010).

Purines et neurotransmetteurs

L'**ATP** extracellulaire peut activer des récepteurs purinergiques métabotropiques (P2Y) ou ionotropiques (P2X) qui ont la capacité de moduler les communications intercellulaires entre neurones et cellules gliales. Ainsi il a été montré qu'en se fixant à des récepteurs métabotropiques, l'ATP réduit l'activité jonction communicante entre astrocytes (Enkvist and McCarthy, 1992; Mème et al., 2004). Cet effet peut être bloqué par des antagonistes des récepteurs P2Y mais pas P2X. De plus l'ATP augmente l'activité hémicanal par l'activation des récepteurs P2Y et P2X (Baroja-Mazo et al., 2013). La libération d'ATP pourrait aussi provenir d'une augmentation de l'activité de la pannexine-1 (Orellana et al., 2011). Une autre purine, l'**AMPC**, modifie l'expression des connexines en augmentant la formation de jonction communicantes soit par une augmentation de l'expression soit par une redistribution membranaire (Oyamada et al., 2005).

La **dopamine**, un neurotransmetteur modulant les synapses excitatrices dans de nombreuses régions cérébrales, est également capable de diminuer le couplage cellulaire entre neurones comme entre les cellules horizontales de la rétine (Piccolino et al., 1984). La réduction du couplage entre neurones par le **GABA**, principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC, a été démontrée dans la région hypothalamique (Park et al., 2011). Enfin, l'effet du **glutamate**, principal neurotransmetteur excitateur du SNC, sur les fonctions des connexines a été largement étudié. Le glutamate, ou les agonistes des récepteurs au glutamate, augmentent les activités *hémicanal* et *jonctions communicantes* dans les neurones et les astrocytes (Kristian Enkvist and McCarthy, 1994; Blomstrand et al., 1999; Rouach et al., 2000; Takahashi et al., 2010). Aussi, le glutamate pourrait participer à la libération d'ATP (De Vuyst et al., 2009) par les

hémicanaux : ce mécanisme serait impliqué dans la propagation de vagues calciques entre astrocytes. (Torres et al., 2012).

Stress oxydant

Les radicaux libres comme les **espèces réactives de l'oxygène**, peuvent aussi altérer les fonctions des connexines. Par exemple, le peroxyde d'hydrogène augmente l'activité *jonction communicante* entre astrocytes (Rouach et al., 2004) alors que l'oxyde nitrique la diminue (Ball et al., 2011). Mais aussi l'acide arachidonique et l'oxyde nitrique augmentent l'activité *hémicanal* de la Cx43 (De Vuyst et al., 2009).

En conclusion, de nombreux facteurs extracellulaires et intracellulaires peuvent réguler la fonction des connexines dans des contextes physiologiques, de manière région-dépendante, et peuvent être dérégulés en contexte pathologique.

F. Rôles des connexines dans le fonctionnement du SNC

Les connexines sont impliquées dans de très nombreux processus du SNC car elles sous-tendent le réseau neuroglial et les communications entre cellules gliales et neurones, que ce soit durant le développement ou à l'âge adulte.

i) Expression et rôle des connexines durant le développement du SNC

Durant le **développement**, les cellules progénitrices, les neuroblastes et les cellules en prolifération sont fortement couplées par des connexines (Bruzzone and Dermietzel, 2006). Ainsi, il existe des oscillations calciques entre les cellules de la zone sous ventriculaire (ZSV) permettant la coordination et la régulation de la prolifération des précurseurs neuraux (Maeda and Tsukihara, 2011).

Les hémicanaux sont nécessaires à l'initiation de vagues calciques en libérant de l'ATP qui, en activant les récepteurs purinergiques (P2Y), permet la propagation de ces vagues calciques entre les cellules de la glie radiale et participe à la prolifération de précurseurs neuronaux (Weissman et al., 2004) (**Figure 16A**).

Les jonctions communicantes participent à la synchronisation des activités cellulaires entre les cellules faisant partie d'un même domaine fonctionnel (Bittman et al., 1997; Swayne and Bennett, 2016). En effet, les jonctions communicantes sont une voie privilégiée pour l'échange de petites molécules de signalisation tels que l'inositol tri-phosphate (IP3) et la propagation de vagues calciques qui participeraient à la division asymétrique et à la différenciation des précurseurs neuronaux (Yuste et al., 1995; Kandler and Katz, 1998;

Rappels bibliographiques

Swayne and Bennett, 2016) (**Figure 16B**). Les connexines pourraient également avoir une activité indépendante de la fonctionnalité du canal comme des propriétés d'adhésion, régulant la migration cellulaire (Elias et al., 2007, 2010; Elias and Kriegstein, 2008; Qi et al., 2016).

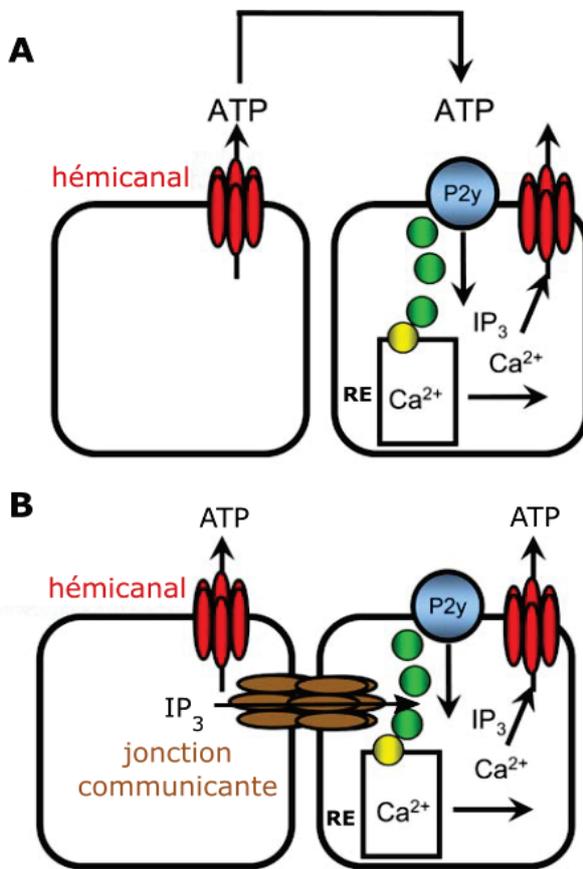


Figure 16 : Modèle hypothétique de communication intercellulaire durant la neurogénèse. **A)** Dans les phases précoces du développement, les hémicanaux de connexines initieraient des vagues calciques via la libération d'ATP qui en se fixant aux récepteurs purinergiques métabotropiques des cellules voisines déclencherait la production d'IP₃ provoquant la sortie de Ca²⁺ du RE. Puis l'IP₃ ou le Ca²⁺ déclencherait l'ouverture des hémicanaux, la libération d'ATP, et ainsi de suite. Ce mécanisme serait impliqué dans la coordination du cycle cellulaire. **B)** Plus tardivement durant le développement, les hémicanaux et les jonctions communicantes participeraient, ensemble, à la propagation de vagues calciques au sein des cellules précurseur coordonnant leur migration et favorisant la division asymétrique. Schéma adapté de Bruzzone and Dermietzel, 2006

L'expression spatio-temporelle des connexines gliales et neuronales évolue au cours du développement jusqu'à l'âge adulte (**Figure17**).

En effet, une étude de Nadaraj et collaborateurs a montré, chez le rat, que les **connexines astrocytaires** Cx26 et Cx43 sont exprimées dès les stades embryonnaires E12 et que leur expression augmente jusqu'à E16 puis diminue à E19 (Nadarajah et al., 1997). Après la naissance, l'expression de la Cx26 augmente transitoirement jusqu'à P14 puis diminue alors que l'expression de la Cx43 augmente. Cette balance d'expression a été confirmée par d'autres études : expression de la Cx43 et absence de Cx26 aux stades P7 à P21 et à l'âge adulte dans le Locus Coeruleus (Van Bockstaele et al., 2004) ; expression embryonnaire

aux stades E14 à E18 de la Cx26 et de la Cx43 dans le cortex (Cina et al., 2007). La Cx30, une autre connexine astrocytaire, n'est pas exprimée aux stades embryonnaires (Cina et al., 2007). *In vitro*, l'expression de la Cx30 est plus tardive que celle de la Cx43 et nécessite la présence de neurones (Koulakoff et al., 2008; Wan et al., 2013). Mais aussi, les Cx43 et Cx30 sont exprimées par les précurseurs impliqués dans la neurogénèse adulte (Liebmann et al., 2013; Swayne and Bennett, 2016).

Les **connexines neuronales**, Cx36 et Cx45, sont fortement exprimées dans le cortex aux stades embryonnaires E14 à E18 (Cina et al., 2007). L'expression spatio-temporelle de ces connexines suit un schéma différent des connexines astrocytaires. La Cx45, comme la Cx26 astrocytaire, est exprimée dans la ZSV mais également dans la plaque corticale alors que la Cx36, comme la Cx43 astrocytaire, est fortement exprimée dans la ZSV mais moins dans la plaque corticale (Van Bockstaele et al., 2004; Cina et al., 2007; Elias et al., 2007). L'expression de la Cx36 devient entièrement neuronale au cours du développement, son rôle dans la différenciation neuronale a été démontré *in vitro* (Hartfield et al., 2011). De plus, son expression est stable entre P7 et l'âge adulte (Van Bockstaele et al., 2004). L'expression de la Cx45 est dynamique, dans le mésencéphale et la substance noire. Elle est d'abord augmentée entre E16 et E18 puis diminuée entre E18 et P0 et enfin stable entre P0 et l'âge adulte (Leung et al., 2002). Dans la moelle épinière, la Cx36 est exprimée par 90% des motoneurones pendant le développement et à l'âge adulte alors que l'expression de la Cx45 diminue après la naissance et environ 50% des motoneurones l'expriment à l'âge adulte (Chang et al., 1999).

L'expression des **connexines oligodendrocytaires** durant le développement évolue en suivant leur stade de différenciation et la mise en place de la myélinisation. Notamment, la Cx32 n'est pas exprimée aux stades embryonnaires mais son expression augmente après la naissance dès P7 (Nadarajah et al., 1997; Van Bockstaele et al., 2004; Cina et al., 2007). Chez les précurseurs oligodendrocytaires, l'expression de la Cx47 est très importante alors que les Cx29 et Cx32 ne sont pas ou très peu exprimées. Puis durant la différenciation en oligodendrocytes matures puis durant la myélinisation l'expression de la Cx47 diminue et l'expression des Cx32 et Cx29 augmente. La formation de jonctions communicantes hétérotypiques ou homotypiques débute un peu avant la mise en place de la myélinisation suggérant leur implication dans la myélinisation.

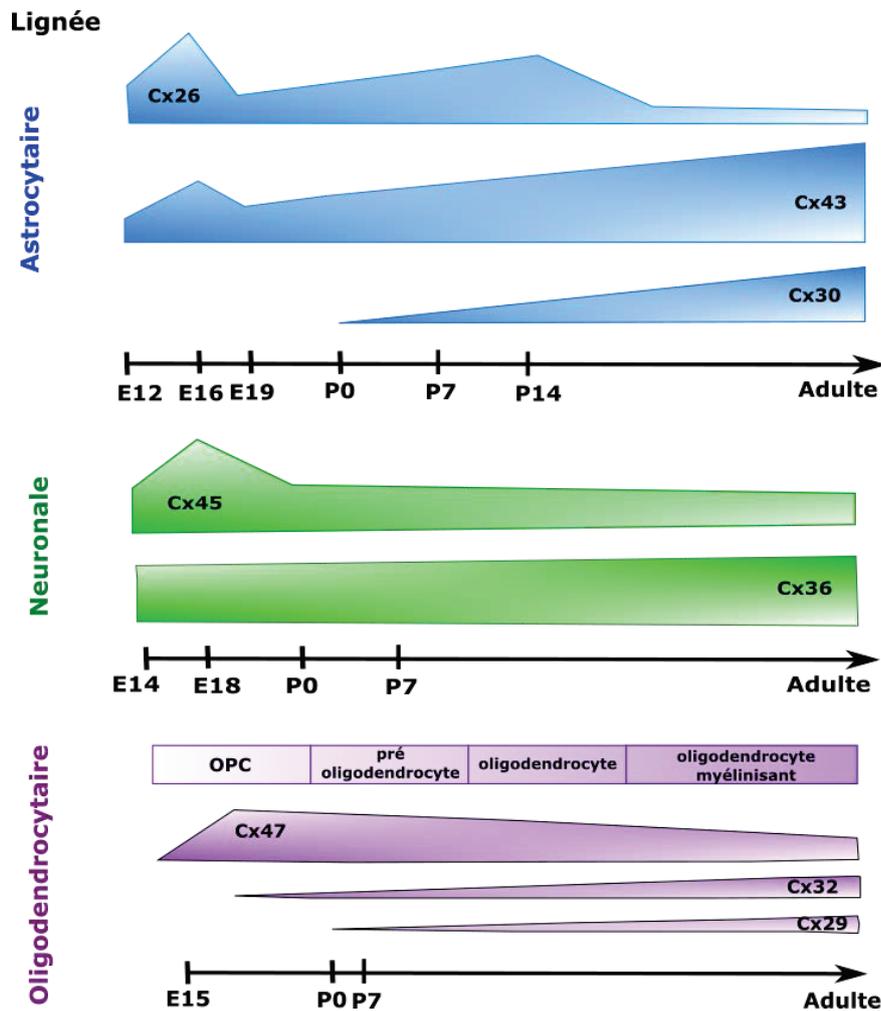


Figure 17 : Evolution de l'expression des connexines au cours du développement du SNC : des lignées astrocytaires (Cx26, Cx43 et Cx30), neuronales (Cx45, Cx36), et oligodendrocytaires (Cx47, Cx32 et Cx29) des stades embryonnaires E12-E19, post-natal P0-P14, jusqu'à l'âge adulte. Figure adaptée à partir de Li *et al.* 2014 et complétée avec les informations de Nadaraj *et al.*, 1997 ; Von Bockstaele *et al.*, 2004 ; Cina *et al.*, 2007 ; Leung *et al.*, 2002 ; Chang *et al.*, 1999.

ii) Réseau astrocytaire et réseau neuroglial

Les connexines jouent un rôle particulièrement important dans les **communications cellulaires**, inter-astrocytaires et celles avec les autres cellules gliales et les neurones. Comme évoqué précédemment, les astrocytes sont très fortement connectés les uns aux autres via des jonctions communicantes. Les astrocytes sont également présents au sein de l'unité neuro-glio-vasculaire, à la synapse, au nœud de Ranvier et communiquent également avec les oligodendrocytes. Ainsi, ils sont une voie privilégiée de

communication entre tous ces acteurs, connectés dans un réseau neuroglial pour assurer la régulation de l'homéostasie du SNC. Une parfaite synchronisation spatio-temporelle entre les différents acteurs est requise. Les astrocytes sont organisés sous forme de réseaux dont les secteurs sont bien distincts et ne se recouvrent pas (Sofroniew and Vinters, 2010). C'est au sein de ces réseaux que sont propagées des vagues calciques, permettant la transmission de signaux à longue distance dans le SNC par une communication de large réseaux astrocytaires (Cornell-Bell et al., 1990; Scemes and Giaume, 2006). Comme nous l'avons évoqué, les connexines sont impliquées dans la propagation de ces vagues calciques, les inhibiteurs de connexines réduisant fortement les augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ entre cellules voisines (Giaume and Venance, 1998; Scemes and Giaume, 2006).

Le réseau neuroglial et homéostasie du potassium : Le réseau neuroglial, établi par les connexines est également impliqué dans la régulation des concentrations en K^+ . En effet, comme expliqué précédemment, le K^+ libéré durant l'activité neuronale peut être délétère pour le maintien de l'excitabilité neuronale et la propagation saltatoire des potentiels d'action le long des axones myélinisés. Le mécanisme de K^+ «*spatial buffering* » est ainsi essentiel pour le fonctionnement neuronal (Rash, 2010). Ce mécanisme repose sur deux conditions i) les cellules gliales doivent former un réseau par lequel les mouvements de K^+ doivent pouvoir se propager sur de longues distances, et ii) ces cellules doivent être très perméables au K^+ pour permettre l'entrée et la sortie de celui-ci à travers la membrane plasmique (Kofuji and Newman, 2004). Ainsi, le réseau formé par les connexines est une des conditions essentielles à la mise en place de ce mécanisme. Il permet ainsi aux astrocytes et aux oligodendrocytes de récupérer l'excès de potassium, de le propager dans le réseau et de le libérer dans la circulation sanguine (**Figure 17**) (Lapato and Tiwari-Woodruff, 2018). L'implication des connexines dans le K^+ «*spatial buffering* » a été démontrée, notamment dans un modèle de délétion des connexines astrocytaires Cx30 et Cx43 dans lequel une accumulation de K^+ était associée à un plus long délai d'élimination du K^+ durant l'activité neuronale. Cela démontre un déficit de K^+ «*spatial buffering* » en l'absence de connexines astrocytaires (Wallraff, 2006). De plus, l'association entre les jonctions communicantes astrocytaires et les canaux hydriques d'AQP4 suggèrent que les mouvements d'ions et d'eau sont coordonnés et participent à ce mécanisme (Rash, 2010).

Support métabolique des neurones : Les connexines sont impliquées dans le **couplage métabolique** entre astrocytes, neurones et oligodendrocytes. Comme précédemment évoqué, les astrocytes sont une source de métabolites énergétiques pour les neurones. En effet, ils prélèvent le glucose, le stockent sous forme de glycogène, mais également distribuent le lactate aux oligodendrocytes et aux neurones. Les jonctions communicantes astrocytaires sont perméables aux métabolites énergétiques que sont le lactate et le

Rappels bibliographiques

glucose (Giaume et al., 2010). Le lactate peut donc circuler dans le réseau astrocytaire via les jonctions communicantes et être distribué aux neurones via les transporteurs aux monocarboxylates (MCT). Les connexines jouent ici un rôle de couplage, en permettant le transport du lactate dans le réseau astrocytaire (**Figure 17**). Elles participent aussi à la propagation de signaux comme les vagues calciques permettant de synchroniser une augmentation d'activité neuronale avec l'augmentation du flux sanguin et du prélèvement de métabolites énergétiques.

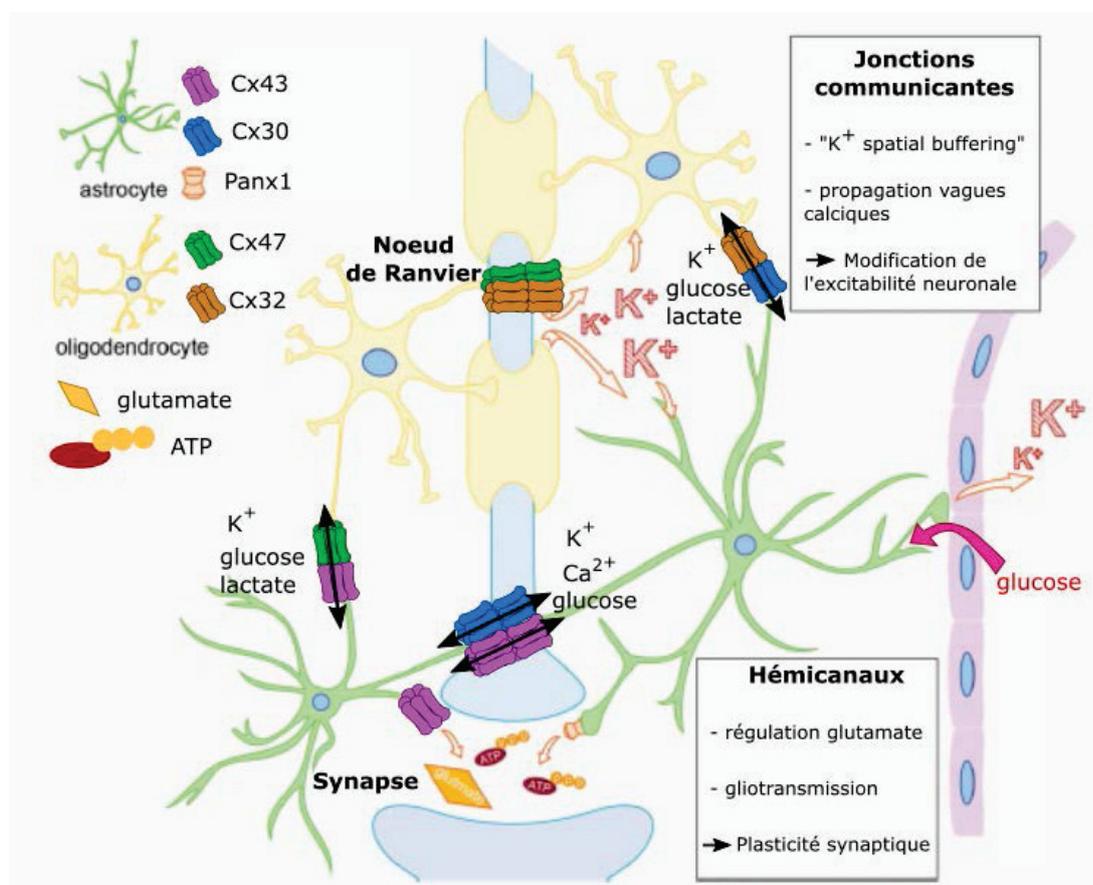


Figure 17: K⁺ Spatial buffering et réseau neuroglial. Les astrocytes sont responsables de la recapture du K⁺ libéré lors de l'activité neuronale et le redistribuent dans le réseau glial via les jonctions communicantes pour l'évacuer via la circulation sanguine. Cela permet de réguler l'excitabilité neuronale. Les astrocytes peuvent également jouer un rôle à la synapse via la gliotransmission et la régulation des taux de glutamate via les hémicanaux. Les astrocytes sont aussi capables de prélever le glucose et de le distribuer dans le réseau neuroglial pour fournir des métabolites énergétiques (glucose et lactate) aux neurones et aux oligodendrocytes. Figure adaptée de Lapato and Tiwari-Woodruff, 2018.

iii) *Les connexines au sein de l'unité neuro-glio-vasculaire*

Comme évoqué précédemment, la barrière hématoencéphalique (BHE) permet la protection du SNC d'agents potentiellement pathogènes ou toxiques présents dans la circulation sanguine. Mais la BHE est aussi considérée comme un élément de **l'unité neuro-glio-vasculaire** (NGV) car elle permet la régulation de la composition du microenvironnement par le contrôle des échanges moléculaires et ioniques entre le sang et le parenchyme. Au sein de l'unité NVG, les connexines sont exprimées à la fois dans les cellules endothéliales mais aussi au niveau des pieds astrocytaires bordant les vaisseaux.

Dans les **cellules endothéliales** des capillaires, les connexines sont exprimées et ont des activités *hémicanal* ou *jonction communicante*. Les connexines sont associées aux autres protéines du complexe jonctionnels que sont les jonctions adhérentes (cadhérine) et serrées (Occludine et claudine) qui limitent la diffusion paracellulaire depuis le sang vers le parenchyme. La famille de protéines « *zona occludin protein* » (ZO1, ZO2 et ZO3) sont également présentes dans le cytoplasme afin d'ancrer les protéines de jonction serrées au cytosquelette.

L'expression des connexines dans les cellules endothéliales varie selon les différentes régions de l'arbre vasculaire et comprend trois types de connexines : les Cx40, Cx37 et Cx43 (De Bock et al., 2017; Zhao et al., 2018). L'expression de la Cx43 est plus importante dans la microvasculature et l'augmentation de son expression est associée avec une hyper perméabilité vasculaire (Zhao et al., 2018). Dans les malformations familiales de cavernome cérébral de type III, cette hyperperméabilité a été associée à une dislocation de ZO1 des jonctions serrées et à l'augmentation d'activité *jonction communicante* de la Cx43. La fonctionnalité de la BHE peut être rétablie par l'utilisation d'un inhibiteur de jonctions communicantes composées de Cx43 (le peptide inhibiteur Gap27) qui rétablit la structure des complexes jonctionnels et diminue la taille des plaques de jonction communicante (Johnson et al., 2018).

Cependant, les connexines peuvent participer aux propriétés de barrière sans qu'une modification de leur expression ou de celle des protéines de jonction ne soit observée. En effet, le blocage des connexines dans les cellules endothéliales de la BHE porcine, conduit à une augmentation de la perméabilité au mannitol et une diminution de la conductance transmembranaire, deux caractéristiques d'une rupture des fonctions de barrière. Cependant, aucune modification d'expression ou de localisation ni des connexines ni des protéines de jonction n'a été observée après blocage des connexines endothéliales (Nagasawa et al., 2006).

Dans les **astrocytes de l'unité neuro-glio-vasculaire**, les Cx43 et Cx30 sont majoritairement exprimées et enrichies au niveau du pieds astrocytaire. L'étude de leur implication dans la BHE a été réalisée dans un modèle de double délétion des connexines Cx43 (délétion uniquement dans les astrocytes) et Cx30 (délétion globale). Dans ce modèle, les astrocytes présentent une diminution de l'expression d'AQP4 et du β -dystroglycan (permettant l'ancrage du pieds astrocytaire à la lame basale) associée à un gonflement des pieds astrocytaires et une augmentation de la perméabilité de la BHE lors d'une augmentation de pression hydrostatique vasculaire ou de stress mécanique (Ezan et al., 2012).

Par ailleurs, en absence de Cx43 astrocytaire, le cerveau n'est plus en mesure de conserver une **quiescence immune**. Une augmentation de l'infiltration de cellules immunes telles que des lymphocytes B, des lymphocytes T (CD4 et CD8), des macrophages ou de neutrophiles résulte de l'activation des cellules endothéliales et de la chémoattraction (Boulay et al., 2015). Les cellules microgliales deviennent des cellules présentatrices de l'antigène et les cellules infiltrées développent des réponses humorales autoimmunes.

En résumé, le rôle des connexines gliales à la BHE est complexe mais crucial en contexte physiologique et pourrait être impliqué dans des contextes pathologiques.

iv) Connexines, activité synaptique et cognition

Au fil de la découverte des multiples rôles des cellules gliales, la notion de synapse a évolué et le concept de **synapse tripartite**, incluant la glie, est maintenant soutenue par plusieurs travaux (Perea et al., 2009). Les cellules microgliales et les astrocytes libèrent des molécules actives augmentant ou diminuant la force d'une synapse (Abudara et al., 2018) (**Figure 18**). Cette libération de molécules actives, aussi appelée **gliotransmission**, implique plusieurs mécanismes dont la voie vésiculaire, les hémicanaux, composés de connexines, ou les pannexons, composés de pannexines (**Boite 4, Figure 18A**).

Dans les conditions physiologiques, les **hémicanaux** et pannexons sont impliqués dans divers processus cognitifs comme la mémoire et l'apprentissage (Stehberg et al., 2012; Walrave et al., 2016). En effet, le blocage des hémicanaux de Cx43 *in vivo*, par un peptide inhibiteur spécifique, a permis de montrer leur implication dans des phénomènes de consolidation mnésique au cours du conditionnement à la peur. Les hémicanaux de Cx43 seraient essentiels pour la gliotransmission car les capacités d'apprentissage des animaux sont restaurées lorsque le peptide bloqueur est co-infusé avec des gliotransmetteurs comme le glutamate, l'ATP, la D-Sérine ou la glycine (Stehberg et al., 2012). De même, le blocage des hémicanaux de

Cx43 *in vivo*, avec le peptide inhibiteur GAP19, interfère avec la mémoire spatiale à court terme dans une tâche de labyrinthe en Y (Walrave et al., 2016).

L'ouverture des hémicanaux semble ici être impliquée dans la gliotransmission, or les hémicanaux sont supposés être non fonctionnels dans les conditions physiologiques (Contreras et al., 2003). Cependant la plupart des études sur les mécanismes d'ouverture des hémicanaux ont été réalisées dans des modèles d'expression exogènes, au sein de lignées cellulaires, où les taux d'oxygène sont bien supérieurs à ceux rencontrés dans les vaisseaux (21% versus 10 à 12%). De plus, les agents réducteurs et oxydants peuvent moduler la phosphorylation de Cx43 et ainsi son ouverture (Retamal et al., 2007b). Il serait alors possible que dans les cellules gliales *in vivo*, du fait de potentiel redox différents, les hémicanaux soient fonctionnels et puissent libérer les gliotransmetteurs et moduler l'activité synaptique.

Parmi ces gliotransmetteurs l'ATP module l'activité synaptique en activant des récepteurs ionotropiques (P2X) ou métabotropiques (P2Y) présents sur les membranes des neurones pré- et/ou post-synaptiques (**Figure 18B**). L'activité des hémicanaux de Cx43 est impliquée dans la régulation de la **transmission basale** excitatrice par des mécanismes dépendant de l'ATP (Chever et al., 2014). La gliotransmission, dépendante des hémicanaux de Cx43, permet la libération d'autres gliotransmetteurs tels que la D-sérine (Meunier et al., 2017) : un coactivateur des récepteurs NMDA avec le glutamate. Ainsi, l'inhibition des hémicanaux de Cx43 conduit à une diminution de l'amplitude des courants NMDA dans le cortex préfrontal, en bloquant la gliotransmission et la libération de D-sérine. Ces études ont mis en évidence un rôle des hémicanaux, non seulement dans la transmission synaptique basale, mais aussi dans des mécanismes de **plasticité synaptique**.

Les connexines sont également impliquées dans les **réseaux neuronaux et leur coordination**. Dans un modèle de délétion des connexines astrocytaires, Cx43 et Cx30, une altération des motifs de bouffées de potentiels d'action (*bursts*) neuronales au sein de l'hippocampe a été observée. Elle est associée à une dépolarisation des membranes des neurones pyramidaux, engendrant une activité spontanée durant les périodes de *burst* et est associée à une diminution de la probabilité de coordination des activités neuronales (Chever et al., 2016). Cela montre non seulement que les connexines sont impliquées dans la synchronisation des activités neuronales mais aussi qu'elles pourraient être des cibles thérapeutiques intéressantes dans les maladies caractérisées par une hyper-synchronisation des réseaux neuronaux comme au cours des convulsions épileptiques.

Rappels bibliographiques

Enfin, il a été démontré que la connexine astrocytaire Cx30 peut moduler la transmission synaptique en induisant des modifications morphologiques chez l'astrocyte (Pannasch et al., 2014). En effet, chez des souris déficientes pour la Cx30, une diminution de la transmission synaptique glutamatergique ainsi qu'une diminution de la potentialisation à long terme sont observées et sont associées à une augmentation de la taille des prolongements astrocytaires pénétrant au sein des synapses. Ainsi, par une fonction indépendante de la fonction canal, la Cx30 régule la présence de l'astrocyte à la synapse et module la recapture du glutamate.

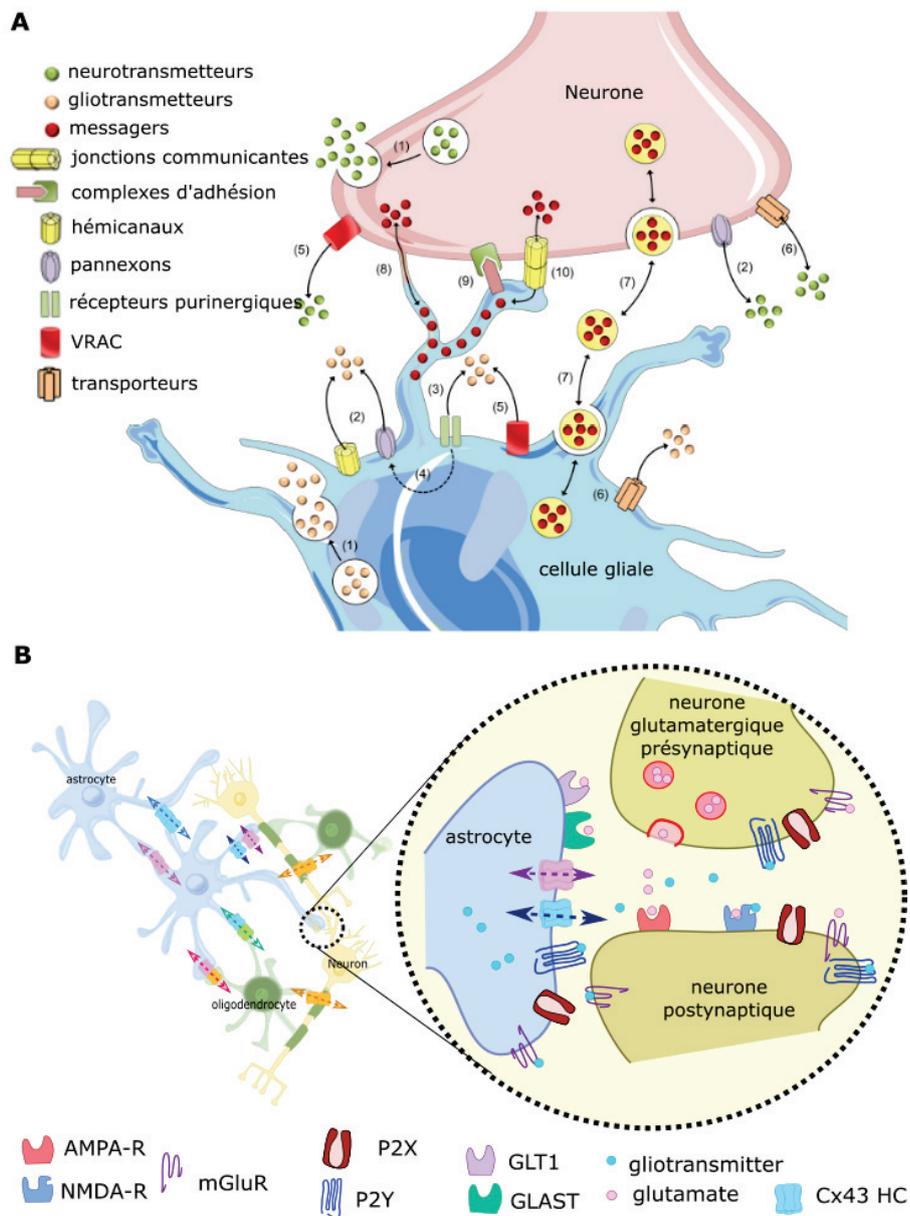


Figure 18 (légende ci-contre)

Figure 18 : Mécanisme d'interactions neurone-glie, gliotransmission et implication des connexines dans la synapse tripartite. A) Les cellules gliales et les neurones échangent des neurotransmetteurs et des gliotransmetteurs par exocytose dépendant du Ca^{2+} ou de SNARE, respectivement (1). La libération peut également se produire par d'autres mécanismes comme l'ouverture d'hémicanaux ou de pannexons (2). L'activation maintenue des récepteurs purinergiques comme P2X pourrait également participer dans la libération de gliotransmetteurs (3) et une autre théorie propose que les récepteurs P2X induisent l'activation d'une voie non-sélective qui pourrait impliquer les pannexons (4). La libération de neurotransmetteurs et gliotransmetteurs peut aussi impliquer les « *volume-regulated anion channels* » (VRAC) (5) et des transporteurs ou co-transporteurs (6). Les cellules gliales et les neurones peuvent également communiquer par libération de petites vésicules comme les exosomes contenant des messagers cellulaires comme des ARN messagers (7). Les cellules gliales et neurones peuvent aussi être directement en contact via la formation de connections tubulaires dépendant de l'actine fibrillaire appelés « tunneling nanotubes » permettant d'échanger des messagers (8) ou des contacts membranaires par complexes jonctionnels (9) ou encore la présence de jonctions communicantes permettant l'échange direct de molécules entre ces deux types cellulaires (10). Schéma adapté de Abudara *et al.*, 2018. **B)** Schéma de l'astrocyte au sein d'une synapse tripartite glutamatergique. L'expression de transporteurs aux glutamates permet aux astrocytes de réguler la présence du glutamate libéré dans la fente synaptique. Le glutamate peut se fixer aux récepteurs ionotropiques NMDA et AMPA mais aussi métabotropiques mGluR et exercer ses fonctions à la synapse mais aussi activer la gliotransmission astrocytaire. Les hémicanaux (HC) de Cx43 sont impliqués dans la gliotransmission en libérant des molécules comme l'ATP ou le glutamate qui peuvent moduler la fonction synaptique via leurs récepteurs ionotropiques ou métabotropiques.

Les communications entre astrocytes et neurones, notamment par le biais de la gliotransmission impliquant les hémicanaux de connexine, sont ainsi cruciales pour réguler la fonction synaptique.

v) Les connexines et la myélinisation

De nombreuses études ont montré l'implication des connexines dans la **myélinisation** et proviennent en grande parties de la délétion de gènes, aussi appelés « knock-out » (KO), codant pour des connexines gliales (astrocytaire ou oligodendrocytaire) dans des modèles murins (**Figure 19**).

Le KO d'une connexine **oligodendrocytaire**, la Cx47 ou la Cx32, dans un modèle murin est viable, les animaux ne présentent pas d'anomalies comportementales et aucune démyélinisation n'est observée.

A l'inverse, un **double KO des Cx47 et Cx32** conduit à d'importants troubles comportementaux suivis par la mort des animaux à 6 semaines après la naissance. Ces souris présentent des anomalies de myéline, avec une gaine fine ou absente, des vacuolisations ou la mort d'oligodendrocytes et une perte axonale (Nelles et al., 1996; Menichella et al., 2003) (**Figure 19b**). Mais aussi, le remplacement de la Cx32, par croisement des animaux double KO Cx47 et Cx32 avec des animaux exprimant la Cx32 humaine permet de contrecarrer ce phénotype hypomyélinisant (Schiza et al., 2015).

Par ailleurs, un modèle animal reproduisant une mutation du gène de la Cx32, associée à la **pathologie de Charcot Marie-Tooth** liée au X, a permis de montrer, que bloquer la fonction de la Cx32, sans altérer son expression, provoquait une altération de la myélinisation à la fois dans le SNC et le SNP (Sargiannidou et al., 2009). De même, une mutation du gène de la Cx47 est associée à la **maladie de type Pelizaeus-Merzbacher**, caractérisée par une importante altération de la myélinisation. Cette mutation provoque une accumulation de la Cx47 dans le réticulum endoplasmique, prévenant la formation de jonctions communicantes, ce qui, en conséquence, induit une perte de fonction de la Cx47 (Orthmann-Murphy et al., 2007). Ces études suggèrent que la fonction, au-delà de l'expression, des connexines oligodendrocytaires Cx47 et Cx32 est primordiale dans le processus de myélinisation.

Par ailleurs l'implication des **connexines astrocytaires** dans la myélinisation a également fait l'objet d'études dans des modèles animaux de délétion des Cx43 et Cx30 (KO Cx43 ou KO Cx30). Le KO Cx43 global conduisant à un phénotype léthal, la délétion de la Cx43 est donc ciblée au sein de l'astrocyte. Un modèle de KO Cx43 dans l'astrocyte conduit à l'augmentation de la vitesse de la propagation de la dépression ainsi qu'à une augmentation de l'activité locomotrice associée à une baisse des performances motrices au test du Rotarod® (Frisch et al., 2003; Theis et al., 2003). Cependant les délétions individuelles d'une des connexines Cx43 ou Cx30 ne présentent pas d'altération de la myélinisation (Lutz et al., 2009).

Dans un modèle de double délétion des Cx43 et Cx30 (KO Cx43/Cx30), les animaux présentent des vacuoles dans les oligodendrocytes de la substance blanche, des œdèmes au sein de la myéline et la présence d'astrocytes réactifs dans l'hippocampe, où des vacuoles sont également présentes (Lutz et al., 2009) (**Figure 19c**). En comparaison aux animaux KO Cx30, les animaux double KO Cx30/Cx43 présentent une altération des performances motrices au test du Rotarod® par rapport aux animaux sauvages. Ces études montrent le rôle primordial des connexines astrocytaires dans le processus de myélinisation dont la délétion est probablement à l'origine d'un défaut de communications entre cellules gliales.

Rappels bibliographiques

D'autres modèles de **délétion combinée** d'une connexine astrocytaire et d'une connexine oligodendrocytaire ont été étudiés afin de mieux comprendre l'implication du couplage entre astrocyte et oligodendrocyte dans la myélinisation. Le double KO Cx47/Cx30 présente des anomalies et myélinisation et environ 40% des animaux meurent entre 42 et 90 jours après la naissance (**Figure 19e**). De plus ces animaux présentent de très graves troubles moteurs et au niveau histologique une perte d'oligodendrocyte, une réactivité astrocytaire, une mauvaise myélinisation associée la présence de vacuoles dans la myéline et une activation microgliale (Tress et al., 2012).

Le double KO Cx32/Cx43 est également caractérisé par des vacuoles au sein de la myéline et une mort prématurée entre 35 et 42 jours après la naissance (Magnotti et al., 2011) (**Figure 19d**). Ces animaux présentent également des crises épileptiques et des troubles moteurs et au niveau histologique, bien que la myéline ne soit pas ou peu atteinte, une perte astrocytaire est observée. Dans cette même étude, le double KO Cx43/Cx47 est évoqué mais ne présente pas d'altérations de la myéline, de la substance blanche ou du comportement (Magnotti et al., 2011).

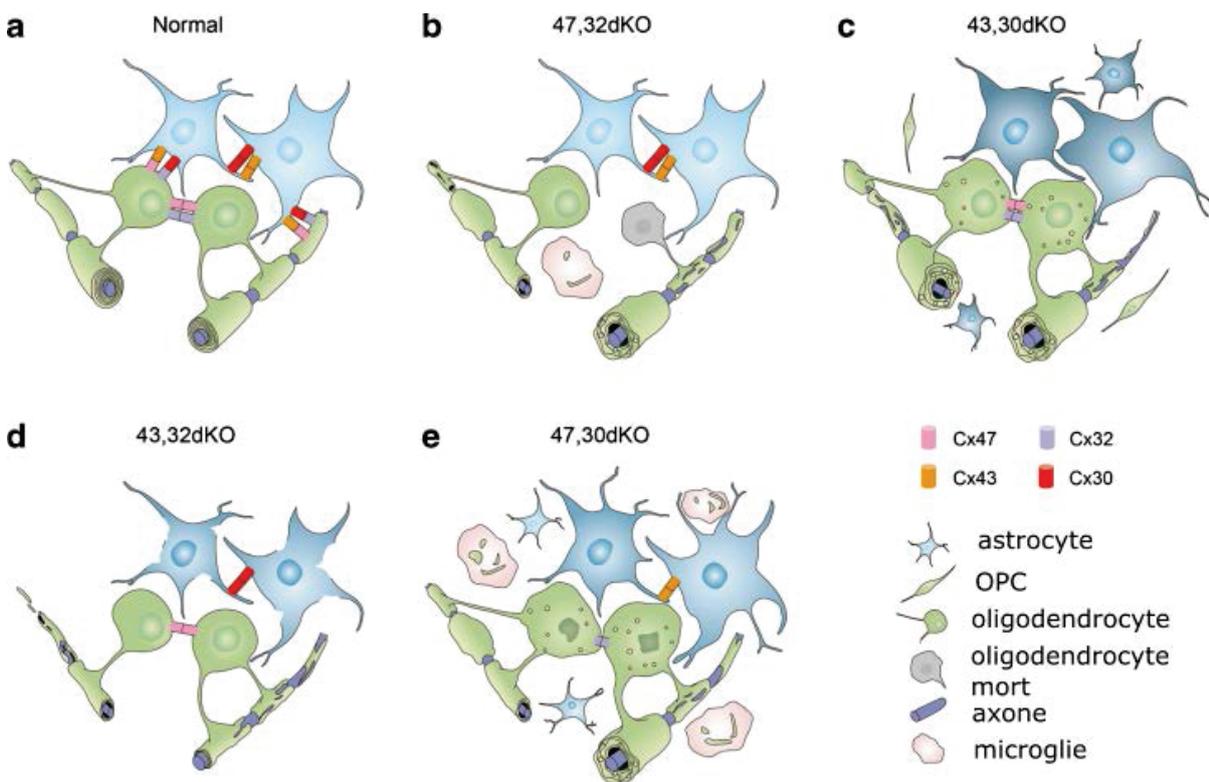


Figure 19 : modèles de délétion des connexines gliales et leurs effets sur la myéline. dKO = double délétion des gènes de deux connexines. Schéma issu de Li *et al.*, 2014.

Modèles non-génétiques de démyélinisation impliquant les connexines

Des altérations des connexines ont également été observées de façon concomitante avec la démyélinisation dans des modèles non-génétiques tels qu'un changement osmotique ou la neuroinflammation. Dans le premier, un changement osmotique brutal induit une démyélinisation qui est secondaire à une diminution d'expression des Cx43 et Cx47 qui précédait la mort astrocytaire (Gankam Kengne et al., 2011). Dans un modèle inflammatoire comme l'injection de LPS une dysfonction astrocytaire caractérisée par une perte de prolongements astrocytaires, une diminution d'expression d'AQP4 et des Cx30 et Cx43 est suivie d'une mort oligodendrocytaire et d'une démyélinisation (Sharma et al., 2010).

Fonction des connexines dans la myélinisation

Comme nous l'avons présenté précédemment (Cf paragraphe : Expression et rôle des connexines durant le développement du SNC), la différenciation oligodendrocytaire et la myélinisation sont associées à l'expression des connexines astrocytaires et oligodendrocytaires. En effet, il a été démontré que le niveau d'ARN messager de la Cx47 suit le même profil temporel que celui de la protéine de myéline proteolipid protein (PLP) (Menichella et al., 2003). Ainsi, l'apparition des connexines et l'évolution de leur expression suggère que la formation de jonctions communicantes entre ces cellules participe à la myélinisation (Li et al., 2014).

Réseau glial et apport énergétique : La notion de réseau panglial ou de réseau glial réfère à la présence d'un couplage intercellulaire fonctionnel et plastique qui est sous-tendu par les connexines. Ainsi le réseau glial peut participer à la myélinisation par divers mécanismes. Premièrement, les connexines étant perméables au glucose et au lactate, elles sont une voie privilégiée pour leur prélèvement et leur transport au sein du réseau glial. Ainsi il a été démontré que les précurseurs oligodendrocytaires expriment les Cx47, Cx32 et Cx29 et présentent des hémicanaux qui participaient au prélèvement d'un analogue du glucose fluorescent et l'activation de ces hémicanaux dépendait d'une augmentation de concentration intracellulaire en calcium (Niu et al., 2016). De plus, bloquer les hémicanaux empêche la différenciation des OPCs en oligodendrocytes. Par ailleurs, les jonctions communicantes permettent l'échange de glucose entre astrocytes et oligodendrocytes différenciés (Niu et al., 2016).

Ainsi, les astrocytes peuvent prélever le glucose avec leur transporteur au glucose GLUT1 depuis la circulation sanguine et le transférer aux oligodendrocytes via les jonctions communicantes. Le glucose peut ainsi servir à la glycolyse pour obtenir du pyruvate puis de l'ATP ou à la synthèse d'acides gras et de lipides pour la synthèse de la myéline à partir de l'acetyl-CoA (Li et al., 2014). De plus l'oligodendrocyte

Rappels bibliographiques

peut fournir de l'énergie à l'axone en lui transférant du lactate via les jonctions communicantes réfléchies entre les différentes couches de myéline composées de Cx32 puis via les transporteurs aux monocarboxylates situés à la membrane de l'axone (Lee et al., 2012b).

Connexines et homéostasie du microenvironnement pour la myélinisation : Comme précédemment expliqué, les connexines sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie ionique et notamment de l'homéostasie du potassium. Or les phénotypes observés chez les double KO Cx43/Cx30 et Cx47/Cx32 sont très similaires au phénotype d'animaux KO Kir4.1 (Neusch et al., 2001). Mais également, dans le double KO Cx47/Cx32, la présence de vacuoles dans la myéline est corrélée à la stimulation de l'activité neuronale, qui provoque la libération de K^+ (Menichella et al., 2006). Le mécanisme de régulation du K^+ impliquerait donc les Cx.

Le K^+ est libéré dans l'espace péri axonal, qui est situé sous la gaine de myéline, Il ne peut donc pas directement être prélevé par l'astrocyte et doit traverser les différentes couches de la myéline. Ainsi, le K^+ pourrait être prélevé par les hémicanaux de Cx29 ou de Cx47, ou par des canaux potassiques, présents sur les membranes oligodendrocytaires le long de l'axone puis circulerait à travers les jonctions communicantes de Cx32 entre les couches de myéline pour ensuite être redistribué dans le réseau astrocytaire (Rash, 2010; Li et al., 2014). Cela impliquerait des jonctions communicantes entre astrocytes et oligodendrocytes (Cx43/Cx47 ou Cx30/Cx32) et des jonctions communicantes entre astrocytes (formés de canaux de Cx30 et Cx43 hétéro ou homotypiques) permettant de faire circuler le K^+ pour l'éliminer plus efficacement (**Figure 20**). Ainsi un défaut de régulation du K^+ extracellulaire dû à une altération des connexines serait néfaste pour la myélinisation.

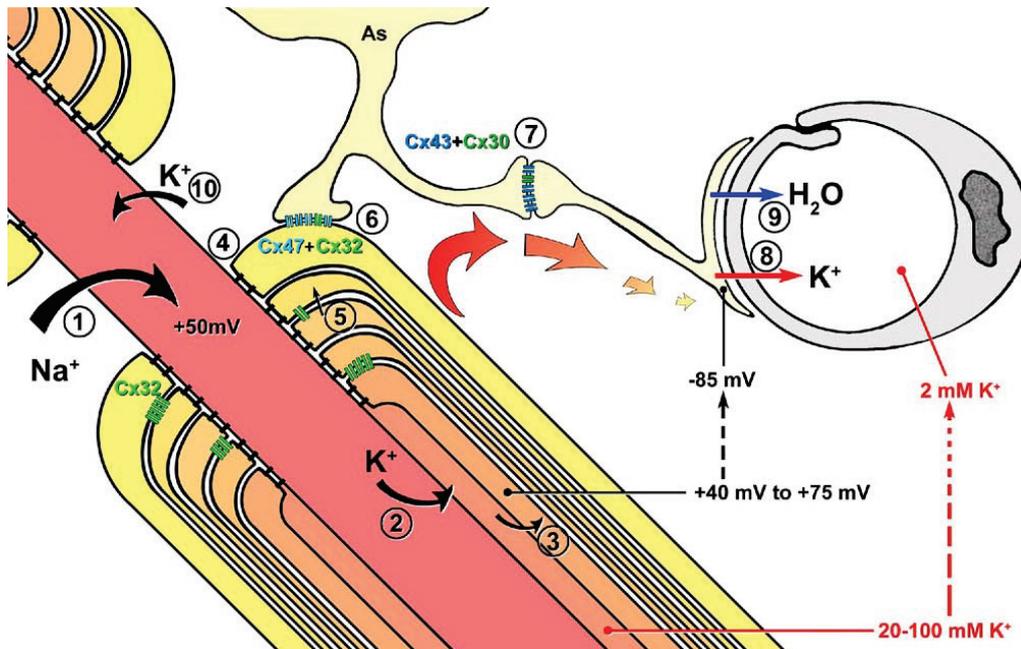


Figure 20 : Voie d'élimination de potassium libéré par l'activité neuronale au niveau du juxtaparanœud.

L'entrée de Na⁺ au niveau du nœud de Ranvier via les canaux voltage dépendants est suivie d'une sortie de K⁺ par les canaux potassiques voltage dépendants situés au niveau du juxtaparanœud. K⁺ et H₂O pénètrent dans l'espace périaxonal via des mécanismes encore méconnus mais pouvant impliquer la Cx29. Une barrière de diffusion du K⁺ est présente au niveau des boucles paranodales séparant l'espace périaxonal de l'espace extracellulaire (4). Le K⁺ traverse les différentes lamelles de myéline cytoplasmique formant les boucles paranodales via des jonctions communicantes formées de Cx32 (5) jusqu'à la couche externe de myéline. A ce niveau les jonctions communicantes hétérotypiques permettent le passage du K⁺ de l'oligodendrocyte vers l'astrocyte (6) puis dans le réseau astrocytaire via des jonctions communicantes homotypiques (7). Et enfin le K⁺ et H₂O sont libérés dans la circulation sanguine grâce à la présence de canaux Kir4.1 et d'AQP4 (8,9). Schéma adapté de Rash, 2010.

G. Connexines, inflammation et pathologies

Du fait de leur rôle dans de nombreux processus physiologiques du SNC, une modification de l'expression ou de la fonction des connexines a été suggérée dans de nombreuses pathologies du SNC. Les connexines seraient par exemple altérées dans certaines pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique (Mayorquin et al., 2018; Xing et al., 2019). L'expression de la Cx43 est augmentée dans les régions corticales présentant des plaques d'amyloïde β , chez les patients et dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, où elle est associée à une réactivité astrocytaire (Nagy et al., 1996; Mei et al., 2010). Il a été démontré, *in vitro*, qu'une ouverture des hémicanaux de Cx43 est impliquée dans les dommages aux neurones via la libération d'ATP et de glutamate par les astrocytes activés en condition ischémique et en présence de milieu conditionné de cellules microgliales traitées par de l'amyloïde- β (Orellana et al., 2011). L'augmentation d'expression de la Cx43 est également observée chez les patients atteints de la maladie de Parkinson dans la région de la substance noire, où une dégénérescence des neurones dopaminergiques est observée (Wang et al., 2013). Enfin, dans la **sclérose latérale amyotrophique**, une surexpression de Cx43 est associée à une augmentation des activités *hémicanal* et *jonction communicante* ainsi qu'à une augmentation des taux de Ca^{2+} intracellulaire, contribuant à la toxicité envers les motoneurones. Cette toxicité est en effet bloquée en présence d'un peptide inhibiteur des hémicanaux de Cx43 (Almad et al., 2016).

Par ailleurs, dans une maladie neuroinflammatoire démyélinisante, la **sclérose en plaques**, une altération des connexines astrocytaires et oligodendrocytaires est observée. En effet, une étude anatomopathologique a montré une diminution de l'expression des connexines oligodendrocytaires Cx32 et Cx47 au sein des lésions et une diminution de la Cx32 étendue dans la substance grise d'apparence normale. L'expression des connexines astrocytaires est également modifiée : la Cx30 est augmentée dans les lésions et la Cx43 est augmentée à la fois dans les lésions et dans la substance grise d'apparence normale. Ces modifications sont corrélées à l'inflammation et à la durée de la maladie (Markoullis et al., 2014). Dans une autre étude anatomopathologique, une diminution de l'expression de Cx43 est observée dans les lésions avec une perte de jonctions communicantes entre astrocytes et oligodendrocytes composées de Cx43 et Cx47. Les auteurs ont également retrouvé une perte de connexines oligodendrocytaires Cx32 et Cx47 dans les lésions. La perte de Cx43 est ici associée à une progression plus rapide de la maladie (Masaki et al., 2013).

Ainsi, les connexines sont impliquées dans les processus physiopathologiques de nombreuses atteintes du SNC, les positionnant comme d'intéressantes cibles pour la neuroprotection (Vicario et al., 2017).

III. Neuroinflammation et autoimmunité

Le rôle crucial des cellules gliales dans le fonctionnement du SNC en fait des cibles préférentielles d'altérations fonctionnelles, impliquées dans la physiopathogénèse des pathologies neuroinflammatoires et autoimmunes du SNC.

A. Définition de l'immunité et ses composantes

L'immunité comprend tous les mécanismes mis en œuvre par un organisme pour éliminer tout élément étranger qui est perçu comme une source potentielle de danger. Le **système immunitaire** (SI) comprend deux grandes composantes : innée ou adaptative qui interagissent et coopèrent dans la réponse immune.

Système immunitaire inné : Le système immunitaire inné est constitué des monocytes/macrophages, des polynucléaires, des cellules dendritiques et des « *natural killer* » (NK) mais aussi de facteurs humoraux tels que les cytokines, chimiokines, granzymes et perforines. Les cellules du SI inné expriment des récepteurs de reconnaissance des motifs communs aux agents pathogènes (« *pattern recognition receptors* » – PRR) appelés PAMPS pour « *pathogen associated molecular patterns* ». Elles vont permettre une réponse rapide et transitoire qui sera suivie ou non d'une réponse immune adaptative.

Système immunitaire adaptatif : Le système immunitaire adaptatif est composé de cellules présentatrices de l'antigène (CPA) comme les cellules dendritiques, de lymphocytes B (LB) qui une fois différenciés en plasmocytes vont produire des anticorps intervenant dans l'immunité adaptative humorale et de lymphocytes T (LT) de différents types (helper, cytotoxiques ou régulateurs). Le SI adaptatif est caractérisé par la reconnaissance spécifique d'antigènes qui sont présentés par les CPA et par la mise en place d'une mémoire immunitaire.

L'immunité adaptative se met en place lorsque des cellules dendritiques ayant reconnu un élément étranger sont activées et migrent dans les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions) où elles vont présenter un antigène (Ag) à leur surface via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et des molécules de costimulation et vont libérer des cytokines et chimiokines permettant l'activation de lymphocytes T naïfs. Ainsi le LT naïf avec un récepteur T (TCR) spécifique d'un antigène donné sera activé via l'interaction de son TCR avec l'Ag présenté sur la cellule dendritique mais aussi la costimulation avec l'interaction CD28/B7. Ce LT activé devient un LT effecteur dont le type dépend de son environnement cytokinique et qui migre au site inflammatoire. Les lymphocytes B participent aussi à la réponse adaptative et sont aussi activés par la reconnaissance d'un Ag présenté par la cellule dendritique ou sous forme

soluble au sein des organes lymphoïdes secondaires. Les LB activés prolifèrent, et se différencient en plasmocytes produisant les immunoglobulines de type M (IgM) à faible affinité pour l'Ag. Puis la coopération des LB avec des LT helper, au sein du centre germinatif, aboutit à la formation de plasmocytes produisant des immunoglobulines de type G (IgG) ou anticorps (Ac) qui sont très affins des Ag. Certains deviendront des LB mémoires.

Tolérance et auto-immunité : Afin de maintenir son intégrité, le SI doit à la fois être capable de reconnaître des éléments étrangers mais de tolérer les éléments du soi afin d'éviter toute attaque non désirée des cellules du soi. La tolérance immune est un processus mis en place par le SI pour ne pas reconnaître les antigènes du soi. Elle fait intervenir la tolérance centrale qui permet l'élimination par apoptose des LT et LB auto-réactifs reconnaissant des antigènes du soi avec une très forte affinité, c'est la sélection négative. Les LB auto-réactifs ne sont pas tous éliminés sous ce même mode mais certains subissent une édition de leur récepteur spécifique (BCR) pour le rendre moins afin. Cependant la sélection négative ne permet pas de supprimer tous les LB et LT auto-réactifs et certains sont retrouvés en périphérie. Il existe donc des mécanismes de tolérance périphérique permettant de contrôler les effets potentiellement délétères de ces cellules. Parmi ces mécanismes, l'anergie fait suite à une activation partielle entre LT et LB par l'interaction de leurs récepteurs et de l'antigène sans costimulation et conduit à des cellules non fonctionnelles. Les lymphocytes T régulateurs participent également à la tolérance en supprimant l'activation et la prolifération de certaines cellules immunes comme les LT CD4 et CD8, les LB et les cellules NK soit par la libération de cytokines soit par interaction directe. Enfin les LB régulateurs sont également impliqués dans les mécanismes de tolérance par des actions régulatrices comme la libération de cytokines ou le contact direct avec les cellules du SI inné ou adaptatif.

B. La neuroinflammation et son implication en contexte pathologique

La vue du SNC comme un organe privilégié, protégé des interactions avec le système immunitaire a évolué au cours du temps et le SNC est aujourd'hui considéré comme un site de **surveillance immune** accrue (Negi and Das, 2018). Dans les organes et tissus périphériques, l'inflammation est liée à la reconnaissance d'un élément étranger (« non soi ») et potentiellement pathogène par le système immunitaire inné, tels que les macrophages, les cellules dendritiques ou les polynucléaires. Suite à une détection d'un élément « non soi » par une batterie de récepteurs « toll-like » (TLR) et de composant du complément, ces cellules

stimulent une réponse inflammatoire à l'origine du recrutement des lymphocytes du système immunitaire adaptatif, spécifiques de l'élément « non soi » (Tohidpour et al., 2017).

Dans le SNC, la réponse innée repose sur les astrocytes et les cellules microgliales, ainsi que les macrophages infiltrés et les péricytes. Par ailleurs, la présence de cellules infiltrées dans le SNC est essentiellement limitée au liquide céphalo rachidien (LCR) et à l'espace sous arachnoïdien et permet de protéger le parenchyme cérébral. Les cellules immunes présentes dans le SNC sont pour la plupart des lymphocytes T et pour le reste des cellules dendritiques, présentatrices d'antigènes, et des macrophages (Negi and Das, 2018). La présence de lymphocytes T dans le SNC peut avoir des fonctions de surveillance immune, et notamment les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont particulièrement importants pour limiter l'auto-immunité en limitant l'activation de cellules immunes et induisant la tolérance du soi : la fonction de ces cellules peut être altérée dans des maladies auto-immunes telles que la SEP (Pot et al., 2011; Lowther and Hafler, 2012; Miron, 2017). Ainsi les interactions entre le SNC et le SI existent en contexte physiologique mais sont fortement altérées en contexte pathologique.

i) Neuroinflammation : définition

Le terme de **neuroinflammation** correspond à une inflammation du tissu nerveux, cerveau et/ou moelle épinière, et regroupe l'activation de cellules immunes résidentes, astrocytes et microglies, qui modifient leur phénotype et sécrètent des cytokines mais aussi l'infiltration de cellules immunes périphériques (du SI inné ou adaptatif) qui est souvent associée à une perturbation de la BHE. De plus la neuroinflammation est d'intensité et de durée variable selon les contextes et peut avoir des effets bénéfiques ou nocifs pour le SNC (DiSabato et al., 2016). La neuroinflammation est médiée par un certain nombre de cytokines et chémokines proinflammatoires, par des messagers secondaires, tels que l'oxyde nitrique ou les prostaglandines, et par les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Ces facteurs sont produits par les cellules gliales activées : astrocytes et microglies, mais aussi par les cellules immunes infiltrées (DiSabato et al., 2016; Norden et al., 2016)

ii) Cellules gliales et neuroinflammation

Les cellules « immunes » résidentes du SNC, astrocytes et microglies, sont d'abord impliquées dans des processus physiologiques, comme par exemple au cours du développement cérébral via le phénomène de « *synaptic pruning* », et dans les fonctions d'apprentissage et de mémoire, où la signalisation entre les lymphocytes T et les cellules du SNC est impliquée (Ziv et al., 2006; Derecki et al., 2010; Schafer and

Stevens, 2013). Cependant, lors d'une stimulation endogène ou exogène, les astrocytes et cellules microgliales sont capables de modifier leur phénotype vers un profil dit « activé ». Selon les stimuli et le contexte, ce phénotype activé peut être délétère ou protecteur.

Les **cellules microgliales** sont connues pour leur rôle dans l'immunité innée du SNC puisqu'elles sont capables de reconnaître des éléments étrangers, potentiellement pathogènes, et d'agir comme des macrophages ce qui leur a valu les terminologies M1 et M2 que nous allons détailler (Kabba et al., 2018). En effet, les microglies activées sont de deux types dits M1 ou M2. Le premier type M1, conduit à la production de médiateurs de l'inflammation comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des cytokines/chimiokines proinflammatoires, molécules potentiellement cytotoxiques pour les neurones et les autres cellules gliales environnantes (Su et al., 2016; Tang and Le, 2016; Kabba et al., 2018) (**Figure 21B**). Le deuxième type M2, serait plus protecteur conduisant à la production de cytokines anti-inflammatoires et de facteurs de croissance pour stimuler la réparation tissulaire. Les microglies M2 éliminent aussi les débris cellulaires et les cellules endommagées (Cherry et al., 2014; Tang and Le, 2016) (**Figure 21C**). La balance entre ces deux phénotypes de microglie est souvent altérée en contexte pathologique (**Figure 21A**).

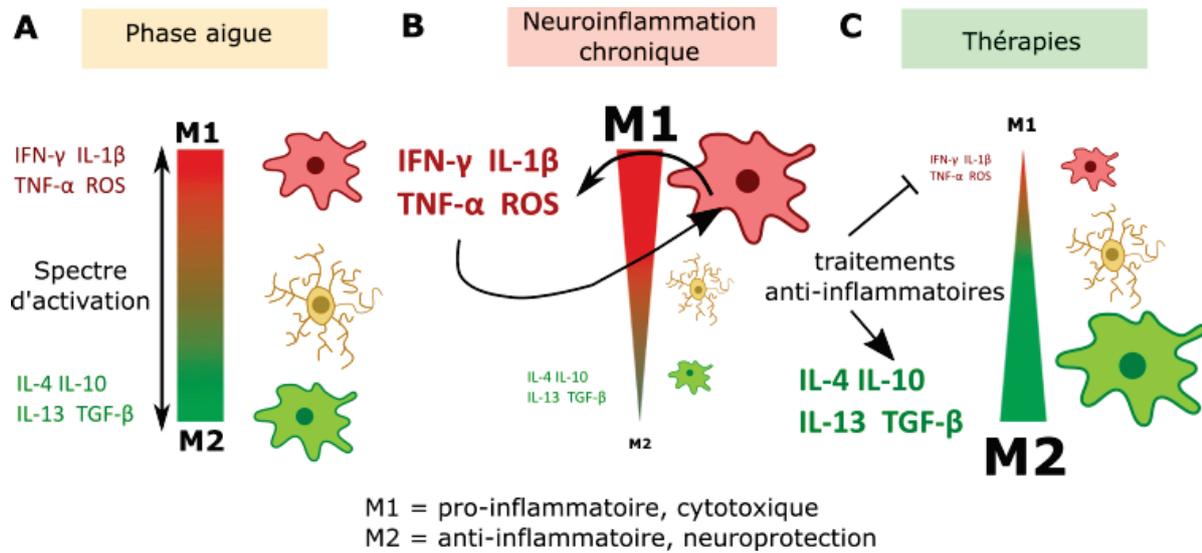


Figure 21 : Modification du phénotype microgliale en contexte neuroinflammatoire. **A)** Durant la phase aiguë d'une atteinte du SNC, les microglies à l'état quiescent (jaune) peuvent être activées et adopter un phénotype M1 ou M2 en fonction des stimuli présents dans l'environnement. Schéma adapté de Cherry *et al.* 2014. **B)** Puis avec le maintien de la neuroinflammation au cours du temps, le phénotype M1 microglial s'auto-entretient avec la libération de cytokines proinflammatoires comme IFN-g, IL-1b, TNF-a et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce phénotype est toxique et inflammatoire. **C)** Les thérapies visant à modérer la neuroinflammation agissent en inversant la balance et en augmentant la production de cytokines anti-inflammatoires comme IL-4, IL-10, IL-13 et TGF-B1 stimulant un phénotype microglial M2 anti-inflammatoire et neuroprotecteur. Schéma issu de Cherry *et al.*, 2014.

Les **astrocytes** sont également susceptibles de modifier leur phénotype en réponse à des stimuli exogènes ou endogènes. Les astrocytes participent également à l'immunité innée car ils expriment une batterie de récepteurs « *Toll-like* » (TLR) et de composant du complément, leur permettant de reconnaître les éléments étrangers et d'induire une réponse innée puis adaptative en recrutant, par exemple, des cellules immunes périphériques (Farina et al., 2007). De plus, tout comme les cellules microgliales, les astrocytes participent à la régulation de la neuroinflammation et réagissent à de nombreux stimuli présents dans le milieu. Il a été démontré que des voies de signalisation différentes au sein de l'astrocytes peuvent avoir un impact bénéfique ou délétère sur ses fonctions, participant à diverses pathologies neuroinflammatoires (Colombo and Farina, 2016) (**Figure 22**). L'activation de ces voies de signalisation est provoquée par des stimuli extracellulaires comme des cytokines ou des chimiokines qui vont, via l'activation de leurs récepteurs, induire des voies de signalisation intracellulaires conduisant à l'activation de facteurs de transcription comme STAT3 et NF κ B. L'activation de STAT3, via des cytokines comme le TGF- β ou l'IL-6,

Rappels bibliographiques

conduirait à un phénotype astrocytaire bénéfique favorisant la survie neuronale et préservant la myéline. Cependant l'activation de NFκB, via des cytokines proinflammatoires comme l'IL-17, conduirait à un phénotype astrocytaire délétère, participant dans la mort neuronale et la démyélinisation dans des modèles de pathologies neuroinflammatoires.

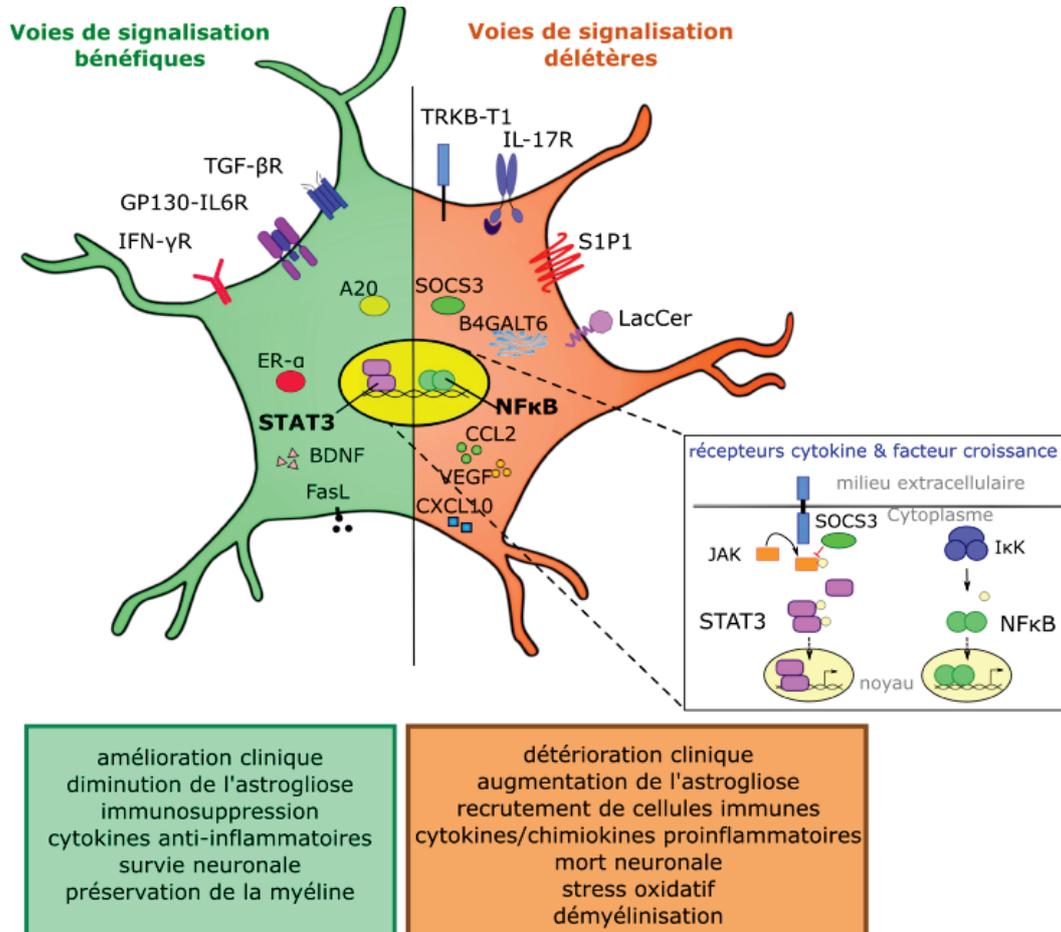


Figure 22 : Voies de signalisations astrocytaires et leur rôle dans la neuroinflammation. La présence de médiateurs extracellulaires (cytokines, chimiokines, enzymes, ganglioside, sphingolipides...) active des récepteurs exprimés par l'astrocyte. Cela induit différentes voies de signalisation intracellulaire qui vont soit activer, soit inhiber les facteurs de transcription STAT3 et NFκB. L'activation de ces facteurs de transcription provoque leur translocation nucléaire, la modification de la transcription de gènes, induisant un phénotype astrocytaire : bénéfique (STAT3) ou délétère (NFκB). **Abréviations:** B4GALT6: b-1,4-galactosyltransferase 6; BDNF: brain-derived neurotrophic factor; CCL: C-C motif chemokine ligand; ER: oestrogen receptor; IFNγR: interferon gamma receptor; IκK: IκB kinase complex; IL17R: interleukin 17 receptor; JAK: Janus kinase; NFκB: nuclear factor kappa B; S1P1: sphingosine -1-phosphate receptor 1; SOCS3: suppressor of cytokine signaling 3; STAT3: signal transducer and activator of transcription 3; TGF-βR: transforming growth factor β receptor; TRKB-T1: truncated tropomyosin receptor kinase B; VEGF: vascular endothelial growth factor. Schéma issu de Colombo and Farina, 2016.

Fait intéressant, les cellules microgliales activées peuvent déclencher une réactivité astrocytaire, démontrant la **collaboration** de ces deux types cellulaires dans la neuroinflammation (Liddelow et al., 2017). En effet, les cellules microgliales induisent un phénotype astrocytaire réactif, nocif via la production d'IL-1 α , de TNF- α et du composant du complément C1q. Ainsi, ces facteurs sont suffisants pour modifier profondément le phénotype astrocytaire, en un phénotype dit A1, qui perd ses fonctions bénéfiques sur la survie neuronale et les mécanismes de synaptogénèse et devient toxique pour les neurones et les oligodendrocytes.

iii) Neuroinflammation et pathologie

La neuroinflammation est impliquée dans de nombreuses pathologies du SNC. Elle peut être déclenchée par une infection, une atteinte physique ou mécanique, une ischémie/hypoxie ou encore par des médiateurs de l'inflammation produits dans ces contextes (DiSabato et al., 2016). Cette neuroinflammation est souvent maintenue dans le temps et devient chronique, malgré la disparition du stimulus initial. Cette neuroinflammation chronique est présente dans un certain nombre de pathologies neurodégénératives et/ou démyélinisantes du SNC comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique et la sclérose en plaques (Frank-Cannon et al., 2009; Schwartz and Deczkowska, 2016). Prenons deux exemples de pathologies pour illustrer la diversité des réponses neuroinflammatoires et le rôle des cellules gliales dans la neuroinflammation :

- Dans la maladie d'**Alzheimer**, les cellules microgliales sont impliquées dans la neuroinflammation et sont activées par la présence d'agrégats de peptide amyloïde- β . Les microglies activées sécrètent des cytokines et chimiokines proinflammatoires maintenant l'activation microgliale et participant dans la mort neuronale. La présence d'astrocytes réactifs dans la maladie d'Alzheimer participerait aussi à la réponse neuroinflammatoire et à la dégénérescence neuronale via une atrophie des astrocyte et une diminution de leurs capacités à dégrader les peptides Amyloïde- β (Heppner et al., 2015). De plus, il a récemment été démontré que la modulation de la réactivité astrocytaire, par inhibition de la voie JAK-STAT3, avait des effets bénéfiques et améliorait trois marqueurs pathologiques de la maladie que sont : le dépôt d'amyloïde beta, les altérations synaptiques et les troubles mnésiques dans un modèle murin de la pathologie (Ceyzériat et al., 2018).
- Dans la **sclérose en plaques (SEP)**, l'activation microgliale et l'infiltration de cellules immunes comme des lymphocytes T et des macrophages coopèrent dans la mise en place d'une réponse inflammatoire

(Schwartz and Deczkowska, 2016). Celle-ci est ensuite maintenue par dysfonctionnement des cellules gliales : notamment de l'astrocyte, jouant un rôle majeur dans la sécrétion de cytokines et chimiokines proinflammatoires, à l'origine du recrutement de cellules immunes infiltrantes et participant à la formation des lésions (Colombo and Farina, 2016).

En conclusion, la neuroinflammation destructrice ou pathologique est associée à une réactivité des cellules gliales avec une forte production de cytokines et chimiokines ainsi qu'une infiltration de cellules immunes périphériques associée à une augmentation de la perméabilité de la BHE (Hawkins, 2005; DiSabato et al., 2016).

C. Autoimmunité et pathologies auto-immunes du SNC

Comme évoqué précédemment, le SI adaptatif est très finement régulé par des mécanismes de tolérance des éléments du soi. Ainsi, une rupture d'un ou plusieurs de ces mécanismes de tolérance va conduire à la production de LT et/ou de LB auto-réactifs fonctionnels et capables d'attaquer des cellules du soi.

i) Autoimmunité

L'auto-immunité est la reconnaissance par le système immunitaire d'éléments du soi (au niveau cellulaire ou tissulaire) comme étant étrangers et la mise en place d'une réaction dite auto-immune visant à détruire cette menace. Celle-ci met en œuvre une rupture de la tolérance et la production de lymphocytes auto-réactifs. Les réponses auto-immunes impliquent des réponses humorales et cellulaires qui sont complexes et dépendent de facteurs génétiques et environnementaux bien souvent méconnus (Lleo et al., 2010). Par ailleurs, les mécanismes conduisant à la présence de lymphocytes auto-réactifs dans le SNC sont très étudiés mais aucune conclusion ne peut encore être tirée quant à leur origine ni aux mécanismes leur permettant de d'accéder au parenchyme cérébral. Je vais maintenant décrire brièvement quelques-unes des pathologies auto-immunes neuroinflammatoires du SNC.

ii) La sclérose en plaques : le prototype des pathologies auto-immunes du SNC

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire chronique démyélinisante du SNC. La SEP suit une progression en trois phases : la première est une phase préclinique durant laquelle la maladie est déclenchée sous l'influence de facteurs environnementaux et génétiques, la deuxième une phase récurrente-rémittente au cours de laquelle des épisodes inflammatoires sont à l'origine de lésions visibles

par imagerie par résonance magnétique (IRM) et parfois de symptômes (troubles moteurs, sensoriels ou cérébelleux) et enfin une troisième phase dite progressive durant laquelle les troubles neurologiques s'aggravent. Certains patients ont une évolution différente et sont directement en phase progressive, la forme clinique portant le nom de progressive primaire (Baecher-Allan et al., 2018). La SEP est caractérisée par la présence de LT auto-réactifs pénétrant dans le SNC et sont réactivés en reconnaissant leurs Ag spécifiques. Ces LT sécrètent des cytokines/chimiokines et recrutent d'autres cellules immunes comme les LB ou les macrophages au niveau des lésions (Lassmann, 2005). Ces cellules sont impliquées dans les mécanismes de démyélinisation et d'atteinte axonale. La plupart des traitements sont immunomodulateurs ou immunosuppresseurs et visent à limiter l'entrée de cellules immunes dans le SNC et à réduire le nombre de poussées inflammatoires dans la phase récurrente-rémittente.

Cependant, la phase progressive de la SEP impliquerait des mécanismes différents : notamment une inflammation chronique, avec la sécrétion de cytokines activant les cellules gliales (astrocytes et microglies) participant ainsi à une démyélinisation mais aussi à une perte axonale et une mort neuronale. Les mécanismes pathologiques impliqués commencent à être élucidés et concerneraient une dysfonction mitochondriale, causée soit par mutation de l'ADN mitochondrial soit par la présence d'espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote et une excitotoxicité liée à une libération accrue de glutamate (Cicarelli et al., 2014; Baecher-Allan et al., 2018). Les modèles animaux de la SEP consistent en l'immunisation d'animaux contre des antigènes de la myéline principalement (MOG, MBP ou PLP) mais aussi des astrocytes (GFAP, AQP4, S100 β) ou des neurones (Neurofascine, complexe Contactine-2/Tag-1) (Lindner et al., 2015). Ainsi la SEP est une pathologie neuroinflammatoire complexe impliquant à la fois le SI et les cellules résidentes du SNC.

iii) Pathologies à auto-anticorps du SNC

Un certain nombre de pathologies du SNC sont caractérisées par la présence d'auto-anticorps dirigés contre des antigènes présents dans le SNC. C'est le cas du lupus érythémateux systémique (LES), de la **Neuromyéélite-Optique (NMO)** mais aussi des encéphalites auto-immunes souvent associées à des syndromes paranéoplasiques où les antigènes tumoraux peuvent présenter des similitudes avec ceux du SNC et provoquer une réaction auto-immune. Dans le LES, les patients présentent de nombreux auto-anticorps et certains sont dirigés contre l'ADN. Ces derniers peuvent présenter une réaction croisée avec les récepteurs au NMDA exprimés par les neurones ce qui expliquerait la présence de troubles cognitifs et d'une dépression, associées à la présence de ces auto-anticorps dans le liquide céphalo-rachidien des

patients (Lapteva et al., 2006; Arinuma et al., 2008) . Des modèles animaux ont permis de montrer que la présence dans le sang de ces auto-anticorps n'est pas suffisante pour reproduire la maladie. Une rupture de barrière permet l'entrée des auto-anticorps dans le SNC et particulièrement au niveau de l'hippocampe causant une perte de dendrites et une diminution de la mémoire spatiale (Brimberg et al., 2015). Des auto-anticorps dirigés contre des antigènes du SNC sont également responsables d'encéphalites auto-immunes. Ce syndrome est complexe et peut se manifester par des troubles cognitifs, épileptiques ou même musculaires, très souvent associés à la présence, dans le LCR des patients, d'auto-anticorps dirigés contre diverses protéines neuronales comme les récepteurs au glutamate AMPA, NMDA ou les protéines « *leucine-rich glioma inactivated*

-1 » (LGI1) et « *contactin-associated protein-like 2* » (CASPR2) (Bost et al., 2016; Lancaster, 2016). De plus, les symptômes varient en fonction de la protéine reconnue et de l'épitope ciblé.

La NMO est, quant à elle, caractérisée par la présence d'auto-anticorps dans le sang et le LCR des patients, et sont dirigés contre la protéine astrocytaire AQP4. Cette pathologie sera décrite dans le prochain chapitre.

La présence d'auto-anticorps dans la circulation sanguine n'est pas suffisante pour causer une pathologie du SNC. Cependant, par le biais d'une ouverture de la BHE leur donnant accès au SNC, et par la reconnaissance de leurs cibles neuronales ou gliales, ces auto-anticorps sont à l'origine de sévères perturbations des fonctions neurologiques.

D. Mécanismes d'action des auto-anticorps

Comme nous venons de le présenter, un certain nombre de pathologies du SNC est associée à la présence d'auto-anticorps dirigés comme des Ag du SNC. Ces auto-anticorps sont aussi très utiles pour le diagnostic de ces maladies, et leur **pathogénicité** a été démontrée grâce à l'utilisation de modèles animaux avec transfert passif d'anticorps dans le SNC, mais aussi par l'amélioration des symptômes avec les traitements comme les échanges plasmatiques et les immunoglobulines intraveineuses (Varley et al., 2018).

La présence d'autoanticorps dans le SNC et dans le LCR peut provenir soit de leur transfert passif depuis la circulation sanguine, soit d'une synthèse intrathécale. Dans la plupart des maladies à auto-anticorps du SNC, leur présence dans le SNC n'est que transitoire et les auto-anticorps proviennent majoritairement de la circulation sanguine (Brimberg et al., 2015) . Pour exercer leur effet délétère, ils doivent traverser la BHE ou la barrière sang-LCR, et les mécanismes restent encore méconnus. Une fois dans le SNC, ces auto-

Rappels bibliographiques

anticorps peuvent reconnaître des Ag neuronaux ou non-neuronaux, qu'ils soient extracellulaires, intracellulaires ou membranaires. Les mécanismes d'action d'un anticorps sont multiples via la reconnaissance d'une **protéine membranaire** (Figure 23) (Diamond et al., 2009). Un auto-anticorps peut donc exercer son effet via :

- L'action sur la cible en tant qu'agoniste/antagoniste/coagoniste du récepteur si la cible est un récepteur ou un canal (Figure 23a-c)
- La signalisation croisée de l'interaction entre l'anticorps sur sa cible et de récepteurs aux cytokines (Figure 23d)
- L'activation de la cascade du complément (Figure 23e)
- L'activation des récepteurs Fc (Figure 23f)
- L'internalisation de la cible (Figure 23g)
- Aucun effet fonctionnel sur la cible (Figure 23h)

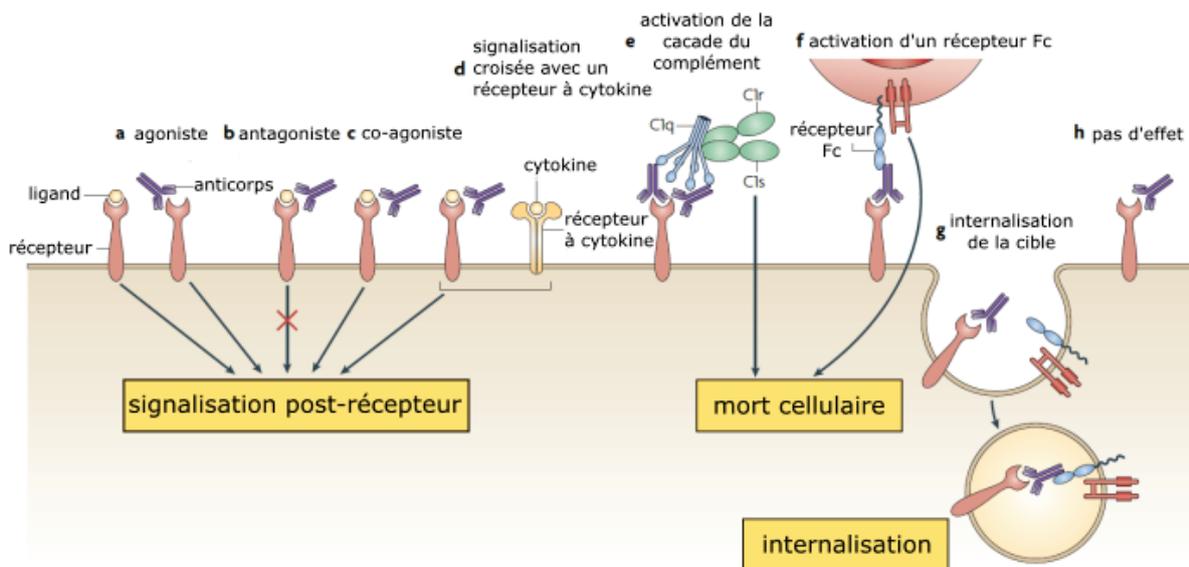


Figure 23 : Mécanismes d'action d'un auto-anticorps dirigé contre une protéine membranaire. a-c) Un autoanticorps reconnaissant un récepteur peut agir comme agoniste, antagoniste ou co-agoniste de celui-ci et provoquer une signalisation intracellulaire d) la signalisation d'un récepteur aux cytokines peut interagir avec celle de l'anticorps sur sa cible. e-f) un autoanticorps peut aussi activer la cascade du complément ou des récepteurs Fc provoquant la mort de la cellule cible. g) un autoanticorps peut aussi provoquer l'internalisation de sa cible avec d'autres protéines membranaires associées. h) l'autoanticorps peut aussi n'avoir aucun effet sur sa cible. Schéma issu de Diamond *et al.*, 2009.

La signalisation intracellulaire, faisant suite à la liaison de l'anticorps sur sa cible, peut faire intervenir le fragment cristallisable (Fc) ou le « *fragment antigen-binding* » (Fab). Le fragment Fc conduit à l'activation du système du complément avec la production de médiateurs, comme C5a, et le recrutement de complexes d'attaque, détruisant la cellule cible. De plus, le fragment Fc peut activer des récepteurs Fc (FcR) présent sur une cellule cible, comme les cellules microgliales ou les astrocytes, et initier le processus de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendant des anticorps (ou « *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* » – ADCC), conduisant également à la destruction de la cellule cible.

Mais l'action toxique ou modulatrice d'un anticorps dépend surtout de son fragment de liaison à l'antigène, Fab, qui peut soit neutraliser la cible, soit modifier ses fonctions ou altérer les fonctions de la cellule cible. En effet, un anticorps ciblant une protéine membranaire (récepteur, canal...) peut induire une cascade de signalisation intracellulaire modifiant les fonctions de la cellule cible. Il est ainsi possible que l'anticorps agisse sur le récepteur en activant ou bloquant ses fonctions, en conséquence modifiant les fonctions cellulaires. Il est également susceptible de modifier les interactions entre la molécule cible et les autres molécules membranaires, cytosoliques ou de la matrice extracellulaire. Enfin, l'anticorps peut provoquer l'endocytose de la molécule cible, parfois avec d'autres molécules partenaires, et de moduler leur expression membranaire (Diamond et al., 2009, 2013).

Les effets d'un auto-anticorps ou immunoglobuline de type G (IgG) dépendent de son sous-type. En effet, il existe quatre types principaux d'IgG : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Les IgG1, 3 et 4 sont spécifiques des protéines alors que les IgG2 reconnaissent préférentiellement des polysaccharides et les IgG4 sont plus spécifiques des allergènes (Vidarsson et al., 2014). La capacité des IgG à activer le complément est variable et suit l'ordre suivant : IgG3 > IgG1 > IgG2 > IgG4 (Rowley and Whittingham, 2015; Zhang et al., 2015). Leur capacité à se fixer à différents FcR est également dépendante de la sous-classe d'IgG. Les IgG1 et IgG3 se fixent, par exemple, fortement aux FcRI, FcRIIa et FcRIII alors que les IgG2 et IgG4 ne se fixent pas ou peu aux FcR (Vidarsson et al., 2014). Par ailleurs, les proportions de chaque sous-type d'IgG sont très dépendantes des pathologies. Par exemple, dans la NMO la détection de chacune de ces sous classes d'IgG 1, 2, 3 ou 4, par « *cell based assay* » et cytométrie en flux est de 97,8% , 37%, 6,5% et 6,5% respectivement (Isobe et al., 2012). Alors que dans le lupus érythémateux systémique les IgG1, 2, 3, 4 représentent respectivement 64,5% , 28,2%, 2,5% et 3,8% des IgG totales (Zhang et al., 2015).

L'action des auto-anticorps est également susceptible de dépendre de l'antigène ciblé et de l'affinité pour celui-ci.

Ainsi les mécanismes d'action des auto-anticorps sont complexes, divers et pathologie-dépendants et leur identification est cruciale dans le but d'améliorer les thérapies existantes. Nous allons à présent nous intéresser à la pathologie qui fait l'objet d'études au sein de notre équipe : la Neuromyéélite optique, une pathologie autoimmune, neuroinflammatoire et démyélinisante du SNC, caractérisée par la présence d'un autoanticorps pathogène dirigé contre l'astrocyte.

E. La Neuromyéélite Optique

i) Description, clinique et traitements

La Neuromyéélite Optique (NMO) est une pathologie rare, neuroinflammatoire et autoimmune du SNC. Aussi appelée **maladie de Devic**, elle tient son nom du neurologue lyonnais, Eugène Devic qui l'a décrite en 1894 chez des patients atteints de névrite optique et de myélite transverse aiguë. La NMO a longtemps été considérée comme un sous-type de sclérose en plaques et ce malgré des différences histologiques, immunologiques et radiologiques car elles partagent une caractéristique commune, la présence de lésions démyélinisantes et inflammatoires du système nerveux central (SNC). Cependant la découverte d'un auto-anticorps spécifique de la NMO (**IgG-NMO**), dirigé contre le canal hydrique AQP4 exprimé par l'astrocyte, a permis sa distinction de la SEP (Lennon et al., 2004; Lennon, 2005; Roemer et al., 2007) (**Figure 24A**).

La prévalence de la NMO varie de 0,37 à 10 pour 100000 personnes (Mori et al., 2018) et la maladie touche plus de femmes que d'hommes, variant de 3 à 9 femmes pour 1 homme, selon les aires géographiques (Sahraian et al., 2013; Kim et al., 2017). La NMO est une maladie évoluant le plus souvent par poussées, qui correspondent à la survenue des symptômes, poussées qui sont plus sévères que celles de la SEP. Parmi les symptômes observés, les patients présentent souvent des troubles moteurs (paraplégie ou tétraplégies), des dysfonctionnements sphinctériens ainsi que des troubles visuels pouvant conduire à une cécité, temporaire ou permanente.

ii) Spectre de la NMO (NMOSD) :

Les critères pour le diagnostic de la NMO ont évolué et ont donné lieu de 2015 à l'établissement de nouveaux critères (Wingerchuk et al., 2006, 2015) qui ont permis de mieux définir le spectre de la NMO, appelé NMO « *spectrum disorder* » (SD). Les critères principaux, établis pour des patients adultes, sont la

Rappels bibliographiques

présence d'au moins un épisode de i) névrite optique, et/ou ii) myélite aiguë, et/ou iii) syndrome de l'*area postrema*, et/ou d'un syndrome du tronc cérébral, et/ou v) d'une narcolepsie symptomatique ou d'un syndrome diencephalique aigu avec des lésions diencephaliques typiques et/ou enfin vi) d'un syndrome cérébral avec de lésions cérébrales typiques. Ces critères peuvent être sous-divisés selon la présence ou l'absence d'IgG anti-AQP4. En cas de présence d'anti-AQP4 le patient doit respecter au moins un des critères principaux, être positifs aux tests de détection des anti-AQP4 (plus spécifiquement aux « *cell-based assay* ») et aucun autre diagnostic alternatif ne doit être possible. Pour les patients ne présentant pas d'anti-AQP4, ils doivent au moins présenter deux des critères principaux de la NMO et au moins une des attaques cliniques doit être caractérisée par une névrite optique, une myélite aiguë avec des lésions de type myélite transverse longitudinale étendue, ou un syndrome de l'*area postrema*. Aucun autre diagnostic alternatif ne doit pouvoir être proposé. La connaissance du statut sérologique du patient est donc primordiale pour établir un diagnostic et inclure un patient donné dans le spectre de la NMO mais aussi pour le choix du traitement (**Boîte 6**).

Boîte 6 : Traitements de la NMO et nouvelles voies thérapeutiques proposées.

Actuellement, les traitements disponibles sont une injection intraveineuse (IV) de corticostéroïdes pour traiter les attaques aiguës qui sont considérées comme une urgence thérapeutique. Les échanges plasmatiques sont proposés en cas d'absence de réponse à la corticothérapie. Afin de prévenir les rechutes, des traitements immunomodulateurs ou immunosuppresseurs, dont le rituximab qui a un effet anti-lymphocyte B, sont proposés (Jacob *et al.*, 2013). D'autres traitements comme l'azathioprine ou le mycophénolate mofétil sont également proposés et agissent en bloquant la prolifération et la différenciation des lymphocytes (Borisow *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2018; Collongues *et al.*, 2019). De nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant des anticorps monoclonaux sont proposées. C'est le cas de l'Inelizumab un anticorps monoclonal anti-CD19 qui déplete à la fois en lymphocytes B mais aussi en plasmocytes (Collongues *et al.*, 2019). Des traitements dirigés contre le complément sont aussi proposés, comme l'anticorps monoclonal anti-C5 eculizumab, mais l'activation de la cascade du complément intervient dans diverses atteintes du SNC et n'est pas spécifique de la NMO ou des anti-AQP4 (Carpanini *et al.*, 2019). Ainsi la plupart des traitements sont immunosuppresseurs, anti-inflammatoires et peu spécifiques de la NMO. De plus, aucun traitement dirigé contre l'AQP4 n'est actuellement disponible. Une nouvelle stratégie a émergé avec l'inhibition de l'interaction des anti-AQP4 avec l'AQP4 par le biais d'un anticorps monoclonal l'Aquaporumab via une compétition entre les anticorps de patients et l'Aquaporumab pour l'AQP4. Celui-ci empêche l'activation du complément et la toxicité à médiation cellulaire et prévient la démyélinisation et la formation de lésions (Tradtrantip *et al.*, 2012). Cependant ces observations ont été réalisées sur des modèles *in vitro* et *in vivo*, elles restent à confirmer dans des études cliniques. Ainsi, de nouvelles voies thérapeutiques pourraient être exploitées dans le futur avec le développement de modulateurs de l'expression et de la fonction d'AQP4 (Collongues *et al.*, 2019).

iii) Anatomopathologie et mécanismes

La NMO est caractérisée par une démyélinisation et une perte axonale touchant à la fois la substance blanche et la substance grise (**Figure 24C**). Une étude anatomopathologique (Lucchinetti, 2002) a permis de mieux comprendre les mécanismes cellulaires présents dans les différentes lésions : actives (récentes ou anciennes), inactives et présentant une remyélinisation. Ils ont ainsi montré l'infiltration de

macrophages et cellules microgliales ainsi que de lymphocytes B et de quelques lymphocytes T CD8+ dans les lésions démyélinisantes. Cela était associé à la présence périvasculaire de granulocytes éosinophiles dans les lésions actives récentes. Enfin la présence d'immunoglobulines et de complément autour des vaisseaux était également associée à des lésions démyélinisantes actives. Une caractéristique histologique de la NMO est la présence d'une démyélinisation, notamment dans le nerf optique, associée à une perte d'AQP4 qui n'est pas observée chez les patients SEP (**Figure 24B**). De plus, la démyélinisation, la perte axonale et la présence de cellules microgliales activées et macrophages infiltrés, dans les lésions de la moelle épinière, sont associées à une perte d'AQP4, de GFAP et du transporteur au glutamate EAAT2 (Lucchinetti et al., 2014). La perte d'AQP4 est parfois observée dans des lésions où la myéline et la GFAP sont préservées (**Figure 24C**).

Cependant, la NMO est une maladie complexe et la présence de **six différents types de lésion** a été décrite (Misu et al., 2013).

- Les lésions de type I présentent un dépôt de complément sur les astrocytes, une infiltration de granulocytes, une mort astrocytaire ainsi qu'une démyélinisation et une perte axonale mineure.
- Les lésions de type II présentent les mêmes caractéristiques que celles de type I mais avec la présence d'une destruction tissulaire et de la formation de lésions cystiques et nécrotiques.
- Les lésions de type III sont présentes dans les tracts de substance blanche de la moelle épinière et sont caractérisées par une démyélinisation et une dégénérescence wallérienne des fibres nerveuses associées à une astrogliose réactive.
- Les lésions de type IV sont caractérisées par une perte d'AQP4 autour de la lésion active sans autres altérations structurelles (préservation de l'expression d'aquaporine-1, de la myéline et des axones).
- Les lésions de type V ne présentent pas toujours de démyélinisation ou de perte axonale mais sont caractérisées par une perte d'AQP4 et des astrocytes gonflés contenant des vacuolisations mais pas de dépôt de complément.
- Les lésions de type VI présentent les mêmes altérations que celles de type V mais avec une démyélinisation, une mort oligodendrocytaire et une perte axonale modérée.

Ainsi, plusieurs mécanismes seraient impliqués dans la physiopathogénèse de la NMO et seraient responsables de l'hétérogénéité des caractéristiques histologiques des lésions citées ci-dessus.

Pour conclure, cette étude suggère une atteinte primaire des astrocytes, conduisant à une profonde modification de leur fonction, qui précède la démyélinisation et la perte axonale.

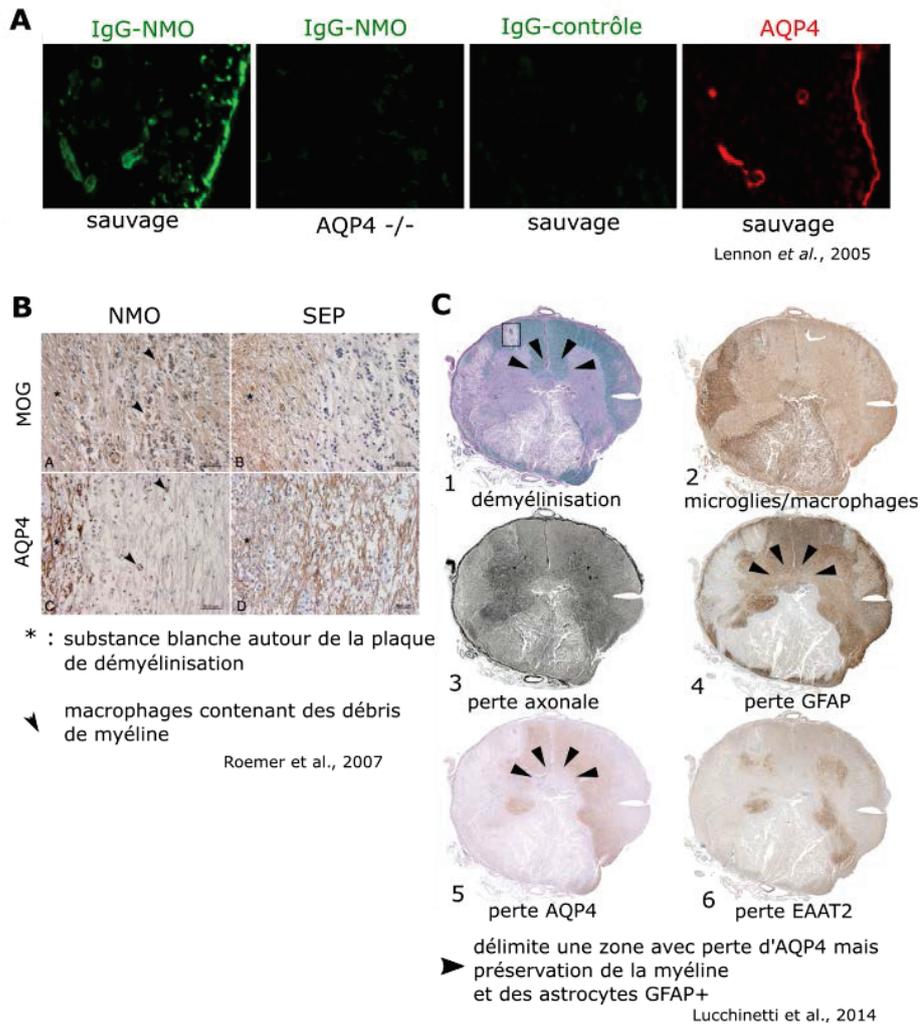


Figure 24 : Autoanticorps anti-AQP4 et caractéristiques des lésions de la NMO. **A)** Immunomarquage fluorescent des IgG humaines (vert) et de l'AQP4 (rouge) sur cerveau de souris : les autoanticorps de patients NMO, appelés IgG-NMO, reconnaissent l'AQP4 exprimée par les astrocytes autour des vaisseaux et à la surface du cerveau (*glie limitans*). La spécificité de cette reconnaissance est vérifiée car il n'y a pas de marquage des IgG-NMO chez des animaux n'exprimant pas l'AQP4, et il n'y a pas de marquage des IgG-Contrôle issues de donneurs sains. **B)** Le marquage de l'AQP4 et de la MOG sur des coupes de nerfs optiques de patients NMO et SEP révèle la présence d'une démyélinisation (avec la présence de débris de myéline dans des macrophages identifiés avec des têtes de flèche) associée à une perte d'AQP4 dans la lésion uniquement chez les patients NMO, l'AQP4 est préservée dans la substance blanche autour de la plaque (marquée à un astérisque). **C)** Caractérisation histologique d'une lésion étendue de la moelle épinière chez un patient NMO présentant : une démyélinisation (1 : coloration au « luxol fast blue »), la présence de macrophages infiltrés ou microglies activées (2 : marquage Kimp1), une perte axonale (3 : coloration de Bielschowsky) mais aussi une perte de GFAP (4 : marquage GFAP), d'AQP4 (5 : marquage AQP4) et du transporteur au glutamate EAAT2 (6 : marquage EAAT2) dans les astrocytes. La perte d'AQP4 est également retrouvée dans une zone où la myéline et la GFAP sont préservées (têtes de flèches). Figures issues de Lennon et al., 2005, Roemer et al., 2007 et Lucchinetti et al., 2014.

iv) Auto-anticorps et NMO

Les anticorps dirigés contre l'AQP4 sont les plus fréquents et les mieux décrits. Plus récemment des auto-anticorps contre la protéine de myéline MOG (anti-MOG) ou contre la « glucose-regulated protein 78 » (GRP78) ont été associés à la NMO.

Anti-AQP4

La majorité des patients NMOSD (68-91%) présentent des anticorps **anti-AQP4** qui sont hautement spécifiques (85-99%) (Lennon et al., 2004; Lennon, 2005; Papadopoulos and Verkman, 2012). Les auto-anticorps dirigés contre l'AQP4 sont non seulement un outil diagnostique, mais participent aussi dans la physiopathologie de la NMO. La pathogénicité de cet auto-anticorps a été démontrée car ils induisent une endocytose et une dégradation de l'AQP4 mais aussi sont capables d'activer le complément et causant des dommages astrocytaires (Hinson et al., 2007). La présence des astrocytes au niveau des nœuds de Ranvier suggère qu'une atteinte de ces prolongements astrocytaires pourrait être à l'origine de la démyélinisation. L'internalisation de l'AQP4 dépend de l'isoforme M1 ou M23 de l'AQP4 ciblée par l'anticorps, et une étude a montré que l'isoforme M23, présente au sein des « *orthogonal array of particules* » (OAPs), n'est pas ou peu internalisée par les anti-AQP4 (Hinson et al., 2012). Cependant la fixation de l'anti-AQP4 sur les OAPs provoque un recrutement du complément, donc une potentielle cytotoxicité dépendante du complément. Les auteurs ont également observé une perturbation de l'homéostasie hydrique induite par les anti-AQP4. Ainsi, l'anti-AQP4 est capable de profondément modifier la fonction de l'astrocyte ou de provoquer sa destruction, caractérisant l'**astrocytopathie autoimmune** décrite dans la section suivante. Enfin, la présence d'anti-AQP4 a un rôle prédictif du risque de rechute ou d'évolution vers une NMO chez les patients présentant une myélite transverse aiguë extensive ou d'une névrite optique (Weinshenker et al., 2006; de Seze et al., 2008; Matiello et al., 2008).

Anti-MOG et anti-GPR78

D'autres auto-anticorps seraient impliqués dans la NMO. La présence d'anticorps **anti-MOG**, une protéine de myéline, est associée à une démyélinisation du SNC. Tout comme pour l'AQP4, la présence d'anticorps anti-MOG dans le sérum ou le LCR des patients (testée par « *cell based assay* ») est souvent associée à un syndrome appelé « *acute disseminated encephalomyelitis* » (ADEM) chez les enfants ou chez certains patients NMO présentant une névrite optique et une myélite transverse (Ramanathan et al., 2018). L'étude sur une cohorte française de 197 patients présentant des anticorps anti-MOG a montré la présence de rechute après 2 ou 5 ans chez respectivement 45% ou 62% des patients mais avec de meilleurs résultats

moteurs et visuels en comparaison avec les patients présentant des anti-AQP4 (Cobo-Calvo et al., 2018). De façon intéressante, le « sex-ratio » est de 1 femme pour 1 homme, chez les patients présentant des anti-MOG, alors qu'il est de 3 à 9 femmes pour 1 homme, chez les patients présentant des anti-AQP4.

Ces distinctions suggèrent des mécanismes physiopathologiques différents pour les patients présentant des anti-AQP4 ou des anti-MOG, et cela malgré certaines similitudes de présentation clinique. L'individualisation des anti-MOG en une nouvelle entité clinique a récemment été suggérée afin d'améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients (Weber et al., 2018).

La présence d'anticorps dirigés contre la « *glucose-related protein 78* » (**GRP78**) a notamment été associée à une perturbation de la BHE dans la NMO mais ne sont pas spécifiques de cette pathologie (Shimizu et al., 2012). Ces anticorps sont responsables d'une diminution d'expression de la Claudine-5, une protéine de jonction serrée des cellules endothéliales. Dans un modèle murin d'injection de ces anticorps en périphérie, les anticorps induisaient une augmentation de l'infiltration du fibrinogène, de l'albumine et d'IgG humaines dans le parenchyme cérébral, suggérant un dysfonctionnement de la BHE.

Ainsi la présence d'anticorps dirigés contre d'autres cibles que l'AQP4 peut également participer à la physiopathogénèse de la NMO. Cependant seule la présence des anti-AQP4 est associée à une astrocytopathie autoimmune et représente une caractéristique spécifique de la NMO.

v) *Dysfonction astrocytaire*

La NMO est considérée comme une **astrocytopathie autoimmune** par la présence d'anticorps anti-AQP4 dirigés contre l'astrocyte (Kira, 2011; Lucchinetti et al., 2014). Ainsi l'atteinte primaire est dirigée contre l'astrocyte et conduit à une démyélinisation et une perte axonale. Des études ont pu démontrer le rôle pathogène des anti-AQP4 et leur implication dans l'astrocytopathie qui comprend une mort astrocytaire dépendant du complément et/ou une dysfonction astrocytaire.

L'une des principales caractéristiques de la **dysfonction astrocytaire** est la diminution ou la perte d'expression d'AQP4 qui précéderait la perte astrocytaire, la démyélinisation et la perte axonale. La présence de GFAP dans le LCR des patients pendant les poussées souligne l'atteinte astrocytaire primaire (Lucchinetti et al., 2014). Ainsi l'anti-AQP4 peut provoquer la mort astrocytaire mais peut également être responsable d'une dysfonction astrocytaire. En l'absence de complément, l'anti-AQP4 est capable de provoquer une endocytose de l'AQP4 et une perte de l'expression de GLT1 (aussi appelé EAAT2) associée à une diminution du transport du glutamate, suggérant la présence de ces deux molécules dans des

complexes macromoléculaires à la membrane de l'astrocyte provoquant leur co-endocytose (Hinson et al., 2008).

Notre équipe a démontré la capacité des anti-AQP4 à diminuer l'expression d'AQP4 *in vitro* et aussi *in vivo* dans un modèle d'infusion chronique d'IgG de patients dans le ventricule latéral, le rat-NMO (Marignier et al., 2010, 2016). La diminution d'expression membranaire d'AQP4 est accompagnée d'une diminution d'expression de GLT1 (Marignier et al., 2010) mais également une diminution de la recapture du glutamate (Marignier et al., 2016). L'augmentation des concentrations extracellulaires de glutamate, due à ces altérations, est responsable de la mort des oligodendrocytes dans une culture gliale mixte mise en contact avec les IgG de patients (Marignier et al., 2010). De plus, dans notre modèle de rat-NMO, nous avons pu mettre en évidence une perte axonale et une démyélinisation caractérisée par une diminution d'expression de protéines de myéline comme la MBP. Ces altérations étaient associées à des troubles moteurs avec une diminution des performances au test Rotarod® des rat-NMO en comparaison aux rats infusés avec des IgG d'individu sain (Marignier et al., 2016). Plus récemment, il a été montré que la co-endocytose d'AQP4 et de GLT1 impliquerait l'interaction des anti-AQP4 avec des FcR présents à la membrane de l'astrocyte, ce mécanisme ne faisant donc pas intervenir le complément (Hinson et al., 2017).

Le sérum de patients présentant des anti-AQP4 est aussi responsable de la production d'une réponse immune dans des cultures d'astrocytes de rats traitées, avec notamment la production de cytokines et chimiokines proinflammatoires (Howe et al., 2014). Cette étude a plus spécifiquement montré l'augmentation de l'expression des gènes de la lipocaline-2, du complément C3, de chimiokines comme CCL20, CXCL1, CCL2 et CCL5 en présence de sérum de patients. La production et la libération des chimiokines CCL5, CXCL1 et CCL2 a également été démontrée.

Ainsi les anticorps anti-AQP4, seraient responsables d'une profonde modification du phénotype astrocytaire, non encore entièrement défini, participant à des altérations caractéristiques de la NMO.

vi) Déficit cognitif dans la Neuromyélie Optique

De récentes études ont précisé les symptômes chez les patients atteints de Neuromyélie optique et identifié des déficits cognitifs. Une première étude des altérations cognitives chez les patients NMO a été réalisée par un groupe français en 2008 et a montré une diminution des performances cognitives comparables à celles des patients SEP (Blanc et al., 2008). Une méta-analyse, regroupant les résultats de

nombreuses études, a permis de montrer que les performances cognitives, telles que l'attention, le langage, la mémoire, la vitesse de traitement des informations et les fonctions exécutives, des patients NMO sont moins bonnes que celles de sujets sains mais sont similaires aux patients SEP (Meng et al., 2017). Alternativement, une autre étude a montré que les patients SEP ont plus fréquemment des atteintes cognitives que les patients NMO (Kim et al., 2016). Cependant, la prévalence de ce type d'altération est difficile à évaluer : elle varie entre 35% et 67% des patients NMO selon les études, et serait liée aux différentes méthodologies utilisées pour évaluer les performances cognitives (Eizaguirre et al., 2017).

Les mécanismes conduisant à ces altérations cognitives ne sont à ce jour pas encore élucidés mais pourraient concerner : i) une perte de connectivité liée à une atteinte de la substance blanche ii) une perte de substance grise dans les régions sous-tendant les différentes fonctions cognitives, et/ou ou iii) une dysfonction astrocytaire impliquant les anticorps anti-AQP4 et modifiant la transmission synaptique. C'est pourquoi des études de corrélations ont été réalisées mais n'ont pour l'instant pas permis de trancher sur les mécanismes conduisant aux altérations cognitives observées chez les patients NMO.

Des études récentes réalisées chez les patients NMO ont associé l'imagerie par résonance magnétique (IRM) à des tests de performances cognitives. Aucune n'a montré de corrélation entre les lésions de la substance blanche et les performances cognitives des patients (Eizaguirre et al., 2017). Cependant, une étude par imagerie du tenseur de diffusion, détecte des anomalies présentes au sein du corps calleux, du gyrus cingulaire antérieur et du gyrus frontal médian, corrélées à des déficits cognitifs chez des patients, sans lésions cérébrales visibles (He et al., 2011). Une étude s'intéressant à l'analyse des réseaux de substance blanche a montré une diminution de la connectivité de la substance blanche associée aux déficits cognitifs des patients (Cho et al., 2018). Par ailleurs, l'étude des altérations de la substance grise chez les patients a montré une atrophie de la substance grise profonde avec une réduction du volume du thalamus (Hyun et al., 2017) et une atteinte de la substance grise corticale (Wang et al., 2017). Ces altérations de la substance grise sont corrélées avec des déficits cognitifs mais pas avec des handicaps physiques (Liu et al., 2018).

Enfin il a été montré que l'AQP4 était impliquée dans les mécanismes de consolidation de la mémoire et de plasticité synaptique (Fan et al., 2013; Scharfman and Binder, 2013). L'ensemble de ces observations sont décisives quant à la présence de déficits cognitifs chez le patient NMO. Sur le plan mécanistique, la diminution d'expression d'AQP4 conduit à des modifications du cytosquelette de l'astrocyte et de l'expression de Cx43 (Nicchia et al., 2005).

Ainsi, via l'induction d'altérations fonctionnelles astrocytaires, les anticorps dirigés contre l'AQP4 pourraient participer à une altération de la transmission et de la plasticité synaptique et conduire à des déficits cognitifs. L'utilisation de modèles animaux s'avère cruciale afin d'élucider le rôle des anti-AQP4 dans les altérations cognitives de la NMO.

vii) L'implication des connexines dans la Neuromyéélite Optique

Un rôle des connexines gliales a été suspecté dans les pathologies neurodégénératives et neuroinflammatoires du SNC. Plus spécifiquement, l'expression des connexines astrocytaires et oligodendrocytaires est modifiée dans la sclérose en plaques et a été associée à la progression de la maladie. Dans la NMO, une étude anatomopathologique de l'expression des connexines astrocytaires et oligodendrocytaires dans les tissus de patients a montré une altération de leur expression (Masaki et al., 2013). En effet, au sein des lésions actives périvasculaires, une diminution d'expression d'AQP4 et de la connexine astrocytaire Cx43 est présente et s'étend au-delà de la zone démyélinisée. De même, une perte d'expression des Cx32 et Cx47 oligodendrocytaires est observée dans les lésions chroniques et ce même au-delà de la zone démyélinisée. De façon intéressante un grand nombre d'astrocytes réactifs exprimant la Cx43 ont été détectés dans ces lésions. Dans un des cas, analysés en anatomopathologie, la présence d'anticorps anti-AQP4 est associée à une astrocytopathie, caractérisée par une perte d'astrocytes exprimant la GFAP et une absence d'AQP4 et de Cx43 sur les astrocytes épargnés. Ces anomalies sont associées à une démyélinisation, caractérisée par une perte d'expression de la protéine de myéline MAG ainsi qu'une mort oligodendrocytaire. La perte de Cx43 et l'astrocytopathie sont corrélées avec une progression rapide de la maladie et un fort taux de mortalité, en comparaison à des patients ne présentant pas de perte de la Cx43. L'ensemble de ces observations souligne l'idée d'une implication cruciale de la Cx43 dans la physiopathogénèse de la NMO. De plus, un lien fonctionnel entre AQP4 et Cx43 a été démontré dans les astrocytes murins avec une co-régulation de l'expression de ces deux protéines (Nicchia et al., 2005). Récemment, une augmentation de l'expression membranaire de la Cx43 et du nombre de jonctions communicantes composées de Cx43 et de Cx30, a été mise en évidence chez des animaux AQP4^{-/-} (Katozi et al., 2017). Ainsi, un lien fonctionnel entre AQP4 et connexines est fortement suggéré et leurs expressions pourraient être co-modulées en présence d'auto-anticorps anti-AQP4.

QUESTIONS CLES, HYPOTHESE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

La Neuromyéélite optique est aujourd'hui considérée comme une astrocytopathie autoimmune, dont les mécanismes sont étroitement liés à la présence d'anticorps anti-AQP4 permettant de la différencier de la sclérose en plaques. L'astrocyte étant une cellule centrale dans le fonctionnement du SNC, la modification de ses fonctions peut avoir des conséquences multiples, délétères ou bénéfiques, qui sont encore mal connues dans les mécanismes de physiopathogenèse de la NMO. Bien qu'il soit clair aujourd'hui que l'atteinte astrocytaire soit le *primum movens* de la cascade lésionnelle qui se déroule au cours de la NMO, les liens entre astrocytopathie et démyélinisation et astrocytopathie et perturbation neuronale, aboutissant à des troubles cognitifs, restent mal compris.

Nous allons donc maintenant détailler les questions clés qui ont fait l'objet de ce travail de thèse.

Quelles sont les caractéristiques de l'astrocytopathie auto-immune dans la NMO ?

La présence d'une dysfonction astrocytaire, et plus particulièrement d'astrocytes réactifs, est une caractéristique de nombreuses pathologies du SNC. Bien que la NMO soit aujourd'hui reconnue comme une astrocytopathie, peu d'éléments ont été apportés pour la caractérisation précise du phénotype astrocytaire induit par la maladie. L'effet pathogène des autoanticorps anti-AQP4 a principalement été étudié en présence de complément où il induit une destruction de l'astrocyte (Saadoun et al., 2010). Peu de données sont actuellement disponibles sur l'effet *per se* de l'IgG-NMO sur l'astrocyte. En effet, le terme « astrocytopathie » comprend la **perte astrocytaire** mais aussi la **modulation des fonctions de l'astrocyte**. Ainsi la perte d'AQP4 peut être variable et observée avec ou sans perte astrocytaire, comme souligné par la présence de démyélinisation dans des régions où l'astrocyte est préservé (Misu et al., 2013; Lucchinetti et al., 2014). Le groupe de Vanda Lennon de la *Mayo Clinic* a démontré un effet direct des IgG-NMO avec la co-endocytose de l'AQP4 et de GLT-1 (EAAT2) (Hinson et al., 2008, 2017). Nos travaux précédents ont également permis de valider cette observation et ont démontré une altération de l'homéostasie du glutamate (Marignier et al., 2010, 2016). L'augmentation du glutamate extracellulaire serait en partie responsable de la démyélinisation et de la modulation synaptique mais n'est probablement pas l'unique caractéristique de la dysfonction astrocytaire. En effet, la perte de GLT-1 peut être retrouvée dans d'autres pathologies neuroinflammatoires telles que la SEP.

Par ailleurs, Les modifications du phénotype et des fonctions astrocytaires observées dans divers processus pathologiques peuvent avoir des effets bénéfiques ou délétères sur les cellules environnantes.

Questions clés et objectifs

C'est pourquoi une meilleure caractérisation des effets spécifique d'IgG-NMO sur le phénotype et les fonctions astrocytaires est indispensable à la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la NMO. L'identification d'altérations spécifiques pourrait concerner différentes grandes fonctions de l'astrocyte, connues pour jouer un rôle dans le maintien des fonctions du SNC.

Altération des fonctions de maintien de l'homéostasie du SNC : La modification de l'expression d'AQP4 et GLT-1 suggère que l'IgG-NMO peut induire une réorganisation de l'expression d'autres protéines membranaires. Il serait donc possible que l'expression d'autres protéines membranaires astrocytaires telles que le transporteur au glutamate GLAST (EAAT1), le canal potassique Kir4.1 ou les connexines soient également modifiée par les IgG-NMO. Ces protéines sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie du milieu extracellulaire régulant les concentrations en ions et en neurotransmetteurs, tels que le glutamate. Ces molécules sont particulièrement enrichies dans les prolongements astrocytaires, où l'expression d'AQP4 est particulièrement importante (Boulay et al., 2017). Une perturbation de l'expression de ces protéines pourrait être induite par IgG-NMO et caractériser une dysfonction astrocytaire conduisant à une rupture de l'homéostasie du SNC.

Production d'un milieu inflammatoire : dans de nombreux contextes pathologiques, l'astrocyte subit des modifications phénotypiques conduisant à un phénotype réactif et proinflammatoire. Cette modification du phénotype astrocytaire est généralement associée à l'expression de cytokines et chimiokines proinflammatoires. Celle-ci peut être provoquée par différents stimuli induisant l'activation de voies intracellulaires et la transcription de gènes. Une hypothèse voudrait que les IgG-NMO soit responsables de l'activation de voies intracellulaires conduisant à la production de cytokines et chimiokines. Une étude a démontré l'expression de chimiokines proinflammatoires par les astrocytes traités par le sérum ou les IgG de patients NMO (Howe et al., 2014). Cependant le lien avec la présence d'anticorps anti-AQP4 et la production de cytokines n'a pas été établi et ces molécules pourraient jouer un rôle crucial dans le recrutement de cellules immunes, l'activation microgliale et la démyélinisation.

Astroglie réactive et altérations morphologiques de l'astrocyte : l'induction d'un fort degré de réactivité astrocytaire pourrait également conduire une modification morphologique et fonctionnelle de l'astrocyte. La réactivité astrocytaire, identifiée par une hypertrophie, la superposition des domaines occupés par les astrocytes et l'augmentation de l'expression de GFAP, peut avoir des effets délétères sur la survie neuronale et la remyélinisation (Sofroniew, 2009).

Quels sont les mécanismes associant dysfonction astrocytaire et démyélinisation ?

La NMO est caractérisée par une démyélinisation et une perte axonale. Cependant, à ce jour, et bien que le rôle pathogénique des anticorps anti-AQP4 ait été démontré, les mécanismes conduisant d'un astrocytopathie à la démyélinisation restent méconnus. Plusieurs hypothèses ont été proposées.

Infiltration de cellules immunes, d'IgG et activation de la cascade du complément : Les lésions démyélinisantes actives de la NMO sont caractérisées par l'infiltration de cellules immunes notamment de granulocytes et de lymphocytes mais aussi par des dépôts d'IgG et de complément autour des vaisseaux (Lucchinetti, 2002). La reconnaissance de l'astrocyte par les IgG-NMO pourrait induire l'activation de la cascade du complément et provoquer la destruction de l'astrocyte. La perte astrocytaire conduirait à la démyélinisation par des mécanismes encore mal connus. Les cellules infiltrées sont également susceptibles de libérer des molécules proinflammatoires telles que des cytokines, ayant des effets délétères sur les oligodendrocytes. Cependant, ces mécanismes n'expliquent pas la présence de lésions caractérisées par une perte d'AQP4 et une démyélinisation, en absence de dépôt de complément ou de destruction astrocytaire.

Altération des fonctions astrocytaires et la rupture d'homéostasie au glutamate : Nos précédents travaux ont démontré une altération de la recapture du glutamate qui a un effet excitotoxique sur l'oligodendrocyte (Marignier et al., 2010, 2016). La dysfonction astrocytaire, caractérisée par une perte d'expression des transporteurs au glutamate pourrait donc être impliquée dans la démyélinisation. Une libération de glutamate par l'astrocyte et l'augmentation des concentrations de glutamate pourrait avoir des effets excitotoxiques pour les neurones et les oligodendrocytes, conduisant à une perte axonale et une démyélinisation.

Réactivité astrocytaire et formation d'un milieu proinflammatoire : Les astrocytes et les cellules microgliales sont impliquées dans la neuroinflammation. Ces cellules, activées par différents stimuli (infections, lésions, hypoxie...), produisent des cytokines et chimiokines proinflammatoires qui peuvent avoir des effets délétères sur la myéline. En effet, la myélinisation est un processus finement régulé qui peut être altéré par la perte de facteurs de croissance promouvant la myélinisation ou la présence de facteurs inhibant la différenciation et la myélinisation (tels que l'IL-1 β , le TNF- α ou l'IFN- γ) (Ben Haim et al., 2015; Kiray et al., 2016) . De plus, la présence de chimiokines et cytokines pourrait participer à l'infiltration de cellules immunes et aux mécanismes de démyélinisation à médiation cellulaire. Ainsi les

IgG-NMO, en se fixant à l'AQP4 ou aux récepteurs Fc sur l'astrocyte, pourraient induire l'activation de voies intracellulaires conduisant à la production de molécules proinflammatoires, participant à la démyélinisation (Burda and Sofroniew, 2014). Ce phénotype astrocytaire réactif peut être modulé par une cytokine anti-inflammatoire, le TGF- β 1, conduisant à un phénotype astrocytaire non proinflammatoire et prévenant les effets délétères des astrocytes réactifs sur les neurones (Liddel et al., 2017).

Altération des communications intercellulaires et rupture du réseau neuroglial : L'une des principales caractéristiques de l'astrocyte est sa forte expression en connexines et la formation de nombreuses **jonctions communicantes** permettant l'échange entre astrocytes, et astrocytes-oligodendrocytes de petites molécules comme des substrats énergétiques (glucose, lactates) et des ions (K^+ et le Ca^{2+}). Les connexines forment également des **hémicanaux** permettant l'échange de gliotransmetteurs tels que le glutamate ou l'ATP ou d'ions. Ces deux fonctions sont impliquées dans la formation d'un réseau neuroglial crucial pour les fonctions du SNC, notamment pour la myélinisation. En effet, la délétion des connexines astrocytaires et/ou oligodendrocytaires résulte en une altération de la myéline (Li et al., 2014).

L'altération de l'expression des connexines astrocytaire a été identifiée dans des pathologies neuroinflammatoires comme la maladie d'Alzheimer ou la SEP mais aussi dans la NMO. Cependant une seule étude, à notre connaissance, a rapporté une baisse d'expression des connexines astrocytaires dans la NMO sans pour autant démontrer un lien avec la présence d'anticorps anti-AQP4 (Masaki et al., 2013). Enfin un lien fonctionnel entre AQP4 et Cx43 a été démontré, leurs expressions étant co-modulées dans un modèle murin de « knock-down » de l'AQP4. Les IgG-NMO, en ciblant l'AQP4 astrocytaire, pourraient moduler l'expression et/ou la fonction des connexines. La perte de fonction des jonctions communicantes pourrait conduire à une rupture du réseau neuroglial et à la **perte de support trophique** pour les oligodendrocytes, participant à la démyélinisation. De plus, l'ouverture des hémicanaux, démontrée en condition inflammatoire (Retamal et al., 2007a), pourrait conduire à une **libération de molécules excitotoxiques** pour les oligodendrocytes et les neurones telles que l'ATP et le glutamate.

Tous ces mécanismes ne sont pas exclusifs et pourraient participer et coopérer à la démyélinisation induite par les IgG-NMO.

Quels sont les mécanismes à l'origine des troubles cognitifs chez les patients ?

Des troubles cognitifs ont été identifiés chez 35 à 67% des patients NMO avec une diminution des performances aux tests de mémoire de travail, d'attention ou de langage (Eizaguirre et al., 2017; Meng et al., 2017). Ces troubles sont progressifs et ne sont pas aggravés durant les poussées de la maladie, suggérant des mécanismes physiopathologiques différents des processus lésionnels.

Atrophie et perte neuronale : Plusieurs études ont démontré une corrélation entre les atteintes cognitives et des anomalies de la substance blanche ou grise avec des lésions cérébrales (He et al., 2011; Hyun et al., 2017; Wang et al., 2017; Cho et al., 2018; Liu et al., 2018). Une perte de volume et une atrophie dans des structures corticales ou sous-corticales (thalamus, hippocampe) pourrait expliquer ces atteintes cognitives. Cependant les mécanismes conduisant à ces altérations ne sont pas connus.

IgG-NMO et déficits cognitifs : Les déficits cognitifs pourraient résulter d'altération de la transmission et/ou de la plasticité synaptique. Les IgG-NMO sont susceptibles de jouer un rôle dans ces altérations, l'AQP4 étant impliquée dans la consolidation mnésique et la plasticité synaptique. Les astrocytes étant des cellules essentielles à la régulation de la transmission synaptique, notamment via la gliotransmission, une altération de leurs fonctions, induite par IgG-NMO, pourrait être impliquée.

Connexines et déficits cognitifs : Le rôle des hémicanaux de Cx43 astrocytaire ayant été démontré dans la gliotransmission par la libération de molécules actives à la synapse (ATP, glutamate, D-sérine) modulant les réponses synaptiques et les processus cognitifs comme la mémoire ou l'apprentissage (Stehberg et al., 2012; Walrave et al., 2016). Les connexines sont également impliquées dans la régulation des fonctions synaptiques par la régulation de la morphologie des prolongements astrocytaires entourant les synapses (Pannasch et al., 2014). Ainsi une altération de l'expression ou de la fonction des connexines, induite par IgG-NMO, pourrait conduire à une perturbation de la fonction synaptique.

Ainsi, le travail réalisé durant cette thèse avait trois **objectifs** principaux :

- 1. La caractérisation du phénotype astrocytaire induit par les auto-anticorps NMO-IgG et leur spécificité dans la Neuromyéélite Optique.** Ce premier objectif a été de définir le phénotype astrocytaire acquis en présence d'IgG-NMO. L'utilisation de modèles *in vitro* de cultures gliales et astrocytaires combinés des techniques d'analyse de l'expression de marqueurs astrocytaires sont des outils essentiels pour identifier les altérations du phénotype astrocytaire au niveau protéique et transcriptomique. Afin de vérifier la spécificité de l'effet des auto-anticorps de patients NMO nous avons comparé leur effet à ceux d'anticorps purifiés à partir de donneurs sains (IgG-CTRL) ou de patients atteints par la sclérose en plaques (IgG-SEP). Ce phénotype pouvant être modulé par la présence d'une cytokine anti-inflammatoire, le TGF- β 1, nous avons vérifié son effet de réversion du phénotype astrocytaire réactif.
- 2. L'identification des altérations de connexines et leur implication dans la démyélinisation induite par les auto-anticorps.** Ce deuxième objectif a été d'étudier l'expression et la fonction des connexines gliales, plus spécifiquement des connexines astrocytaires, qui pourraient être altérées en présence d'IgG-NMO et non d'IgG-CTRL. L'utilisation de modèles *in vitro* de cultures astrocytaires, gliales mixtes ou myélinisante a permis d'étudier l'expression des connexines astrocytaires et oligodendrocytaires mais aussi d'évaluer leurs fonctions *hémicanal* et *jonction communicante*. Pour vérifier l'implication des connexines astrocytaires dans la démyélinisation nous avons utilisé des bloqueurs spécifiques des connexines. Enfin l'étude de l'expression des connexines astrocytaires et oligodendrocytaires *in vivo* dans le modèle de rat-NMO d'infusion chronique d'IgG-NMO ou d'IgG-CTRL a également été réalisée pour évaluer leur implication dans la cascade lésionnelle induite par IgG-NMO.
- 3. La mise en évidence d'altérations de transmission synaptique induite par les auto-anticorps et l'implication des connexines.** Ce troisième objectif a été de déterminer si les IgG-NMO étaient responsables d'une altération de la transmission synaptique qui est suggérée par la présence de troubles cognitifs chez les patients NMO. L'enregistrement des réponses synaptiques excitatrices dans l'hippocampe par électrophysiologie a été réalisé en présence d'IgG-NMO. La spécificité de l'effet des IgG-NMO a été vérifiée par l'utilisation d'IgG-CTRL. Les connexines étant impliquées dans la gliotransmission, leur rôle dans les altérations induites par les IgG-NMO a été évalué en présence d'un inhibiteur, la carbenoxolone.

RESULTATS

Les résultats de cette thèse sont présentés en trois parties. La première correspond à l'identification des spécificités phénotypiques et fonctionnelles des astrocytes en présence d'IgG-NMO, avec un article de recherche (*Ruiz et al., en préparation*), qui sera soumis dans la revue *Glia* en 2019. Dans une seconde partie, nous présenterons un article de recherche soumis dans la revue *Brain* en février 2019 (*Richard et al., 2019*), dans lequel nous avons mis en évidence l'implication des connexines gliales dans la démyélinisation induite par IgG-NMO. Enfin dans une troisième partie, nous présenterons nos résultats préliminaires, mais prometteurs, sur l'effet des IgG-NMO sur la transmission synaptique glutamatergique (*résultats non publiés*).

I. Caractérisation d'un phénotype astrocytaire spécifique de la Neuromyéélite optique, induit par les autoanticorps de patients (*Ruiz et al., en préparation*)

Contexte de l'étude

Les astrocytes sont des cellules abondantes participant à de nombreuses fonctions du SNC telles que la myélinisation, la transmission synaptique ou l'apport de métabolites énergétiques aux neurones. Ces cellules sont aussi capables de modifier leur phénotype en réponse à une atteinte du SNC par un processus appelé astroglie réactionnelle. Les astrocytes réactifs développent des fonctions nocives et/ou perdent des fonctions bénéfiques et sont dits dysfonctionnels. Cette dysfonction astrocytaire a été observée dans certaines atteintes du SNC et participerait à leur physiopathogénèse. C'est notamment le cas de la Neuromyéélite Optique (NMO), une pathologie neuroinflammatoire auto-immune caractérisée par la présence d'auto-anticorps dirigés contre l'AQP4 (IgG-NMO), un canal hydrique exprimé par l'astrocyte. La pathogénicité de ces autoanticorps a été démontrée : ils induisent une dysfonction astrocytaire primaire, conduisant à une démyélinisation et une perte axonale secondaires. Nos précédents travaux ont montré une perte d'expression du transporteur au glutamate GLT-1 astrocytaire associée à une mort oligodendrocytaire suggérant que la démyélinisation impliquerait une altération des fonctions astrocytaires. La pathogénicité des IgG-NMO a par ailleurs été confirmée dans un modèle animal de la maladie consistant en l'infusion chronique d'IgG-NMO sans complément et présentant des altérations histologiques et comportementales similaires aux patients NMO. Nous émettons l'hypothèse que l'IgG-NMO induit une altération du phénotype et des fonctions astrocytaires participant à la cascade lésionnelle et la démyélinisation.

Principaux résultats

Les résultats décrits dans cette section sont présentés dans l'article « *Disease-specific reactive astrocytes revealed by Neuromyelitis Optica Immunoglobulin* », *Ruiz et al.*, en préparation pour une soumission dans *GLIA* en 2019.

i) Les IgG-NMO induisent un phénotype astrocytaire réactif et dysfonctionnel spécifique

La caractérisation du phénotype astrocytaire a été réalisée dans un modèle d'étude *in vitro* composé d'une culture de cellules gliales en présence d'IgG-NMO ou d'IgG-CTRL purifiées respectivement du sérum de patients NMO ou de donneurs sains. Des IgG-SEP issues de patients atteints de sclérose en plaque ont ensuite permis d'aborder l'étude de la spécificité de la réponse gliale. L'analyse par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs astrocytaires GFAP et de AQP4 a montré que la culture gliale est constituée de trois populations astrocytaires : i) les GFAP+/AQP4-, ii) les GFAP+/AQP4+ et iii) les GFAP-/AQP4+, cette dernière étant la population astrocytaire majoritaire.

Cette composition phénotypique est fortement modifiée par un traitement de 24 h avec les IgG-NMO : avec une augmentation de la population GFAP+/AQP4+ (+12%) et une diminution de la population GFAP-/AQP4+, (-21%). Ainsi, deux phénotypes astrocytaires sont induits, présentant une augmentation (*AQP4up*) ou une diminution de l'expression d'AQP4 (*AQP4down*). Cette modification n'est pas induite par les IgG-CTRL.

L'étude par PCR quantitative des niveaux d'ARNm des cytokines TNF- α , IL-1 α et IL-1 β et du composant du complément C1q, marqueurs d'astrocyte réactif, a montré leur augmentation dans les astrocytes *AQP4down* induits par IgG-NMO. En confirmation, l'analyse du milieu extracellulaire de la culture gliale traitée par les IgG-NMO montre une sécrétion de chimiokines et cytokines proinflammatoires : l'IL-1 β , l'IL-1 α , CCL20, CCL3, CCL5. Cet effet est fortement diminué après déplétion des IgG-NMO en anticorps anti-AQP4, démontrant le lien entre l'auto-anticorps et le phénotype astrocytaire acquis. Ainsi, les astrocytes traités par IgG-NMO induisent un phénotype astrocytaire réactif, responsable de la production d'un milieu proinflammatoire et potentiellement toxique.

Les astrocytes acquièrent également un phénotype dysfonctionnel après contact avec les IgG-NMO. Ainsi nous avons observé une perte d'expression membranaire des transporteurs au glutamate GLT1 et GLAST, notamment dans la population *AQP4down*, mais également de Kir4.1 et une augmentation de l'expression membranaire de Cx43 chez les astrocytes traités par IgG-NMO. L'examen de l'expression globale de ces molécules par une approche en Western blot sur lysat total indique, non seulement une perte globale d'AQP4, mais aussi celle de GLAST, GLT1, et Kir4.1, associée à un gain d'expression de GFAP. La comparaison de ces modifications avec celles induites par un traitement avec des IgG-SEP démontre la spécificité d'action des IgG-NMO dirigés contre l'AQP4 avec la perte d'AQP4 et de GLAST et l'augmentation de GFAP dans le contexte IgG-NMO, alors que l'expression de Kir4.1 et de GLT1 est également diminuée par les IgG-SEP. Ces résultats confirment le concept d'un phénotype astrocytaire réactif et dysfonctionnel spécifique de la NMO. La perte des transporteurs de glutamate, entraînant une incapacité à recapturer le glutamate extracellulaire, et les anomalies d'expression du canal potassique, pourraient induire un milieu extracellulaire toxique pour l'environnement cellulaire.

Le milieu conditionné des astrocytes réactifs induits par IgG-NMO a un effet démyélinisant dans une culture composée d'astrocytes, d'oligodendrocytes et de neurones dont les axones sont myélinisés. Une baisse de la densité d'axones myélinisés et de la longueur des segments myélinisés est observée en comparaison avec le milieu conditionné

d'astrocytes non traités ou traités avec des IgG-CTRL. L'effet démyélinisant pourrait inclure une toxicité directe envers les oligodendrocytes, car les IgG-NMO diminuent fortement la densité d'oligodendrocytes matures exprimant la CNPase.

ii) Ce phénotype est cependant réversible et peut être modulé par une cytokine proinflammatoire le TGF- β 1

Le TGF- β 1 est une cytokine aux propriétés anti-inflammatoires, dont la capacité à inverser un phénotype astrocytaire délétère a été démontrée (Liddelow et al., 2017). Nous avons analysé l'effet du TGF- β 1 dans la culture de cellules gliales et la culture myélinisante en contact ou non avec les NMO-IgG. Dans la culture gliale naïve (sans contact avec les IgG), le TGF- β 1 diminue fortement l'expression des ARN codant pour les cytokines proinflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1 β , indiquant une modification du phénotype astrocytaire réactif vers un statut moins inflammatoire. De plus, le co-traitement avec le TGF- β 1 empêche la diminution d'expression d'AQP4 et des transporteurs au glutamate GLT1 et GLAST. Enfin, l'ajout de TGF- β 1 dans le milieu conditionné d'astrocytes traités par des IgG-NMO a un effet protecteur, en empêchant la démyélinisation.

Conclusion

Dans cette étude, nous démontrons que les auto-anticorps NMO-IgG, en absence de complément, sont capables de modifier profondément le phénotype astrocytaire et de le rendre toxique pour son environnement. La différence des profils de modifications induits par les IgG issues de patients NMO versus de patients SEP nous permet de proposer l'idée d'un **astrocyte réactif et dysfonctionnel spécifique de la NMO**, dont le profil est toutefois réversible, ouvrant des perspectives thérapeutiques originales.

ARTICLE

Disease-specific reactive astrocytes revealed by Neuromyelitis Optica Immunoglobulin

Anne Ruiz^{1*}, Chloé Richard^{1*}, Sylvie Cavagna¹, Elodie Neyrand³, Claire Benetollo¹, Céline Scotte-Blachon¹, Sandra Vukusic^{2,4}, Pascale Giraudon¹, Romain Marignier^{1,2,4}.

*These authors contributed equally to this work

¹ INSERM U1028, CNRS UMR 5292, Lyon1 University, Center for Research in Neuroscience of Lyon, Lyon, France

² Service de neurologie, sclérose en plaques, pathologies de la myéline et neuroinflammation, Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

³ Service de Neurologie D, troubles cognitifs et neuro-ophtalmologie, Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

⁴ Centre de référence des maladies inflammatoires rares du cerveau et de la moelle, Lyon, France

Correspondance : Romain Marignier (MD, PhD) Centre de référence des maladies inflammatoires rares du cerveau et de la moelle. Service de neurologie, sclérose en plaques, pathologies de la myéline et neuroinflammation, Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer, 59 boulevard Pinel, 69677 Bron cedex, France. e-mail: romain.marignier@chu-lyon.fr

Funding information : Grant from ARSEP foundation, grant provided by the French State and handled by the “Agence Nationale de la Recherche”, within the framework of the “Investments for the Future” programme, under the reference ANR-10-COHO-002 Observatoire Français de la Sclérose en Plaques (OFSEP), grant from “Déchaine ton Coeur” association

ABSTRACT:

Astrocyte responds to CNS insult by a graded continuum of alterations leading to reactive astrocytes, with gain/loss of functions and beneficial/detrimental impact on surrounding cells. In neuromyelitis optica (NMO), pathogenic autoantibody (NMO-IgG) directed against the astrocyte protein aquaporin-4 (AQP4) induce a primary astrocytopathy leading to demyelination and axonal loss. To validate the hypothesis that functional alteration of astrocyte triggered by NMO-IgG support NMO pathogenesis, glial culture was treated with IgG purified from anti-AQP4 seropositive patients, in absence of complement. Flow cytometry, cell selection and qPCR analyses show that NMO-IgG modify the astrocyte phenotype, leading to toxic reactive and dysfunctional cells. Thus, NMO-IgG diversely modulate AQP4 expression, promoting *AQP4up* astrocytes and majority *AQP4down* cells. Both astrocyte populations display a reactive and inflammatory phenotype, with C1q, TNF α , IL-1 α , IL-1 β expression, maintaining an inflammatory secretome. In addition, NMO-IgG induce the loss, at cell membrane, of astrocyte functional proteins: potassium channel Kir4.1, glutamate transporters GLAST and GLT1. *AQP4down* astrocytes cumulate the loss of AQP4, GLT1 and GLAST. By contrast, Connexin 43 and GFAP expression globally increased. Comparison with astrocyte alteration induced by antibody purified from multiple sclerosis patients supports the idea of NMO-specific reactive astrocyte. Characterized by specific loss of GLAST and AQP4 and gain of GFAP, their toxicity for oligodendrocytes and myelin is shown using

myelinated culture. Following treatment with TGF- β 1 (to revert reactive astrocytes), NMO-IgG no more induced *AQP4*down astrocytes, the glial milieu was modified, and toxicity prevented. This study brings light on setting up astrocytopathy in NMO, on autoantibody-induced cell modulation and open promising door for therapy.

Keywords :

NMO-specific reactive astrocyte, auto-antibody, astrocytopathy, myelinated culture, TGF- β 1

1 | INTRODUCTION

Astrocytes are the most predominant cell type in the central nervous system (CNS). They make essential contributions to normal function in the healthy CNS, as they provide energetic metabolite for neurons, regulate the blood-brain barrier, participate in synaptic function and plasticity and fulfil a range of homeostatic maintenance function including extracellular balance of ions and transmitter (Volterra and Meldolesi, 2005; Sofroniew and Vinters, 2010; Vasile et al., 2017). They also respond to CNS insult by a process referred to as reactive astrogliosis. It is now clear that reactive astrogliosis is not simply an all-or-none phenomenon but, rather, is a finely gradated continuum of molecular, cellular and functional changes ranging from subtle alterations in gene expression to scar formation (Sofroniew, 2009; Zamanian et al., 2012). In fact, authors propose a spectrum of astrocyte changes, responding to all forms of CNS injury and diseases, context-specific, involving intra- and extra-cellular signalling molecules and leading to gain and loss of astrocytic functions. Altogether, those changes can have beneficial and detrimental impact on surrounding neural cells, hindering or supporting CNS recovery. This concept points towards the potential of reactive astrocytes to play a primary role or contributing in CNS disorders, supporting the concept of astrocytopathy, as shown in neuromyelitis optica (NMO).

NMO is an autoimmune demyelinating disease of the CNS with typical clinical manifestations of optic neuritis and acute transverse myelitis attacks (Weinshenker et al., 2006; Wingerchuk et al., 2015). NMO is typically recognized as a relapsing disease, with clinical, laboratory and neuroimaging characteristics that can differentiate it from multiple sclerosis. The most distinctive feature of NMO is the presence of a pathogenic autoantibody directed against aquaporin-4 (AQP4), a water channel mainly expressed by astrocytes in the CNS. A spectrum of astrocyte alterations, supposed to occur sequentially, has been reported in NMO lesions (Misu et al., 2013; Pittock and Lucchinetti, 2016) and supports the concept that NMO is a primary astrocytic disorder (Lucchinetti et al., 2014) leading to subsequent demyelination and axonal loss. In vitro studies (Hinson et al., 2008, 2012, 2017; Marignier et al., 2010) demonstrate that binding of NMO-IgG to astrocytic AQP4 initiates, not only activation of the cytolytic complement cascade, but also downregulation of membrane AQP4 together with glutamate transporters.

Arguing that a loss of proteins essential for homeostatic role of astrocyte associated to inflammatory phenotype could be involved in NMO pathogenesis, we have analysed the alterations induced in astrocyte after contact with IgG purified from AQP4-Ab seropositive NMO patients (NMO-IgG), in absence of complement. We show that NMO-IgG promote

reactive astrocytes that undergo specific phenotype changes, including loss of channels and transporters, correlated to AQP4's fate. Importantly, they are not induced by treatment with IgG from MS patients and healthy donors.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Patients' sample and IgG purification

Sera and Plasmapheresis from twenty six patients from the French cohort NOMADMUS, diagnosed as NMOSD (Wingerchuk et al., 2015) were selected from Neurobiotec biobank (Lyon University Hospital). All of them were tested positive for anti-AQP4-IgG on a cell-based assay (NMO-IgG). Control sera were collected from nine healthy donors from "Etablissement Français du sang" and were tested negative for anti-AQP4 IgG (CTRL-IgG). Eight multiple sclerosis patients IgGs purified from serum were also used in the study and were tested negative for AQP4-IgG (MS-IgG). All samples were concentrated by differential centrifugations and then incubated with Protein-A Sepharose 4 Fast Flow™ beads (P9424 Sigma-Aldrich) to specifically isolate immunoglobulin of type G (IgG). IgG were eluted with glycine 0,1M buffer (pH 2,8) and then neutralized with Tris 1,5M (pH 8,8). After dialysis against culture medium, IgG concentrations were determined using BCA™ Protein Assay Kit (Pierce). Cultured pure astrocytes, glial mixed cultures and myelinated cultures were treated by NMO-IgG for 24 h, either individually or with a pool from three patients.

2.2 | AQP4-IgG depletion

AQP4-IgG depletion was performed as described before (Marignier et al., 2010, 2016). Briefly, human embryonic kidney-293 cells stably transfected with human AQP4-M23 plasmid (HEK-AQP4 cells engineered by CreaCell®, Grenoble France) were seeded in 12-wells plate at a density of 5×10^5 cells. NMO-IgG was added in each well to live HEK-AQP4 cells for 20 min per well at 37 °C, CO₂ atmosphere and After cell contact, depleted NMO-IgG was removed, centrifuged for 15 min at 12.000 rpm, then tested for AQP4-IgG titer by flow cytometry. AQP4-IgG level was decreased by almost 40%. Adsorbed NMO-IgG were termed NMO-IgG AQP4+dep.

2.3 | Cell cultures

Mixed glial cell and astrocytic cultures:

Primary mixed glial cell cultures were obtained from 1-day-old rat pups cortices microdissection and mechanical disruption as previously described (Marignier et al., 2010). Dissociated cells were plated on twelve-well, twenty-four-well plates and LabTek® slides precoated with Poly-L-Lysine (PLL; 10 µg/mL in sterile water). Cells were then incubated at 37°C in a moist 5% CO₂, 95% air atmosphere. Cells were changed three times a week with glial cell culture medium composed of DMEM GlutaMax 4,5 g/L glucose (Fisher Scientific 61965), 10% foetal calf serum (FCS), 0.4% penicillin-streptomycin, 0.4% amphotericin B. To obtain a pure culture of astrocytes, cells were treated with 1 µM of cytosine arabinoside on day in vitro (DIV) 8 and DIV13. Cells were kept for 18 to 22 days before treatment and were used for morphological and biochemical studies.

Myelinating culture:

Primary myelinated cultures were obtained from day 15 embryonic rat spinal cord as described previously (Thomson et al., 2008). Briefly, plates and culture chambers were coated with PLL (13 µg/ml in sterile water) and cortical astrocytes, from pure astrocyte culture as described above, were detached with Accutase® solution (Sigma A6964) and resuspended in glial cell culture medium at a density of $2 \cdot 10^5$ cells/ml. These astrocytes were left to attach for 5 days before myelinating culture plating and were used to improve myelination as described before (Sorensen et al., 2008). Following dissection of embryonic spinal cords, mechanic and enzymatic dissociation, cells were counted, and final volume was adjusted to obtain $7 \cdot 10^5$ cells per ml in plating medium (DMEM 1 g/L glucose supplemented with 1% Penicillin Streptomycin, 25% horse serum, 25% HBSS). Then, $2 \cdot 10^5$ cells per chamber or $4 \cdot 10^5$ cells per well, were left to attach for at least 2 h at 37°C with 5% CO₂. Finally, differentiation medium (DMEM GlutaMax 4.5 g/L glucose supplemented with 1% Penicillin Streptomycin, 0.5% N2 supplement (ThermoFisher 1750258), 10 ng/ml biotin, 50 nM hydrocortisone, 10 µg/ml insulin) was added in a proportion of 40% of total volume. Half culture medium was carefully replaced thrice a week and insulin was omitted from culture medium after DIV12. Cells were kept until DIV26, when myelination was optimum, and treated to be used for biochemical and morphological studies.

2.4 | Cell treatments and conditioned medium

Cultures were treated for 1 h to 24 h with either culture medium (no treatment condition termed NT) or purified IgG from healthy donors (CTRL-IgG) or from NMO patients (NMO-IgG) at a concentration of 0,4 mg/ml with or without co-treatment with type 1 transforming growth factor beta (TGF-β1) at a concentration of 10 ng/ml. For conditioned medium, astrocyte cultures were treated 10 h with either NT, CTRL-IgG or NMO-IgG. Then medium was changed and TGF-β1 was added in the medium at a concentration of 10 ng/ml. This medium was harvested 24 h later and constituted the astrocyte conditioned medium and was kept at -80°C before use. Conditioned medium (CdM) was used to treat myelinated culture at DIV26 for 48 h.

2.5 | Cell fractioning assay and Western blot analysis

Membrane fraction of cultured astrocytes was isolated using the ProteoExtract® subcellular proteome extraction kit (Calbiochem, 539790). First cells were with culture medium and taken off using Accutase® solution and centrifuged at 300g for 5 min. Then cell pellets were washed trice with washing buffer and incubated 5 min on a wheel followed by 10 min centrifugation at 300g at 4°C. For cytosolic fraction extraction, pellets were resuspended in buffer n°1 containing 1X Complete™ protease inhibitor (Roche) and a mix of phosphatases inhibitors (2 mM orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, 2 mM sodium and centrifuged at 800g for 10 min at 4°C. For membrane fraction extraction, pellets were resuspended in buffer n°2 containing protease and phosphatase inhibitors, incubated 30 min at 4°C on a wheel and centrifuged at 5500g 10 min at 4°C. Supernatant was harvested and kept at -80°C aliquoted. For immunoblot (Western blot - Wb), unfixed dry cell pellets were dissociated using ultrasound sonication in homogenization buffer containing Tris 20 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, sucrose 10% (pH 7,4) and protease inhibitor (Complete EDTA free, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and phosphatases inhibitors (sodium fluoride 10 mM, sodium pyrophosphate 2 mM, sodium beta-glycerophosphate 2 mM, sodium orthovanadate 2 mM). Protein

content concentrations were determined using Qubit® Protein Assay Kit (Q33212, Molecular Probes). Protein expression was determined by Western blotting as described before (Varrin-Doyer et al., 2012). Briefly, proteins were separated on SDS-PAGE gels (1 to 12µg of protein per lane, 10% and 4-12% Criterion™ XT Bis-Tris Gels© Bio-Rad Laboratories Inc Hercules Ca 94547). Then proteins were transferred on a nitrocellulose (Protran® Nitrocellulose Hybridization Transfer Membrane 0,2µm Whatman®) and immunodetected using primary antibodies diluted in Tris buffer saline (TBS) containing 1% non-fat dry milk and 0.1% Tween-20 incubated overnight at 4°C under agitation followed by secondary antibodies against IgG and coupled with Horse Radish Peroxydase (HRP) enzyme incubated 1h at room temperature. Revelation was performed using chemiluminescence assay (Immobilon Western Chemiluminescence HRP substrate WBKLS0500 Millipore Merck KGaA Darmstadt Germany; Amersham Hyperfilm™ ECL GE Healthcare UK Ltd Buckinghamshire UK). Film analysis of band density was analyzed using ImageJ software.

2.6 | Immunocytochemistry

For immunocytochemistry (ICC) labelling, cells were fixed in 4% PFA for 10 min at room temperature. After three washes in PBS cells were incubated in a solution of 1X PBS containing 0,3% triton-X100 (PBST), 1% BSA, 10% NGS for 1 h at room temperature. Then, primary antibodies, diluted in a solution of PBST containing 1% BSA, 4% NGS, were incubated at 4°C overnight. After three washes in PBST, secondary antibodies coupled with fluorochromes Alexa-488, Alexa-555 or Alexa-647 were incubated 1 h at room temperature. After two washes in PBST and one in 1X PBS, DAPI (0,1 µg/ml) was incubated 10 min at room temperature and rinsed three times in PBS before mounting with fluoropreserve® reagent (Millipore). For myelination evaluation, myelin basic protein (MBP) and phosphorylated neurofilament (pNF) were co-labeled at DIV28 after 48h treatment. 20 fields per condition were taken with a fluorescent microscope equipped with epifluorescence (Axio Imager Z1 apotome technology, Zeiss, Oberkochen, Germany) by investigators blinded for treatment condition. Image analysis was performed using ImageJ software. The density of myelinated axons was calculated as the ratio of the amount of MBP labeling on pNF labeling. The length of myelinated segments was also measured using the segmented line tool of ImageJ. CNPase density evaluation was performed using the area covered by CNPase labeling.

2.7 | Flow cytometry and cell sorting

Flow cytometry was performed on untreated glial cell cultures and following 24 h IgG treatment. Cells were washed with PBS 1X and then detached from culture dishes with accutase™ solution. Dissociated cells were incubated 30 min at RT with PBS/8% NGS and stained for 20 min at 4°C with primary antibody directed against surface proteins GLT1 ((Marignier et al., 2010), AQP4 (AB2218, Millipore™), O4 (FAB1326P, R&D systems). Cells were then stained with secondary antibodies for 30 min at 4°C with Alexa 488 Goat anti-rabbit (Molecular Probes). After 15 min of fixation with paraformaldehyde 4% and 20 min of permeabilization with saponine 0,5%, for detection of intracellular proteins, cells were stained with mouse anti-GFAP (556330 BD Pharmingen™) and CNPase (C5922, Sigma, USA in PBS/ saponin 0.05% Staining was followed by incubation with anti-mouse IgG Alexa 660 (Molecular Probes) 30 min at 4°C. Cells were analyzed on flow cytometer (CANTOII, Becton Dickinson) or sorted based on the expression of AQP4 (ARIA, Becton Dickinson).

2.8 | Cytokine and Chemokine detection

Detection and analysis of cytokines and chemokines released by astrocytes and glial cells was performed using Proteome Profiler™ Array Rat Cytokine Array Panel A (R&D systems, ARY008). Supernatant from cultures treated 24 h was harvested and were kept on ice. Membranes were first blocked to avoid unspecific binding of antibodies. Samples were incubated 1 h at room temperature with a cocktail of biotinylated antibodies directed against thirty different cytokines and chemokines. Then sample-antibody mixture was added on blocked membranes in 4-well multi-dishes and left to incubate overnight at 4°C on a rocking platform shaker. Each membrane was handled carefully and rinsed thrice with wash buffer. Membranes were incubated 30 min at room temperature with Streptavidine-HRP on a rocking platform shaker and then rinsed thrice with wash buffer. Revelation was performed using a chemiluminescent assay (Chemi Reagent Mix) incubated on top of membranes for 1min. Membranes were then placed in an autoradiography cassette to expose them to X-ray films for 1 min. Film analysis and band intensity was performed using ImageJ software.

2.9 | RNA extraction and qPCR analysis

RNA extraction on cell sorted was done with the kit Rneasy Plus microkit Qiagen (Qiagen, 74034) for a density of cells inferior at $5 \cdot 10^5$ cells and with the NucleoSpin RNA (Macherey Nagel, 7400955) for more than $5 \cdot 10^5$ cells. Total RNAs were assayed by NanoDrop (NanoDrop 2000C, Thermo). The Reverse-Transcription was performed with the SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen, 18091050) with 60 ng or 1 µg of RNA. qPCR was done on the Rotor-Gene Q (Qiagen) with the Rotor-Gene Sybr Green PCR kit (Qiagen, 204076). A standard curve was established by logarithmic dilution for each gene tested: Aldh1l1, AQP4-M1, GFAP, Iba1, Il1-α, Il1-β, Il6, Olig2 and TNF-α. All the primers concentrations used were at 10 µM.

2.10 | Statistical analysis

Statistical analyses and graphs were made using GraphPad Prism 5.0. Data on graphs are presented as bars of mean with standard error of mean (SEM) or by scatter dot plots representing all values and mean with SEM. Normality of distribution and equality of variances was evaluated using respectively D'Agostino-Pearson and Bartlett's tests before statistical analysis to choose the appropriate parametric or non-parametric test to compare conditions. Comparison of two conditions as for was performed using a t-test or a Mann-Whitney test. For multiple conditions comparison, we used either an ANOVA or a Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test. For all tests, alpha risk was fixed at 5% so differences were considered significant for $p < 0.05$. Levels of significance were indicated as: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3 | RESULTS

3.1 | NMO-IgG treatment alters astrocyte phenotype

Primary mixed glial cell cultures composed of astrocytes, oligodendrocytes and microglia were treated for 24 h with purified IgG from NMO patients (NMO-IgG) and healthy individuals (CTRL-IgG). To characterize astrocyte phenotype, untreated glial culture (NT) was first examined for AQP4 and GFAP expression using flow cytometry, showing that

about 75% of the whole cell population are astrocytes. Three astrocyte phenotypes were distinguished: i) astrocytes expressing GFAP without AQP4 expression (GFAP^{pos}AQP4^{neg}; 24% of the whole population), ii) astrocytes expressing both GFAP and AQP4 (GFAP^{pos}AQP4^{pos}; 6% of the whole population), and iii) almost half of astrocytes expressing AQP4 but not GFAP (GFAP^{neg}AQP4^{pos}, 44% of the whole population) (Figure 1A). The cell population not expressing AQP4 and GFAP comprises microglia and oligodendrocytes (qPCR analysis, not shown). Astrocyte populations did not change in CTRL condition but was modified by NMO-IgG (one example shown (Figure 1A)). A profound modification of astrocyte phenotypes was detected: the GFAP^{pos}AQP4^{neg} population decreased (10% in NMO *versus* 24% in NT condition) in parallel with an increase of GFAP^{pos}AQP4^{pos} cells (18% in NMO *versus* 6% in NT condition), indicating the gain of AQP4 membrane expression by GFAP^{pos} astrocytes (termed *AQP4up*). Inversely, the GFAP^{neg}AQP4^{pos} population decreased (23% in NMO *versus* 44% in NT condition) indicating the loss of AQP4 membrane expression in GFAP^{neg} population (termed *AQP4down*). Such modifications of astrocyte phenotype were constantly observed in glial cultures treated with NMO-IgG (from 5 patients) compared to CTRL-IgG (from 1 healthy donor) and NT conditions repeated in 11 experiments (Figure 1B) (**p<0.0001, **p=0.0003, respectively). Focusing on GFAP^{pos} and GFAP^{neg} cell populations, flow cytometry analysis confirmed that, under NMO-IgG treatment, GFAP^{pos} astrocytes gained AQP4 expression whereas GFAP^{neg} astrocyte lose this protein (Figure 1C). However, there was a global decrease of AQP4 expression at the total cell level. Examination of AQP4, together with GFAP, in the total cell population using Western blot analysis (membrane + cytosol), confirmed the global loss of AQP4 and gain of GFAP following NMO-IgG treatment (mean gain: 22% p=0.0103; mean loss: 38% p<0.0001) (Supplementary Figure 1, NMO-IgG: n=17; CTRL-IgG: n=9). We thus show that NMO-IgG modify its cell target, giving rise to different astrocyte phenotypes according to AQP4 expression, but globally result in AQP4 downregulation. We thus show that NMO-IgG modify its cell target, giving rise to different astrocyte phenotypes according to AQP4 expression, but globally result in GFAP upregulation and AQP4 downregulation.

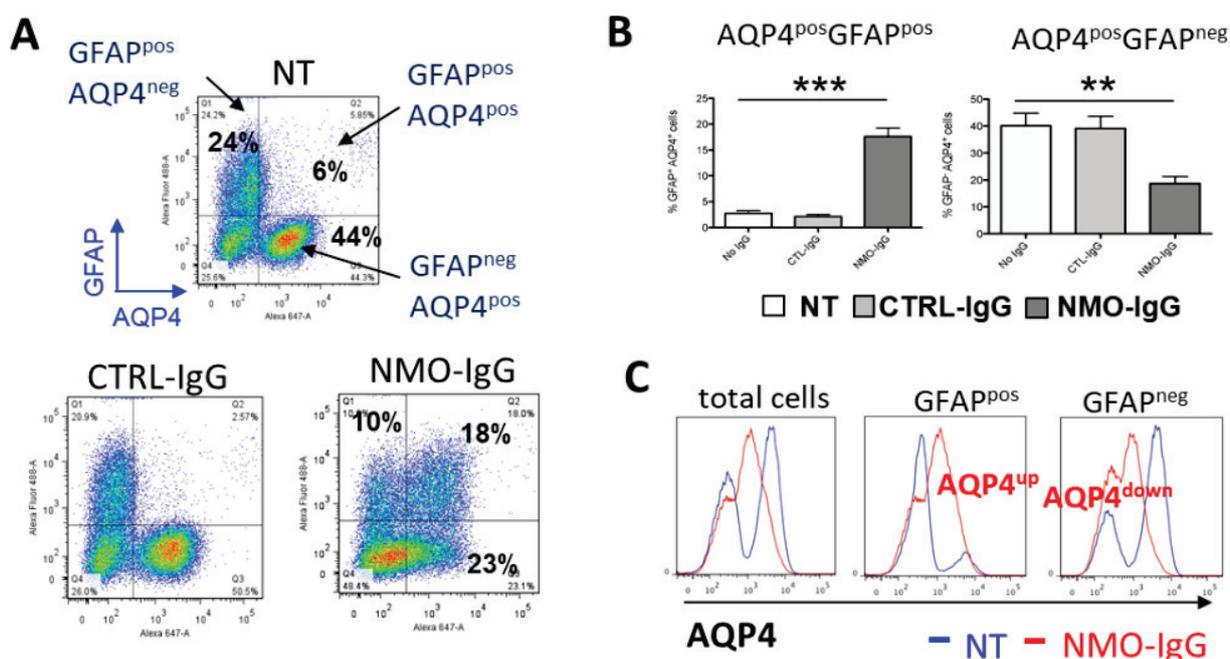


FIGURE 1 Astrocyte phenotype changes induced by NMO-IgG give rise to two cell populations, *AQP4up* and *AQP4down* astrocytes. **A**) Analysis of GFAP and membrane AQP4 expression in primary mixed glial cell culture using flow cytometry, distinguishes three astrocyte phenotypes: GFAP^{pos}AQP4^{neg}, GFAP^{pos}AQP4^{pos} and GFAP^{neg}AQP4^{pos} cells (24%, 6%, 44% of the whole cell population, respectively in NT condition). NMO-IgG (one example shown) decrease the GFAP^{pos}AQP4^{neg} and GFAP^{neg}AQP4^{pos} cell populations (10% and 23%, respectively), while GFAP^{pos}AQP4^{pos} cells increased (18%). No modification with CTRL-IgG. **B**) Phenotype modifications induced by NMO-IgG are reproducible with increase in GFAP^{pos}AQP4^{pos} and decrease of GFAP^{neg}AQP4^{pos} induced by NMO-IgG (n=11 experiments, Kruskal Wallis test). **C**) Under NMO-IgG treatment, GFAP^{pos} and GFAP^{neg} astrocytes gained and lose AQP4 expression respectively (flow cytometry), thus were termed *AQP4up* and *AQP4down* cells.

3.2 | *AQP4up* and *AQP4down* astrocytes display reactive phenotype

To precise the NMO-IgG-induced astrocyte phenotypes, cell selection on AQP4 membrane expression (low and high AQP4 levels) was performed on mixed glial cells following 24 h treatment (NT, CTRL-IgG and NMO conditions; NMO-IgG n=3), giving rise to enrichment of *AQP4up* and *AQP4down* astrocyte populations generated by NMO condition (Figure 2A). AQP4 and GFAP mRNA, detected by qPCR analysis on selected cells, confirmed them as astrocyte (not shown). Presence of C1q and pro-inflammatory cytokines TNF α , IL-1 α and IL-1 β mRNA identified them as reactive astrocytes (Figure 2B). These reactive markers were increased in AQP4^{low} and reduced but still present in AQP4^{high} selected astrocytes (Figure 2B). Assuming that both populations of reactive astrocytes would globally result in an inflammatory *milieu*, we analysed the secretome of glial cells following IgG treatment, using rat cytokine array on cell culture medium (Figure 2C). We show that, compared to CTRL-IgG (n=3), NMO-IgG (n= 10) specifically generated an inflammatory immune response in glial cells, with the secretion of IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra and IL-2 (p=0,022; p=0,032; p=0,1 and p=0,07 respectively, levels depending on patient' IgG). NMO-IgG also induced the secretion of chemokines CCL3, CCL5, CXCL3 (p<0,05) and CCL20 (p=0.009). Implication of NMO-IgG in the glial secretome was demonstrated using NMO-IgG depleted in AQP4 specific antibody, that induced lower levels of cytokine and chemokines production compared to native NMO-IgG (Figure 2D). TNF α , IL-1 α , and IL-1 β secretion was also detected in pure astrocyte culture treated with NMO-IgG compared to CTRL-IgG (data not shown: cytokine array: 18,6 vs 4 \pm 12; 20,4 vs 8,5 \pm 8; 6,8 vs

0,5 ±6,7 for TNF α , IL-1 α , and IL-1 β respectively). Collectively, these observations indicate that NMO-IgG induce *AQP4up* and *AQP4down* reactive astrocytes promoting an inflammatory milieu.

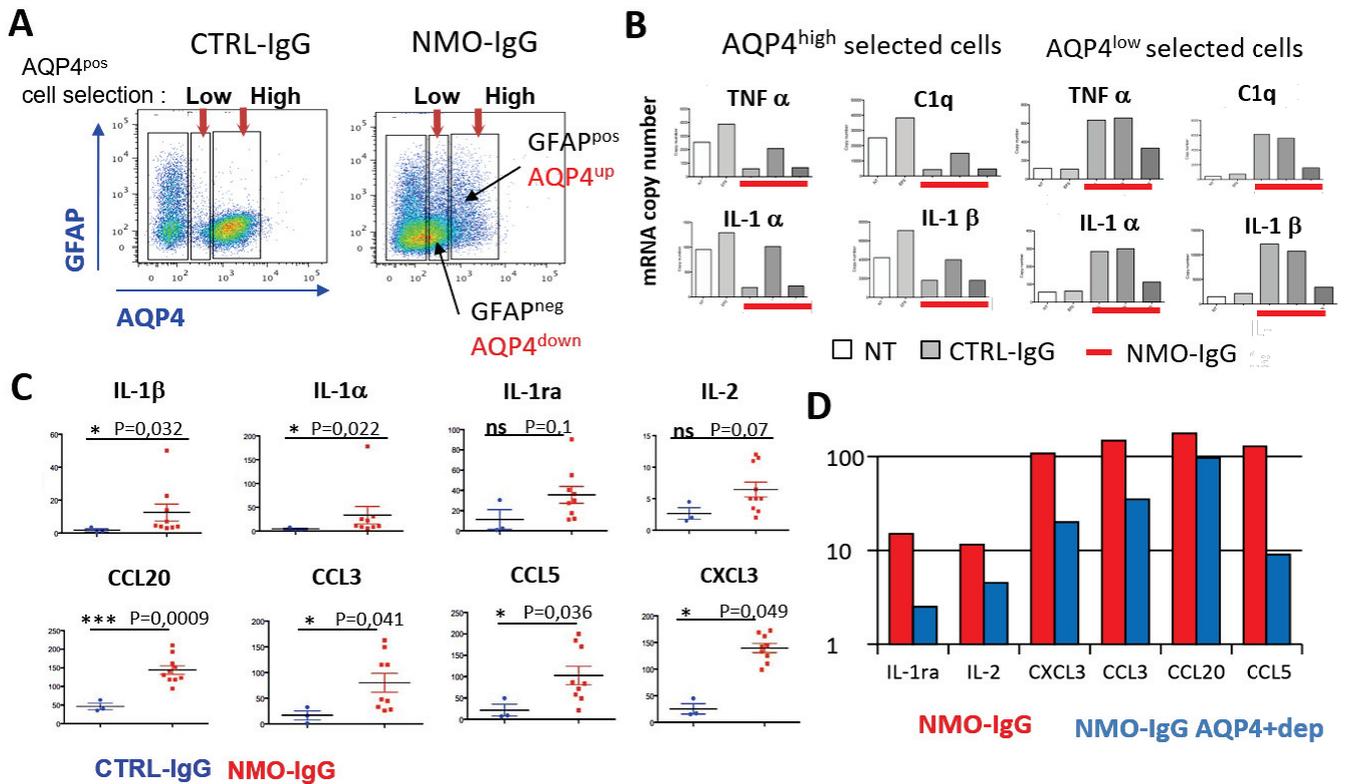


FIGURE 2 NMO-IgG specifically generates reactive astrocytes. A) Enrichment of GFAP^{neg}AQP4^{down} and GFAP^{pos}AQP4^{up} cell populations using cell sorting based on AQP4 expression (High versus Low level) in NMO-IgG compared to CTRL-IgG conditions. **B)** Transcriptome qPCR analysis in AQP4^{high} selected cells showing decreased C1q, TNF α , IL-1 α and IL-1 β mRNA levels in AQP4^{up} astrocytes generated by NMO-IgG treatment (red line). Conversely, transcriptome of AQP4^{low} selected cells shows the upregulation of C1q, TNF α , IL-1 α and IL-1 β in AQP4^{down} astrocytes generated by NMO-IgG treatment (n=1 experiment: 1 CTRL-IgG and 3 NMO-IgG). **C)** Protein arrays performed on glial cell medium after 24 h treatment with NMO-IgG or CTRL-IgG: detection of the secretion of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-1 α , IL-1ra, IL-2 and chemokines CCL3, CCL5, CCL20 and CXCL3 (n=3 CTRL-IgG and n=10 NMO-IgG, Mann Whitney test). **D)** Depletion of anti-AQP4 antibody in total NMO-IgG reduce the release of proinflammatory cytokines and chemokines showing a specific effect of anti-AQP4 autoantibody in NMO patients.

3.3 | Dynamic modulation of functional proteins by NMO-IgG reveals disease-specific dysfunctional and toxic reactive astrocytes

Reactive astrocytes may contribute to CNS disease through the gain of detrimental effects, such as inflammatory secretome, and the loss of essential cell functions (Hamby et al., 2012). We focused our analysis on membrane proteins involved in the homeostatic role of astrocyte: the glutamate transporters GLT1 and GLAST, the potassium channel Kir4.1 and the gap junction/hemichannel protein Connexin 43. First, immunocytochemistry detected a rapid delocalization of these proteins in astrocyte 30 min after contact with NMO-IgG (Figure 3A). In addition, a global decrease at astrocyte cell membrane of AQP4, GLT1, GLAST and Kir4.1 was detected 24 h after contact with NMO-IgG by cell fractioning and Western blot analysis (Figure 3B). Flow cytometry analysis focused on GFAP^{neg} astrocyte population, the source of AQP4^{down} cells, revealed the loss of membrane GLT1 and GLAST in NMO condition (Figure 3B). Examination, at same time, of the total cell lysate by Western blot confirmed the loss of AQP4, GLAST and Kir4.1 in parallel of the increase of GFAP expression (Supplementary Figure 1), supporting the idea of reactive and

Résultats

dysfunctional astrocyte generated by NMO-IgG. By contrast, expression of Cx43 increased at cell membrane (Figure 3B). Interestingly, astrocyte treatment with IgG purified from multiple sclerosis patients (MS-IgG= 8) used at the same concentration than NMO-IgG (n= 17) and same duration, did not induce similar modifications (Supplementary Figure 1). At the total cell level, AQP4, GLAST and GFAP expression was not modified by MS-IgG whereas that of GLT1 and Kir4.1 was reduced, showing the specificity of NMO-IgG-induced modulation of astrocyte.

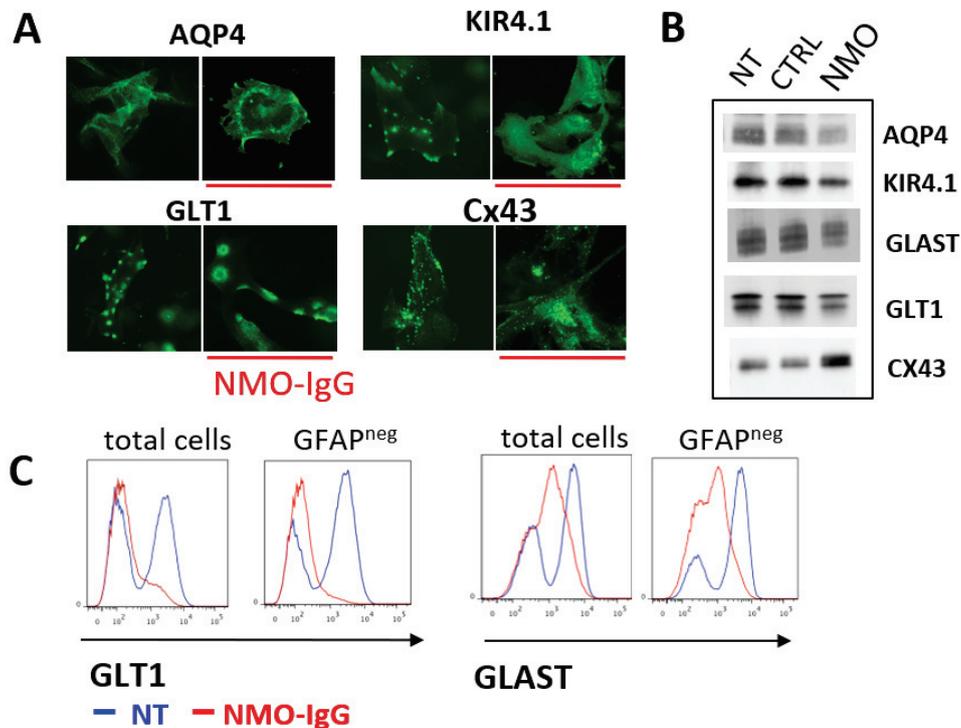


FIGURE 3 NMO-IgG induce dynamic modulation of astrocyte proteins. A) Immunodetection (immunofluorescence) of AQP4, GLT1, Kir4.1 and Cx43 in pure astrocyte culture: rapid delocalization of proteins at 30 min in NMO condition and not in NT condition. **B)** Astrocyte membrane preparation: loss of AQP4, Kir4.1, GLAST and GLT1 at cell membrane in NMO condition after 24 h treatment (Western blot). **C)** Flow cytometry: loss at cell membrane of GLT1 and GLAST in GFAP^{neg} cells and total cells after 24h treatment with NMO-IgG.

Thus, reactive astrocytes generated by NMO-IgG, characterized by loss of the autoantibody target associated with specific alterations of membrane transporters and channels, appeared NMO-specific. Collectively, we show that reactive astrocytes are generated by NMO-IgG, are characterized by a loss of the autoantibody target associated with specific alterations of membrane transporters and channels and appear NMO-specific.

Résultats

Potential toxicity of NMO-specific reactive astrocytes was suggested by their alteration, including inflammatory secretome and the potential incapacity to uptake glutamate and K⁺. The toxic effect was demonstrated by treatment of myelinated culture, composed of astrocytes, oligodendrocytes and neurons, with astrocyte conditioned medium (Figure 4). Pure astrocyte culture was treated for ten hours with CTRL-IgG and NMO-IgG (pooled from 3 patients), then conditioned medium (CdM) collected from NMO-IgG-induced reactive astrocytes (CdM-NMO); from control astrocytes (CdM-CTRL) and from untreated astrocyte (CdM-NT). Treatment of myelinated culture with CdM-NMO for 48 h reduced the density of myelinated axons, expressed as MBP/pNF ratio, and the length of myelinated segment (Figure 4A-C) ($p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively, compared to CdM CTRL). This decisively demonstrated the toxic effect of NMO-specific reactive astrocytes on myelin.

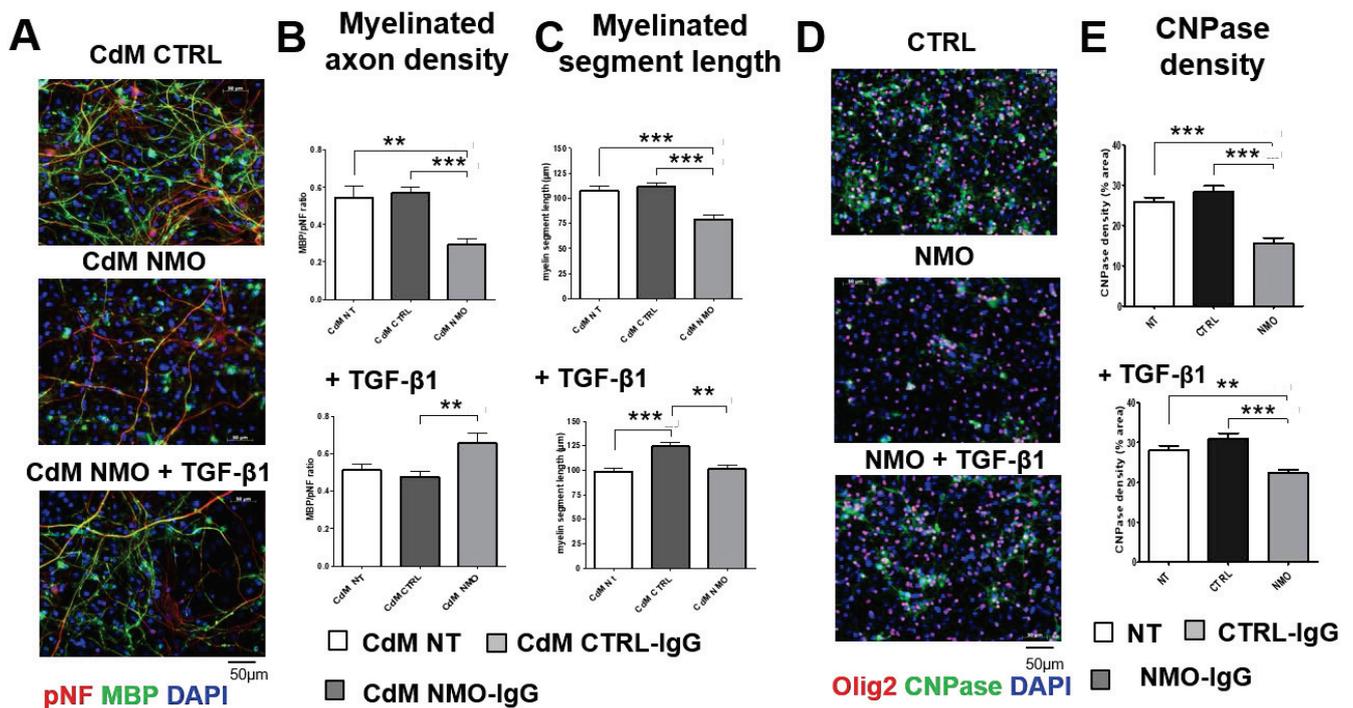


FIGURE 4 NMO-specific reactive astrocytes generate a *milieu* toxic for myelin, an effect prevented by TGF-β1. **A**) Myelinated culture (neurofilament in red; myelin in green; immunofluorescence) treated with conditioned medium (CdM) from astrocytes in NMO-IgG and CTRL-IgG conditions and co-treated (or not) with TGF-β1. **B**) The loss of myelinated axon (MBP/pNF ratio) induced by CdM NMO-IgG is not detected under co-treatment with TGF-β1. **C**) Shortened myelinated segment length induced by CdM NMO-IgG is prevented by TGF-β1 (n=1 experiment, 20 measures, conditions in duplicate). **D-E**) Loss of oligodendrocyte (immunofluorescence: olig2+ in red; CNPase+ in green) induced in NMO-IgG condition and reduced by co-treatment with TGF-β1 (n= 1 experiment, 20 measures, conditions in duplicate). Kruskal Wallis test with Dunn's post-hoc analysis * $p < 0,01$ ** $p < 0,001$.

3.4 | TGF-β1 reverts the phenotype of NMO-specific reactive astrocytes and protects oligodendrocytes and myelin.

Given the ability of TGF-β1 to revert reactive astrocyte to naive one (Liddelow et al., 2017), we tested the ability of TGF-β1 to modify the phenotype of NMO-specific reactive astrocytes and moderate their toxic effect. We first examined the direct effect of TGF-β1 on glial cells (no IgG condition) and observed an increased number of GFAP^{pos}AQP4^{pos} astrocyte (22% versus 5% without TGF-β1, flow cytometry) and a reduced GFAP^{neg}AQP4^{pos} one (41% versus 66% without TGF-β1) (Figure 5A). However, elevation of GFAP^{pos}AQP4^{pos} cell population, supposed to be reactive, did not result in increased inflammation. Rather, qPCR analyses of glial cells (Figure 5B) and pure astrocytes (not shown) treated with TGF-β1 detected lower endogenous levels of IL-1β and TNF-α mRNA. We further examined the effect of NMO-IgG (n=6) and TGF-β1 co-treatment on glial cells. Flow cytometry analysis was focused on AQP4 expression in GFAP^{neg} cell population, previously shown to be altered by NMO-IgG (source of AQP4^{down} cells) (Figure 5C). Compared to treatment with NMO-IgG alone, AQP4^{down} reactive astrocytes were prevented by co-treatment with TGF-β1. In addition, TGF-β1 avoided the glutamate transporters alteration induced by NMO-IgG, as there was no reduction of GLAST and GLT1 expression. Moreover, TGF-β1 modified the cytokine expression induced by NMO-IgG in glial cells (Figure 5B) and pure astrocytes (not shown). IL-1β and TNF-α mRNA were reduced whereas IL-6 mRNA increased, suggesting astrocyte phenotype change. Altogether, these observations suggested that, by changing the phenotype of NMO-specific reactive astrocytes, TGF-β1 might reduce their deleterious potential. The protective effect of TGF-β1 was thus examined on glial culture treated with NMO-IgG for 24 h. Contact with NMO-IgG alone resulted in the loss of mature oligodendrocytes labelled with CNPase (Figure 4D and E, p<0.001 compared to NT), as previously reported (Marignier et al., 2010). Such a toxic effect was lowered by TGF-β1 treatment (p>0.05 compared to NT without TGF-β1). Focusing on the CdM effect of reactive astrocytes on myelinated culture, the loss of myelinated axons was not observed when CdM-NMO was collected from astrocytes treated with NMO-IgG and TGF-β1 (Figure 4A and B, p<0.01). In addition, there was no reduction of myelinated segment length (Figure 4C, p<0.01). Therefore, TGF-β1 can prevent the toxic effect of NMO-specific reactive and dysfunctional astrocytes on oligodendrocyte and myelin.

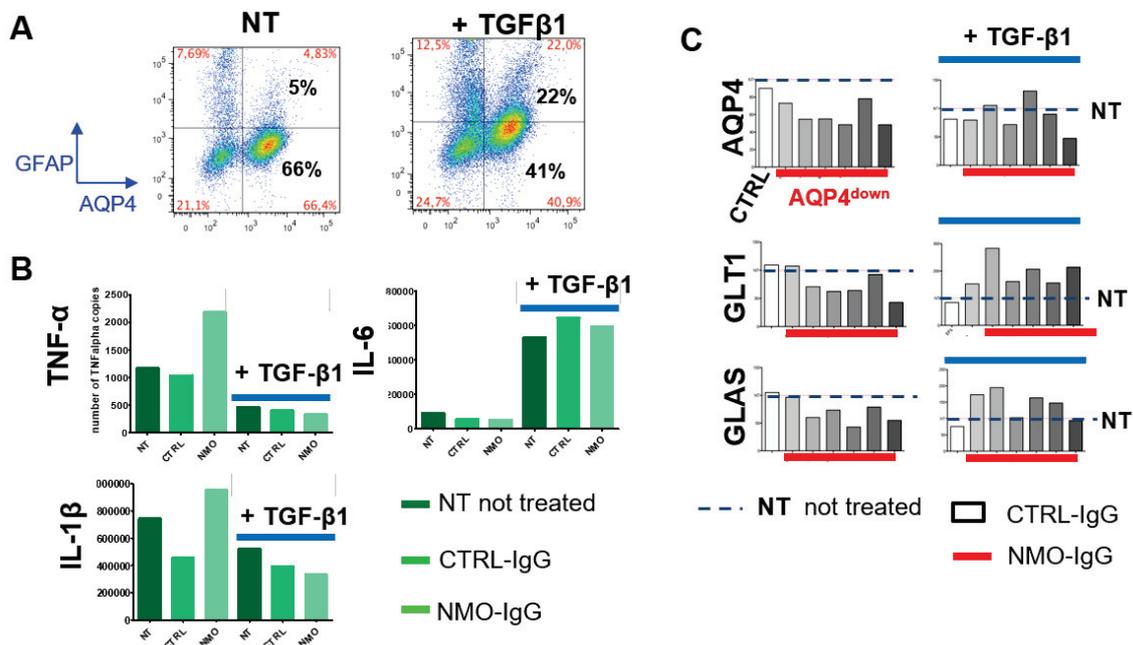


FIGURE 5 TGF- β 1 prevents the NMO-IgG-induced modulation of astrocyte phenotype. **A)** TGF- β 1 treatment of glial cell culture increases the number of GFAP^{pos}AQP4^{pos} astrocytes (5% to 22% in NT) and reduces the GFAP^{neg}AQP4^{pos} cell population (66% to 41%). **B)** Cytokine mRNA levels (qPCR) in glial cell culture: TGF- β 1 reduces IL-1 β and TNF- α mRNA endogenous levels (NT condition). Co-treatment with TGF- β 1 prevent the NMO-IgG-induced increase of IL-1 β , TNF- α mRNA, but generates IL-6 expression. **C)** TGF- β 1 co-treatment with NMO-IgG (n=6), does not decrease AQP4 expression in GFAP^{neg} cells, as observed with NMO-IgG alone. No reduction of GLAST and GLT1 expression in GFAP^{neg} cells was observed under TGF- β 1 co-treatment compared to NMO-IgG alone.

4 | DISCUSSION

The present study performed on astrocytes, in pure culture or mixed glial culture, shows that, in absence of complement, autoantibody NMO-IgG directed to AQP4 constantly alter the astrocyte phenotype, giving rise to two cell types, *AQP4up* and *AQP4down* astrocytes, with gain and loss of AQP4, respectively. Both cell populations express markers of reactive astrocytes. The novelty of the present study is the observation that reactive astrocytes specifically induced by NMO-IgG are probably dysfunctional and deleterious, notably the *AQP4down* astrocytes that cumulate an inflammatory phenotype with the loss of AQP4 and the glutamate transporters GLAST and GLT1.

We show that, NMO-IgG trigger the delocalization, at astrocyte cell membrane, of proteins that are essential for its function: GLAST and GLT1, the stabilizing ion balance and inwardly rectifying potassium *channel* Kir4.1 and the gap junction protein Cx43. Alteration of these membrane proteins after contact with anti-AQP4 autoantibody could be explained by their proximity at cell membrane (Connors et al., 2004; Boulay et al., 2017) and the range of effector functions of autoantibody directed to membrane proteins, notably receptor internalization (Diamond et al., 2009). Protein delocalization induced by NMO-IgG is followed by the loss of AQP4, GLAST and Kir4.1, detected in membrane cell preparation and at the total cell level, suggesting a profound astrocyte dysfunction. By contrast, Cx43 expression increases at cell membrane, however such change was recently implicated in altered gap junction and hemichannel activities, and NMO-IgG induced demyelination (Richard et al., 2019 *submitted*). One may note that *AQP4up* astrocyte phenotype induced by NMO-IgG is comparable to astrocytes overexpressing AQP4 and GFAP found in multiple sclerosis patients (Misu et al., 2013; Lucchinetti et al., 2014). However, the profile of astrocyte modulation induced by IgG from MS patients, clinically different from NMO, is different to that induced by NMO-IgG, notably there is no global gain of GFAP and loss of AQP4 and GLAST. These observations are pleading for the idea of NMO-specific reactive astrocyte, and more generally for disease-specific reactive astrocyte. Astrocytes modified by NMO-IgG integrate the reactive gliosis entity depicted by Sofroniew and colleagues (Sofroniew, 2009; Sofroniew and Vinters, 2010; Anderson et al., 2014), with a gradated spectrum of changes, including gain and loss of potential functions. Moreover, the specific profiles of *AQP4up* and *AQP4down* reactive cells reflect the heterogeneity of astrocyte response to specific injury, as stated by Zamanian and colleagues (Zamanian et al., 2012), going a little further than the notion of A1 reactive astrocyte.

Changes undergone by NMO-specific reactive astrocytes have the potential to alter their activity and negatively impact surrounding neural cells. First, these cells promote an inflammatory glial secretome, corroborating other studies on astrocyte secretome in NMO context (Howe et al., 2014). Interestingly, secretion was reduced when NMO-IgG were depleted in AQP4 specific antibodies, confirming the link between auto-antibody and inflammatory phenotype.

Microglia certainly participates in the NMO-IgG-induced secretion as these cells have the ability to release inflammatory cytokines following astrocyte-microglia interplay, thus can be strong inducer of reactive astrocyte (Gao et al., 2013; Rothhammer et al., 2018 ; Liddelow et al., 2017). Interestingly, the secretome signature of NMO-specific reactive astrocytes (IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, CCL3, CCL5, CCL20, CXCL3) is distinct of those induced in animal models of stroke and neuroinflammation other than NMO (IL-1ra, IL-6, IL-17, CCL2, CXCL1, CXCL2, CXCL10) (Zamanian et al., 2012).

Neurotoxicity of IL-1 β and TNF α is expected, as reported in demyelinating and neurodegenerative diseases other than NMO (Lukens and Kanneganti, 2014; Singhal et al., 2014). In addition, alteration of astrocytic transporters, channel and junction proteins, all important modulators of neural cell homeostasis, may also support the potential toxicity of NMO-specific reactive astrocytes. Incapacity for these cells to re-uptake extracellular glutamate, associated with glutamate liberation through altered Cx43 hemichannel, might have serious consequence on neighboring neural cells (Beamer et al., 2016 ; Burnstock, 2016 ; Rothstein et al., 1996). In fact, we show that conditioned medium of NMO-specific reactive astrocytes induce myelin alteration (the present study and Richard et al, submitted), and using our NMO-rat model, we have reported that elevated level of extracellular glutamate is associated with oligodendrocyte death, spinal axon loss and motor dysfunction (Marignier et al., 2010, 2016). To conclude this point, we show that, besides cell death induced through immune mechanism including complement cascade, an autoantibody may lead to dysfunctional cell with serious consequence on neighboring cells. NMO-specific reactive and dysfunctional astrocyte could support the link between astrocytopathy and lesions in NMO.

It is conceivable that disease-specific reactive astrocytes contribute to NMO lesions, notably demyelination and axon loss. Present in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients, NMO-IgG can target astrocytes along the glial-CSF interface and generate dysfunctional astrocytes, promoting a *milieu* toxic for myelin and neurons. In fact, loss of AQP4 and increased Cx43 expression observed in our study models are detected in NMO patients (Masaki et al., 2013). NMO lesions are mainly detected in sites of high AQP4 expression, notably periventricular and hypothalamic areas, the spinal cord and optic nerves, the sites of NMO lesions (Pittock et al., 2006 ; Lucchinetti et al., 2014). However, lesions can extend to nearby tissues, including cerebral hemisphere just beneath the ependyma and the ventral part of brain stem next to *area postrema* (Kim et al., 2011 ; Lu et al., 2011). Spreading, step-by-step, of toxic molecules from NMO-specific reactive astrocytes and subsequent impact on myelin and axons is conceivable. In addition, raise of GFAP expression in NMO-specific reactive astrocytes could explain the presence of this intermediate filament in the cerebrospinal fluid of NMO patients, elevated during relapse (Misu et al., 2009; Storoni et al., 2011)

In the light of these observations, NMO-specific reactive astrocytes are a promising target for therapy. Literature indicates that manipulating extracellular glutamate level through modulation of glutamate transporters function may provide neuroprotection, and several molecules are in clinical trials for diseases other than NMO (Fontana, 2015). Likewise, inflammatory secretome which affect physiological state of surrounding cells, is a potential target. Our attempt to control NMO-specific reactive astrocytes by TGF- β 1 is promising. TGF- β 1 treatment of native (untreated) glial cells reduced the endogenous expression of TNF α and IL-1 β expression, and co-treatment with NMO-IgG reduced

the inflammatory secretome. Moreover, TGF- β 1 prevented the loss of AQP4, GLT1 and GLAST, suggesting the reduction of the NMO-specific reactive astrocyte population. Thus, TGF- β 1 treatment protected myelin and oligodendrocytes in NMO condition. Progress must be done in understanding the mechanism of TGF- β 1-related protection against the toxic effect of NMO-specific reactive astrocyte. In fact, the protective effect of TGF- β 1 to neuronal damages has been already reported in infectious and inflammatory conditions (Cekanaviciute et al., 2014a; b). Also, neural protection could involve IL-6, shown here to be secreted by TGF- β 1-treated reactive astrocytes, because of its participation in remyelination (Haggiag et al., 2001). Also, IL-6 signalling pathway stimulated in astrocyte has been reported to play a beneficial role during neuroinflammation (Ponath et al., 2018). However, contrasting effects have been described for this cytokine (Wang et al., 2012 ; Barros et al., 2016). As a general conclusion, dissecting the mechanisms underlying the reactive gliosis induced in NMO context brings light on NMO pathophysiology, on autoantibody induced cell modulation and may open doors to conceive novel and specific therapy.

REFERENCES

- Anderson MA, Ao Y, Sofroniew MV. 2014. Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neuroscience Letters* 565:23–29.
- Barros PO, Cassano T, Hygino J, Ferreira TB, Centurião N, Kasahara TM, Andrade RM, Linhares UC, Andrade AFB, Vasconcelos CCF, Alvarenga R, Marignier R, Bento CAM. 2016. Prediction of disease severity in neuromyelitis optica by the levels of interleukin (IL)-6 produced during remission phase: The role of IL-6 in the neuromyelitis optica. *Clinical & Experimental Immunology* 183:480–489.
- Beamer E, Göllöncsér F, Horváth G, Bekő K, Otrokocsi L, Koványi B, Sperlágh B. 2016. Purinergic mechanisms in neuroinflammation: An update from molecules to behavior. *Neuropharmacology* 104:94–104.
- Boulay A-C, Saubaméa B, Adam N, Chasseigneaux S, Mazaré N, Gilbert A, Bahin M, Bastianelli L, Blugeon C, Perrin S, Pouch J, Ducos B, Le Crom S, Genovesio A, Chrétien F, Declèves X, Laplanche J-L, Cohen-Salmon M. 2017. Translation in astrocyte distal processes sets molecular heterogeneity at the gliovascular interface. *Cell Discovery* 3:1–20.
- Burnstock G. 2016. An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration. *Neuropharmacology* 104:4–17.
- Cekanaviciute E, Dietrich HK, Axtell RC, Williams AM, Egusquiza R, Wai KM, Koshy AA, Buckwalter MS. 2014a. Astrocytic TGF- Signaling Limits Inflammation and Reduces Neuronal Damage during Central Nervous System Toxoplasma Infection. *The Journal of Immunology* 193:139–149.
- Cekanaviciute E, Fathali N, Doyle KP, Williams AM, Han J, Buckwalter MS. 2014b. Astrocytic transforming growth factor-beta signaling reduces subacute neuroinflammation after stroke in mice: Astrocytic TGF β Reduces Neuroinflammation. *Glia* 62:1227–1240.
- Connors NC, Adams ME, Froehner SC, Kofuji P. 2004. The Potassium Channel Kir4.1 Associates with the Dystrophin-Glycoprotein Complex via α -Syntrophin in Glia. *Journal of Biological Chemistry* 279:28387–28392.
- Diamond B, Huerta PT, Mina-Osorio P, Kowal C, Volpe BT. 2009. Losing your nerves? Maybe it's the antibodies. *Nature Reviews Immunology* 9:449–456.
- Fontana ACK. 2015. Current approaches to enhance glutamate transporter function and expression. *Journal of Neurochemistry* 134:982–1007.

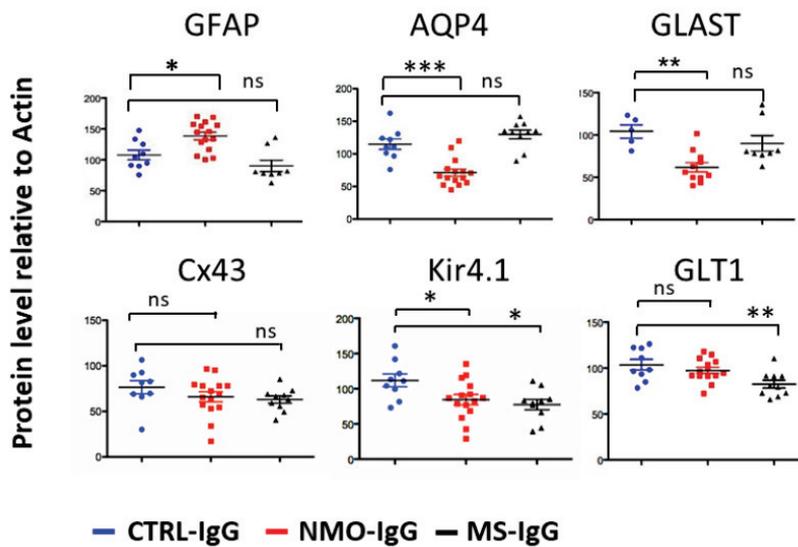
- Gao Z, Zhu Q, Zhang Y, Zhao Y, Cai L, Shields CB, Cai J. 2013. Reciprocal Modulation Between Microglia and Astrocyte in Reactive Gliosis Following the CNS Injury. *Molecular Neurobiology* 48:690–701.
- Haggiag S, Zhang P-L, Slutzky G, Shinder V, Kumar A, Chebath J, Revel M. 2001. Stimulation of myelin gene expression in vitro and of sciatic nerve remyelination by interleukin-6 receptor-interleukin-6 chimera. *Journal of Neuroscience Research* 64:564–574.
- Hinson SR, Clift IC, Luo N, Kryzer TJ, Lennon VA. 2017. Autoantibody-induced internalization of CNS AQP4 water channel and EAAT2 glutamate transporter requires astrocytic Fc receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114:5491–5496.
- Hinson SR, Roemer SF, Lucchinetti CF, Fryer JP, Kryzer TJ, Chamberlain JL, Howe CL, Pittock SJ, Lennon VA. 2008. Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating EAAT2. *Journal of Experimental Medicine* 205:2473–2481.
- Hinson SR, Romero MF, Popescu BFG, Lucchinetti CF, Fryer JP, Wolburg H, Fallier-Becker P, Noell S, Lennon VA. 2012. Molecular outcomes of neuromyelitis optica (NMO)-IgG binding to aquaporin-4 in astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:1245–1250.
- Howe CL, Kaptzan T, Magaña SM, Ayers-Ringler JR, LaFrance-Corey RG, Lucchinetti CF. 2014. Neuromyelitis optica IgG stimulates an immunological response in rat astrocyte cultures: NMO IgG Stimulates Astrocyte Reactivity. *Glia* 62:692–708.
- Kim W, Kim S-H, Kim HJ. 2011. New Insights into Neuromyelitis Optica. *Journal of Clinical Neurology* 7:115.
- Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung W-S, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA. 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541:481–487.
- Lu Z, Zhang B, Qiu W, Kang Z, Shen L, Long Y, Huang J, Hu X. 2011. Comparative Brain Stem Lesions on MRI of Acute Disseminated Encephalomyelitis, Neuromyelitis Optica, and Multiple Sclerosis. *PLoS ONE* 6:e22766.
- Lucchinetti CF, Guo Y, Popescu BFG, Fujihara K, Itoyama Y, Misu T. 2014. The Pathology of an Autoimmune Astrocytopathy: Lessons Learned from Neuromyelitis Optica: Autoimmune Astrocytopathy. *Brain Pathology* 24:83–97.
- Lukens JR, Kanneganti T-D. 2014. Beyond canonical inflammasomes: emerging pathways in IL-1-mediated autoinflammatory disease. *Seminars in Immunopathology* 36:595–609.
- Marignier R, Nicolle A, Watrin C, Touret M, Cavagna S, Varrin-Doyer M, Cavillon G, Rogemond V, Confavreux C, Honnorat J, Giraudon P. 2010. Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury. *Brain* 133:2578–2591.
- Marignier R, Ruiz A, Cavagna S, Nicole A, Watrin C, Touret M, Parrot S, Malleret G, Peyron C, Benetollo C, Auvergnon N, Vukusic S, Giraudon P. 2016. Neuromyelitis optica study model based on chronic infusion of autoantibodies in rat cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroinflammation* 13:1–15.
- Masaki K, Suzuki SO, Matsushita T, Matsuoka T, Imamura S, Yamasaki R, Suzuki M, Suenaga T, Iwaki T, Kira J-I. 2013. Connexin 43 Astrocytopathy Linked to Rapidly Progressive Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica. *PLoS ONE* 8:1–21.
- Misu T, Höftberger R, Fujihara K, Wimmer I, Takai Y, Nishiyama S, Nakashima I, Konno H, Bradl M, Garzuly F, Itoyama Y, Aoki M, Lassmann H. 2013. Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica. *Acta Neuropathologica* 125:815–827.

- Misu T, Takano R, Fujihara K, Takahashi T, Sato S, Itoyama Y. 2009. Marked increase in cerebrospinal fluid glial fibrillar acidic protein in neuromyelitis optica: an astrocytic damage marker. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 80:575–577.
- Pittock SJ, Lucchinetti CF. 2016. Neuromyelitis optica and the evolving spectrum of autoimmune aquaporin-4 channelopathies: a decade later: NMO renamed: autoimmune AQP4 channelopathy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1366:20–39.
- Pittock SJ, Weinshenker BG, Lucchinetti CF, Wingerchuk DM, Corboy JR, Lennon VA. 2006. Neuromyelitis Optica Brain Lesions Localized at Sites of High Aquaporin 4 Expression. *ARCH NEUROL* 63:5.
- Ponath G, Park C, Pitt D. 2018. The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Front Immunol* 9:1–12.
- Rothhammer V, Borucki DM, Tjon EC, Takenaka MC, Chao C-C, Ardura-Fabregat A, de Lima KA, Gutiérrez-Vázquez C, Hewson P, Staszewski O, Blain M, Healy L, Neziraj T, Borio M, Wheeler M, Dragin LL, Laplaud DA, Antel J, Alvarez JI, Prinz M, Quintana FJ. 2018. Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature* 557:724–728.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. 1996. Knockout of Glutamate Transporters Reveals a Major Role for Astroglial Transport in Excitotoxicity and Clearance of Glutamate. *Neuron* 16:675–686.
- Singhal G, Jaehne EJ, Corrigan F, Toben C, Baune BT. 2014. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. *Front Neurosci* 8:1–13.
- Sofroniew MV. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences* 32:638–647.
- Sofroniew MV, Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica* 119:7–35.
- Sorensen A, Moffat K, Thomson C, Barnett SC. 2008. Astrocytes, but not olfactory ensheathing cells or Schwann cells, promote myelination of CNS axons *in vitro*. *Glia* 56:750–763.
- Storoni M, Petzold A, Plant GT. 2011. The Use of Serum Glial Fibrillary Acidic Protein Measurements in the Diagnosis of Neuromyelitis Optica Spectrum Optic Neuritis. *PLoS ONE* 6:1–6.
- Thomson CE, McCulloch M, Sorenson A, Barnett SC, Seed BV, Griffiths IR, McLaughlin M. 2008. Myelinated, synapsing cultures of murine spinal cord - validation as an *in vitro* model of the central nervous system. *European Journal of Neuroscience* 28:1518–1535.
- Varrin-Doyer M, Nicolle A, Marignier R, Cavagna S, Benetollo C, Wattel E, Giraudon P. 2012. Human T Lymphotropic Virus Type 1 Increases T Lymphocyte Migration by Recruiting the Cytoskeleton Organizer CRMP2. *The Journal of Immunology* 188:1222–1233.
- Vasile F, Dossi E, Rouach N. 2017. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Structure and Function* 222:2017–2029.
- Volterra A, Meldolesi J. 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature Reviews Neuroscience* 6:626–640.
- Wang H, Wang K, Zhong X, Dai Y, Qiu W, Wu A, Hu X. 2012. Notable Increased Cerebrospinal Fluid Levels of Soluble Interleukin-6 Receptors in Neuromyelitis Optica. *Neuroimmunomodulation* 19:304–308.
- Weinshenker BG, Wingerchuk DM, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Lennon VA. 2006. NMO-IgG: A Specific Biomarker for Neuromyelitis Optica. *Disease Markers* 22:197–206.

Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, de Seze J, Fujihara K, Greenberg B, Jacob A, Jarius S, Lana-Peixoto M, Levy M, Simon JH, Tenenbaum S, Traboulsee AL, Waters P, Wellik KE, Weinschenker BG. 2015. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* 85:177–189.

Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA. 2012. Genomic Analysis of Reactive Astrogliosis. *Journal of Neuroscience* 32:6391–6410.

SUPPLEMENTARY MATERIAL :



SUPPLEMENTARY FIGURE 1 NMO-IgG but not MS-IgG induce a change in astrocytic proteins levels. Western blot analysis on cell lysate (total proteins) of glial cells treated with NMO-IgG, MS-IgG or CTRL-IgG for 24h showing elevated GFAP expression and loss of AQP4 and GLAST specific of NMO-IgG compared to MS-IgG (17 NMO-IgG, 9 CTRL-IgG, 8 MS-IgG tested, levels relative to actin * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ns $p > 0,05$ Mann Whitney test)

II. Les connexines dans la neuromyéélite optique : un lien entre démyélinisation et astrocytopathie (*Richard et al., soumis en 2019*)

Les résultats décrits dans cette section sont présentés dans l'article « *Connexins in Neuromyelitis Optica, a link between astrocytopathy and demyelination* », de Richard *et al.*, soumis dans Brain en Février 2019.

Contexte de l'étude

Nos précédentes études ont démontré l'implication de l'altération des astrocytes dans la mort oligodendrocytaire et la démyélinisation. En effet, l'IgG-NMO en ciblant l'AQP4 exprimée par les astrocytes provoque une profonde modification du phénotype astrocytaire qui devient alors réactif et dysfonctionnel. La libération et l'accumulation de glutamate serait impliquée dans la mort oligodendrocytaire. Cependant le lien entre la dysfonction astrocytaire et la démyélinisation n'est pas complètement élucidé. Les connexines étant impliquées dans l'établissement d'un réseau neuroglial, et participant à de nombreuses fonctions du SNC, dont la myélinisation, leur altération pourrait participer à la formation d'un environnement nocif pour les oligodendrocytes et la myéline. De plus, la perte d'expression des connexines dans les lésions de patients, où l'astrocyte est préservé, suggère leur implication dans des mécanismes de physiopathogénèse de la NMO. L'objectif de cette seconde étude a donc été d'étudier l'expression et les fonctions des connexines dans le contexte de l'astrocytopathie induite par les IgG-NMO afin d'élucider leur rôle dans la démyélinisation.

Principaux résultats

i) Les IgG-NMO sont capables d'induire une démyélinisation sans addition de complément

L'utilisation de d'IgG-NMO, purifiées du sérum de différents patients a permis de montrer une forte diminution de la densité de myéline ainsi que de la longueur des segments myélinisés dans un modèle de culture reproduisant la myélinisation, après 48 h de traitement. Cet effet était spécifique car il n'était pas observé en présence d'IgG-CTRL, purifiées du sérum de donneurs sains. L'absence de complément confirmait que les IgG-NMO par eux même avait un effet délétère sur la myéline et les oligodendrocytes.

ii) Les IgG-NMO altèrent l'expression et la fonction des connexines gliales

L'expression des connexines gliales, plus précisément de la Cx43, est modifiée par les IgG-NMO après 24 h de traitement, avec une augmentation de la taille des plaques de jonction communicantes observée à la fois en microscopie à fluorescence et électronique. L'étude de l'expression membranaire par fractionnement cellulaire et Western blot a montré une modification d'expression dynamique de la Cx43 et de la Cx30. En effet, nous avons observé une perte d'expression des connexines astrocytaires après 1 h de contact avec les IgG-NMO, puis une augmentation

de leur expression après 24 h. L'AQP4, cible des IgG-NMO, est également dynamiquement modifiée, avec une perte d'expression dès 1 h, cette perte est cependant maintenue après 24 h.

Cette modification d'expression des connexines est associée à une altération de leurs fonctions. L'étude de l'activité jonction communicante par la technique de « *scrap loading dye transfer* » a montré une très forte diminution du couplage intercellulaire en présence d'IgG-NMO, après 24h de traitement. Cette diminution de couplage implique une perturbation des connexines, car une inhibition des connexines, par la carbenoxolone, abolit complètement la diffusion du colorant. L'implication de la Cx43 plus a été particulièrement suggérée, car l'inhibition des jonctions communicantes de Cx43 par le peptide inhibiteur Gap27 a un effet similaire à celui des IgG-NMO sur le couplage intercellulaire.

L'étude de l'activité hémicanal par la technique de « *dye uptake* » a également permis de montrer une altération induite par les IgG-NMO, avec une augmentation après 24 h de traitement. Cet effet était spécifique car l'ouverture était observée en condition de traitement par du lipopolysaccharide, connu pour augmenter l'activité hémicanal, et était bloquée par l'inhibiteur de connexine carbenoxolone. Des résultats préliminaires ont suggéré que l'ouverture des hémicanaux pourrait permettre la libération de glutamate en présence d'IgG-NMO qui serait bloquée par la carbenoxolone.

iii) Les connexines gliales sont impliquées dans la démyélinisation induite par les IgG-NMO

L'utilisation de peptides inhibiteurs spécifiques de la Cx43 bloquant, soit la fonction hémicanal (Gap19), soit la fonction jonction communicante (Gap27) a montré respectivement que bloquer les hémicanaux de Cx43 prévenait la démyélinisation induite par les IgG-NMO et que bloquer les jonctions communicantes conduisait à une démyélinisation similaire à celle des IgG-NMO.

Par ailleurs un modèle animal d'infusion chronique d'IgG-NMO dans le ventricule latéral de rats a permis de montrer une forte diminution de l'expression des connexines gliales surtout après 21 jours post-infusion. En effet, l'expression de la Cx43 astrocytaire et de la Cx47 oligodendrocytaire était fortement diminuée dans la substance blanche et la substance grise de la moelle épinière des rats-NMO. Cette diminution d'expression était associée à une perte oligodendrocytaires (détectés par Olig2), et à une perte de prolongements astrocytaires (détectés avec GFAP). Mais aussi, la diminution d'expression des Cx était co-observée avec la diminution de l'expression de protéines de myéline et avec une perte axonale.

Conclusion

En conclusion, cette étude a montré une profonde **altération de l'expression et des fonctions des connexines** induite par IgG-NMO avec une diminution de l'activité *jonction communicante* et une augmentation de l'activité des *hémicanal*. Le blocage des hémicanaux de Cx43 a permis de prévenir la démyélinisation induite par IgG-NMO alors

que le blocage des jonctions communicantes de Cx43 induisait une démyélinisation similaire à celle d'IgG-NMO. Ainsi une **rupture de l'homéostasie du réseau neuroglial**, associée à l'élévation de libération de molécules actives (glutamate, ATP...) serait impliquée dans la production d'un environnement délétère à la myéline et toxique pour les oligodendrocytes participant à la démyélinisation induite par IgG-NMO.

ARTICLE

Connexins in Neuromyelitis Optica: a link between astrocytopathy and demyelination

Chloé Richard¹, Anne Ruiz¹, Sylvie Cavagna¹, Maxime Bigotte¹, Sandra Vukusic^{2,3}, Pascale Giraudon¹, Romain Marignier^{1,2,3}

¹Inserm U1028, CNRS UMR 5292, Lyon1 University, Center for Research in Neuroscience of Lyon, Lyon, France

²Service de neurologie, sclérose en plaques, pathologies de la myéline et neuro-inflammation, Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

³Centre de référence des maladies inflammatoires rares du cerveau et de la moelle, Lyon, France

Correspondance to : Romain Marignier (MD, PhD)

Centre de référence des maladies inflammatoires rares du cerveau et de la moelle. Service de neurologie, sclérose en plaques, pathologies de la myéline et neuro-inflammation, Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer, 59 boulevard Pinel, 69677 Bron cedex, France. e-mail: romain.marignier@chu-lyon.fr. Phone/fax: +33 (0)4 72 68 13 13 / +33 (0)4 27 86 92 50

Abstract : Neuromyelitis Optica, a rare neuroinflammatory demyelinating disease of the central nervous system, is characterized by the presence of specific pathogenic auto antibodies directed against the astrocytic water channel aquaporin-4 and is now considered as an astrocytopathy associated either to complement dependent astrocyte death or to astrocyte dysfunction. However, the link between astrocyte dysfunction and demyelination remains unclear. We propose glial intercellular communication, supported by connexins hemichannels and gap junctions, to be involved in demyelination process in Neuromyelitis Optica. We used several models of primary cell cultures: astrocytic, mixed glial cells or myelinated, treated for 1 h to 48 h with type G immunoglobulins purified from nine Neuromyelitis Optica patients (NMO-IgG) or four healthy subjects (CTRL-IgG) and a rat model consisting in the chronic infusion for 7 days of either NMO-IgG or CTRL-IgG in the lateral ventricle of the brain. We demonstrate that NMO-IgG are responsible for a complement independent demyelination in myelinated cultures (NMO-IgG decrease myelin density and myelin segment length compared to CTRL-IgG $p < 0.001$). In parallel, NMO-IgG induce an alteration of astrocytic connexin expression characterized by a rapid loss of astrocytic connexins at the membrane followed by an increased size of gap junction plaques (+60% compared to CTRL-IgG $p < 0.01$). This was co-observed with connexin dysfunction with gap junction disruption (-57% compared to CTRL-IgG $p < 0.001$) and increased hemichannel opening (+17% compared to CTRL-IgG $p < 0.001$) associated to glutamate release. Blocking connexin43 hemichannels with a specific peptide was able to prevent NMO-IgG-induced demyelination (myelin density -13% with GAP19 peptide compared to CTRL-IgG $p > 0,05$), whereas the blockade of connexin43 gap junctions with another peptide was detrimental for myelin (myelin density -48% with GAP27 peptide compared to CTRL-IgG $p < 0.001$). The chronic infusion of NMO-IgG in rats' cerebrospinal fluid resulted in a decrease of astrocytic and oligodendrocytic connexins' expression at day 21 post-IgG-infusion in rat spinal cord grey matter (Connexin 43: -36 % $p < 0.0001$ and Connexin 47: -25% $p < 0.0001$ compared to CTRL-IgG infused rats), concomitant with Neuromyelitis Optica-like lesion formation (characterized by a loss of aquaporin-4 and myelin). Our results showed not only alterations of cellular communication through connexins but also their implication in demyelination induced by NMO-IgG. The further identification of mechanisms leading to

connexin dysfunction and soluble factors implicated would provide interesting therapeutic strategies for demyelinating disorders.

Keywords: demyelination; neuromyelitis optica; astrocyte; oligodendrocyte; neuroimmunology

INTRODUCTION

Neuromyelitis Optica (NMO) is a rare neuroinflammatory demyelinating disease of the central nervous system considered as an autoimmune astrocytopathy (Kira, 2011; Ratelade and Verkman, 2012; Jacob *et al.*, 2013). Indeed, NMO is characterized by the presence of auto antibodies (NMO-IgG) directed against the astrocytic water channel aquaporin4 (AQP4) and playing a key role in NMO physiopathology (Lennon, 2005). NMO is a complex disease involving several pathological mechanisms, as suggested by the presence of six types of lesions referenced in patients (Misu *et al.*, 2013): such as complement dependent cell toxicity (Saadoun *et al.*, 2010), cytokine-mediated inflammation (Bradl *et al.*, 2009), inflammatory cell-mediated response (Bennett *et al.*, 2009) and auto antibody-mediated astrocytopathy (Hinson *et al.*, 2010; Marignier *et al.*, 2010, 2016). This later mechanism is of particular importance in NMO. Given the context of auto-immune astrocytopathy, an antibody targeting a membrane protein can induce its internalization or intracellular signaling, leading to a modification of physiological cellular functions (Brimberg *et al.*, 2015). We previously showed that NMO-IgG induced, in association with AQP4 internalization, an alteration of membrane expression of glutamate transporters on astrocytes associated to increased levels of extracellular glutamate (Marignier *et al.*, 2010, 2016). These alterations were co-observed in an original rat model of NMO with myelin and axonal loss but the direct link between astrocytopathy and demyelination remained unclear.

Astrocytes are abundant glial cells known to be key elements in the maintenance of CNS homeostasis. Most astrocytic essential functions depend on the formation of a neuroglial network, established and maintained by connexins (Abrams and Rash, 2009). Connexins are transmembrane molecules assembling in hexameric units called connexon, forming hemichannels (HC), unopposed connexons, or gap junction channels (GJC) by the docking of two connexons and these channels aggregate to form gap junction plaques. Those two functions allow, respectively, exchanges with the extracellular medium or quick cell-to-cell passage of small metabolites and ions (e.g. ATP, glutamate, D-Serine, calcium) under approximately 1 kDa (Abrams and Rash, 2009; Giaume *et al.*, 2013). Several types of connexins (Cx) are expressed in the central nervous system and their expression is particularly high in astrocytes, which mainly express Cx43 and Cx30, and to a lesser extent Cx26. Astrocytes are highly connected by gap junctions. Oligodendrocytes also express a different set of Cx composed of Cx47, Cx32 and Cx29 and can form gap junctions with astrocytes. Glial connexins have many roles such as intercellular signaling, via calcium wave propagation, exchange of metabolites and gliotransmission, essential for neuronal functioning (Giaume and Venance, 1998; Giaume *et al.*, 2013). Moreover, connexins are actively implicated in myelin formation and integrity since they sustain a dialogue between astrocytes, oligodendrocytes and neurons (Cotrina and Nedergaard, 2012; Nualart-Marti *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2016). Connexin expression and GJC and HC functions are highly regulated under physiological conditions and can be altered under pathological conditions by a decrease of extracellular calcium levels, proinflammatory

cytokines or post-translational modifications (Retamal *et al.*, 2007; Giaume *et al.*, 2013; Orellana *et al.*, 2013; Solan and Lampe, 2014; Su and Lau, 2014).

Connexin alterations, especially astrocytic Cx43, have been identified and linked to the severity of the disease in multiple sclerosis (MS) and NMO (Masaki *et al.*, 2013). Moreover, a functional link between AQP4 and Cx43 has been identified, supporting the hypothesis of a connexinopathy induced by autoantibodies directed against AQP4 in NMO (Nicchia *et al.*, 2005). All those observations led us to hypothesize that a disruption of intercellular communications could be one mechanism explaining the link between astrocytopathy and demyelination in the setting of NMO. In this study we proposed to evaluate the potential involvement of connexins in demyelination induced by NMO-IgG.

MATERIAL AND METHODS

Patients' sample and IgG purification

Plasmapheresis of nine patients from the French cohort NOMADMUS, diagnosed as NMOSD (Wingerchuk *et al.*, 2015) were selected from NeuroBioTec biobank (Lyon University Hospital). Eight of them were tested positive for anti-AQP4 immunoglobulin of type G (IgG) and negative for anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) IgG, on a cell-based assay. One patient was tested negative for both anti-AQP4 and anti-MOG auto antibodies. IgG purification was performed as previously described (Marignier *et al.*, 2010, 2016). NMO-IgGs purified from different patients were termed NMO1 to NMO9, NMO1 to NMO8 were tested positive for anti-AQP4 auto antibodies and NMO9 was negative. Sera from four healthy donors were collected from "Etablissement Français du sang" and were tested negative for anti-AQP4 IgG. Purified IgG from healthy donors were termed as CTRL-IgG. IgG purification was performed as previously described (Marignier *et al.*, 2010, 2016). NMO-IgGs and CTRL-IgGs were used individually for the animal model and individually or pooled for cell treatment.

Animals

Surgery procedure of intra-cerebroventricular IgG infusion

This study used eight adult Sprague Dawley male rats of 280 g (Janvier, Le Genest Sant Isle, France). All animal experiments were carried out in strict accordance with the European Directive 2010/63/UE and follows the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines on the protection of animals used for scientific purposes. All experimental procedures on animals were approved by the local Lyon 1 University Animal Care Committee (BH2012-80 project). Surgery and implantation of osmotic micropump for IgG delivery were performed as previously described (Marignier *et al.*, 2016). Two groups were made: the first, composed of five rats, received NMO-IgG (termed NMO-rats) purified from one patient (NMO8) and the second, composed of three rats, received CTRL-IgG (termed CTRL-rats). Animals were sacrificed on day 21 (D21) post-surgery to perform immunohistochemistry assays. Five rats sacrificed at day 7 (D7) post-surgery, used in a previous study (Marignier *et al.*, 2016). Two CTRL-rats and three NMO-rats were included to perform immunohistochemistry assays.

Tissue preparation, immunohistochemistry

At D21, rats were anesthetized and received intracardiac perfusion of sodium chloride solution (100mL, 0.9%) to remove blood cells. Animals were then killed with a lethal dose of pentobarbital. Brain and spinal cord were harvested by removing the skull and meninges and then frozen in isopentane at -30°C to be stored at -80°C. Before immunohistochemistry (IHC) tissues were embedded in Tissue-Tek OCT® and 10 µm sections were prepared on a cryomicrotome (CryoStar NX50, Thermo Scientific). IHC on frozen spinal cord and brain sections was performed as previously described (Marignier *et al.*, 2016). Briefly, after fixation with 4% paraformaldehyde (PFA), unspecific sites for antibody fixation were saturated in a solution composed of 1X phosphate buffered saline (PBS) 0.3% triton X100, 1% Bovine Serum Albumin (BSA), 10% normal goat serum (NGS). Primary antibodies were incubated overnight at 4°C (for dilutions see Table 1). Then, secondary antibodies, coupled with Alexa-488 or Alexa-555 fluorochromes, were incubated 1 h at room temperature (RT). Finally, nuclei were labeled using DAPI solution (0.1 µg/mL) before mounting slides with FluoroProtect® (Millipore). Following IHC, tissue sections were observed with Axio Imager Z1 apotome technology (Zeiss, Oberkochen, Germany) with appropriate filter settings and pictures were taken using AxioVision Rel4.8 software. Image analysis was performed using ImageJ (Wayne Rasband NIH, USA, public domain) to count the number of cells expressing a marker or measure the mean intensity of immunofluorescence.

Cell cultures

Mixed glial cell and astrocytic cultures

Primary mixed glial cell cultures were obtained from 1-day-old rat pups cortices microdissection and mechanical disruption as previously described (Marignier *et al.*, 2010, 2016). To obtain a pure culture of astrocytes, cells were treated with 1 µM of cytosine arabinoside on day in vitro (DIV) 8 and DIV13. Cells were kept for 18 to 22 days before treatment and were used for morphological and biochemical studies.

Myelinating culture

Primary myelinated cultures were obtained from day 15 embryonic rat spinal cord as previously described (Thomson *et al.*, 2008). Briefly, plates and culture chambers were coated with PLL (13 µg/ml in sterile water). Cortical astrocytes, from pure astrocyte culture as described above, were detached with Accutase® solution (Sigma A6964) and resuspended in glial cell culture medium at a density of 200,000 cells/ml. These astrocytes were left to attach for 5 days before myelinating culture plating and were used to improve myelination as described before (Sorensen *et al.*, 2008). Following dissection of embryonic spinal cords, mechanic and enzymatic dissociation, cells were counted, and final volume was adjusted to obtain 700,000 cells per milliliter in plating medium (DMEM 1 g/L glucose supplemented with 1% Penicillin Streptomycin, 25% horse serum, 25% HBSS). Then, 200,000 cells per chamber or 400,000 cells per well, were left to attach for at least 2 h at 37°C with 5% CO₂. Finally, differentiation medium (DMEM GlutaMax 4.5 g/L glucose supplemented with 1% Penicillin Streptomycin, 0.5% N2 supplement (ThermoFisher 1750258), 10 ng/ml biotin, 50 nM hydrocortisone, 10 µg/ml insulin) was added in a proportion of 40% of total volume. Half culture medium was carefully replaced thrice a week and insulin was omitted from culture medium after DIV12. Cells were kept until DIV26, when myelination was optimum, and treated to be used for biochemical and morphological studies.

Cell treatments

Cultures were treated for 1 h to 48 h with either culture medium (no treatment condition termed NT) or purified IgG from healthy donors (CTRL-IgG) or from NMO patients (NMO-IgG) at a concentration of 0,4 mg/ml. For connexin activity examination, treatments with connexin modulators were used: Carbenoxolone (CBX, 50 μ M) was applied 5 min before dye uptake and scrap loading assays; GAP27, a specific mimetic peptide targeting Cx43 extracellular loop (sequence SRPTEKTIFII) and blocking Cx43 GJC and HC (Evans and Leybaert, 2007) was applied 60 min before scrap loading assay; lipopolysaccharide (LPS) at 10 ng/ml was applied 24 h before dye uptake assay to induce HC opening (De Vuyst *et al.*, 2007). To test the implication of Cx in demyelination, we co-treated myelinated cultures with GAP19 (344 μ M), a mimetic peptide specific of Cx43 intracellular loop (sequence KQIEIKKFK) blocking specifically Cx43 HC (Abudara *et al.*, 2014), together with NT, CTRL-IgG or NMO-IgG for 48h or we treated myelinated cultures with GAP27 alone (260 μ M) for 48h. GAP19 and GAP27 peptides were synthesized by Pepnome Inc. (Hongkong, China) with a purity of 95%.

Immunocytochemistry

Immunocytochemistry (ICC) labeling of cultured cells was performed as described before (Marignier *et al.*, 2010) and followed the same protocol as for IHC with different antibody dilutions (Table 1). For myelination evaluation, myelin basic protein (MBP) and phosphorylated neurofilament (pNF) were co-labeled at DIV28 after 48 h treatment. 20 fields per condition and per experiment were taken, by investigators blinded for treatment condition, with a fluorescent microscope equipped with epifluorescence (Axio Imager Z1 apotome technology, Zeiss, Oberkochen, Germany). Image analysis was performed using ImageJ software. The density of myelinated axons was performed by measuring the area fraction represented by MBP or pNF immunoreactivity and making the ratio of the amount of MBP on pNF. The length of myelinated segments was also measured using the segmented line tool of ImageJ.

Transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy (TEM) was performed at the CIQLE facilities (Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est) as described before (Marignier *et al.*, 2016) on myelinated cultures. Approximately 20 fields per condition were taken to examine gap junction plaques, characterized by a specific aspect in TEM with a reduced intercellular space of approximately 2-4 nm. GJC plaque size was evaluated using the segmented line tool of ImageJ software.

Cell fractioning assay and Western blot analysis

Membrane fraction of cultured astrocytes was isolated using the ProteoExtract[®] subcellular proteome extraction kit (Calbiochem 539790) and following user protocol. Briefly, cells were detached using Accutase[®] solution and centrifuged at 300g for 5 min. Then cell pellets were washed trice by addition of washing buffer followed by 5 min incubation on a wheel and 10 min centrifugation at 300g at 4°C. For membrane fraction extraction (cell membrane and organelles), pellets were resuspended in buffer n°2 containing protease and phosphatase inhibitors, incubated 30 min at 4°C on a wheel and centrifuged at 5500g 10 min at 4°C. Supernatant was harvested and kept at -80°C aliquoted. Then immunoblot (Western blot - Wb) was performed on membrane fraction as described before (Varrin-Doyer *et al.*, 2012; Marignier *et al.*, 2016). Briefly, proteins were separated on SDS-PAGE gels and transferred on nitrocellulose

membrane. Then immunodetection was performed with specific primary antibodies (for dilution see Table 1) and anti-IgG secondary antibodies coupled with horseradish peroxidase (HRP). Proteins were revealed using a chemiluminescence assay and signal analysis was performed by measuring band density using ImageJ software.

Gap junction function

GJC coupling was assessed with scrap loading dye transfer technic performed as described previously (Retamal *et al.*, 2007) on myelinated cultures. Briefly, cells were washed in HEPES solution containing (in mM): 150 NaCl, 5.4 KCl, 1 MgCl₂, 5 HEPES, 10 Glucose and 2.4 CaCl₂, for 5 min. Then cells were washed in Calcium-free HEPES solution for 1 min. Fluorescent dye Lucifer yellow (LY, Sigma 10259, 1 mg/ml in calcium-free HEPES solution) was added and scrap-loading was performed using a gauge 23 needle. After 1 min, LY was washed out three times in HEPES solution and after 8 min, acquisition of 10 fields per condition was performed with fluorescent microscope equipped with epifluorescence (Axio Imager Z1 apotome technology, Zeiss, Oberkochen, Germany) and AxioVision Rel 4.8 software. Image analysis was performed using ImageJ to determine LY fluorescent dye diffusion area, expressed in arbitrary units.

Hemichannel function

HC opening was determined using dye uptake of Ethidium Bromide (EtBr). First, cells were washed in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS, in mM: 137 NaCl, 5.4 KCl, 0.34 Na₂HPO₄, 0.44 KH₂PO₄, 1.2 CaCl₂; pH 7.4) then EtBr 0.5 μM was applied for 10 min at 37°C. After three washes in HBSS, cells were fixed with 4% PFA for 10 min at room temperature and washed three times in PBS. DAPI solution was used for nucleus staining (0.1 μg/ml) was incubated 5 min before cells were mounted in fluoropreserve® (Millipore) and examined with confocal microscope Leica SP5 (518 nm excitation and 605 nm emission). Images were then analyzed using ImageJ software to evaluate nuclear fluorescence corresponding to EtBr fixation.

Extracellular Glutamate quantification

Extracellular glutamate level was estimated as described before (Marignier *et al.*, 2010). The measure of amino acid content in glial cell medium was performed using an automatic capillary zone electrophoresis P/ACETM MDQ system (Beckman, USA) equipped with a ZETALIF laser induced fluorescence detector (Picometrics, France; Plateform facilities Neurodialytics, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon). Excitation was performed using a He–Cd laser (Liconix, USA) at a wavelength of 442 nm, the emission wavelength being 490 nm. Separation was carried out on a 63 cm 50 mm fused-silica capillary (Composite Metal Services, Worcester England) with an effective length of 52 cm. The separation conditions were: an applied voltage of 25 kV, hydrodynamic sample injection (10 s at 0.6 psi) and a temperature between 36 and 38°C. The capillary was sequentially flushed for 30 s with 0.25 mol/l NaOH, ultrapure water and running buffer (75 mmol/l sodium borate, pH 9.20 0.02, containing 10 mmol/l HP-β-CD and 70 mmol/l sodium dodecyl sulphate) between analyses. Electropherograms were acquired at 15 Hz using P/ACETM MDQ software.

Cell viability assay

Cell viability was performed using FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II (BD biosciences 556570). First cells were resuspended using accutase and washed twice with PBS. Then cells were resuspended in 1X Binding Buffer solution at a concentration of 10^6 cells /ml. 100 μ l (10^5 cells) were transferred in a flow cytometry tube with 5 μ l propidium iodide solution. Propidium iodide is a membrane impermeant dye that is able to penetrate in dead cells but not living cells. After 15 min incubation, flow cytometry analysis of propidium iodide fluorescence was performed using cytofluorimeter (FC500 MPL, Beckman Coulter) and FlowJo© LLC software V10 to determine the percentage of dead cells in glial cell cultures after treatment with NMO-IgG.

Data collection and statistical analysis

Statistical analyses and graphs were established using GraphPad Prism 5.0. Data on graphs are presented as bars of mean with standard error of mean (SEM) or by box and whiskers representing minimum to maximum values and mean with a “+” sign. Normality of distribution and equality of variances was evaluated using respectively D’Agostino-Pearson and Bartlett’s tests before statistical analysis to choose the appropriate parametric or non-parametric test to compare conditions. Comparison of two conditions as for NMO-rats and CTRL-rats was performed using a t-test or a Mann-Whitney test. For multiple conditions comparison, in *in vitro* models, we used either an ANOVA or Kruskal-Wallis test followed by Dunn’s post-hoc test. For all tests, alpha risk was fixed at 5% so differences were considered significant for $p < 0.05$. Levels of significance were indicated as: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, upon reasonable request.

RESULTS

NMO-IgG induce demyelination in a myelinated culture model.

To assess the implication of NMO-IgG in demyelination, we developed a myelinated culture composed of glial cells (astrocytes, oligodendrocytes and microglial cells) and neurons with myelinated axons. The quality of the culture was validated by labeling myelinated axons with myelin basic protein (MBP) and phosphorylated neurofilament (pNF) and presented nodes of Ranvier expressing neurofascin (Nfasc) (Supplementary Fig. 1A, C). In addition, compaction of myelin was checked by electron microscopy (Supplementary Fig. 1B). The presence of synapses (Supplementary Fig.1D), astrocytes (Supplementary Fig1. E and F), oligodendrocytes mature and precursors (Supplementary Fig.1 F and G), and the presence of astrocytic and oligodendrocytic connexins (Supplementary Fig. 1H and I) was assessed by immunofluorescence labeling. The presence of astrocytic, oligodendrocytic, myelin and neuronal protein was also assessed by Western blot (Supplementary Fig. 1J).

At DIV26, cultures were treated either with culture medium (no treatment: NT), or purified IgG from healthy donors (CTRL-IgG) or from NMO patients (NMO-IgG termed: NMO1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 9) for 48 h. NMO1-7 were tested positive for anti-AQP4 and negative for anti-MOG auto antibodies and NMO9 was tested negative for both anti-AQP4 and anti-MOG auto antibodies. The co-labeling of myelinated axons with MBP and pNF (Fig1. A) allowed myelin

quantification. Myelin density (Fig. 1B), expressed as the ratio of MBP on pNF immunoreactivities, was decreased by 34%, 39%, 52%, 60%, 45%, 58%, 68% by NMO1-7 compared to CTRL-IgG ($p < 0.001$), and by 35% by NMO9 compared to CTRL-IgG ($p < 0.01$).

To further evaluate the effect of NMO-IgG on myelin integrity, we measured the length of myelinated segments (Fig. 1C), expressed in μm , which was strongly decreased by respectively 26%, 23%, 32%, 46%, 28% and 38% by NMO1, 2, 4, 5, 6 and NMO7 compared to CTRL-IgG ($p < 0.01$ and $p < 0.001$). NMO3 and NMO9 didn't show significant differences compared to CTRL-IgG ($p > 0.05$). Finally, the density of axons, determined using the fraction area of pNF immunoreactivity, was only decreased by NMO4 compared to NT (Fig1. D: -40% $p < 0.01$).

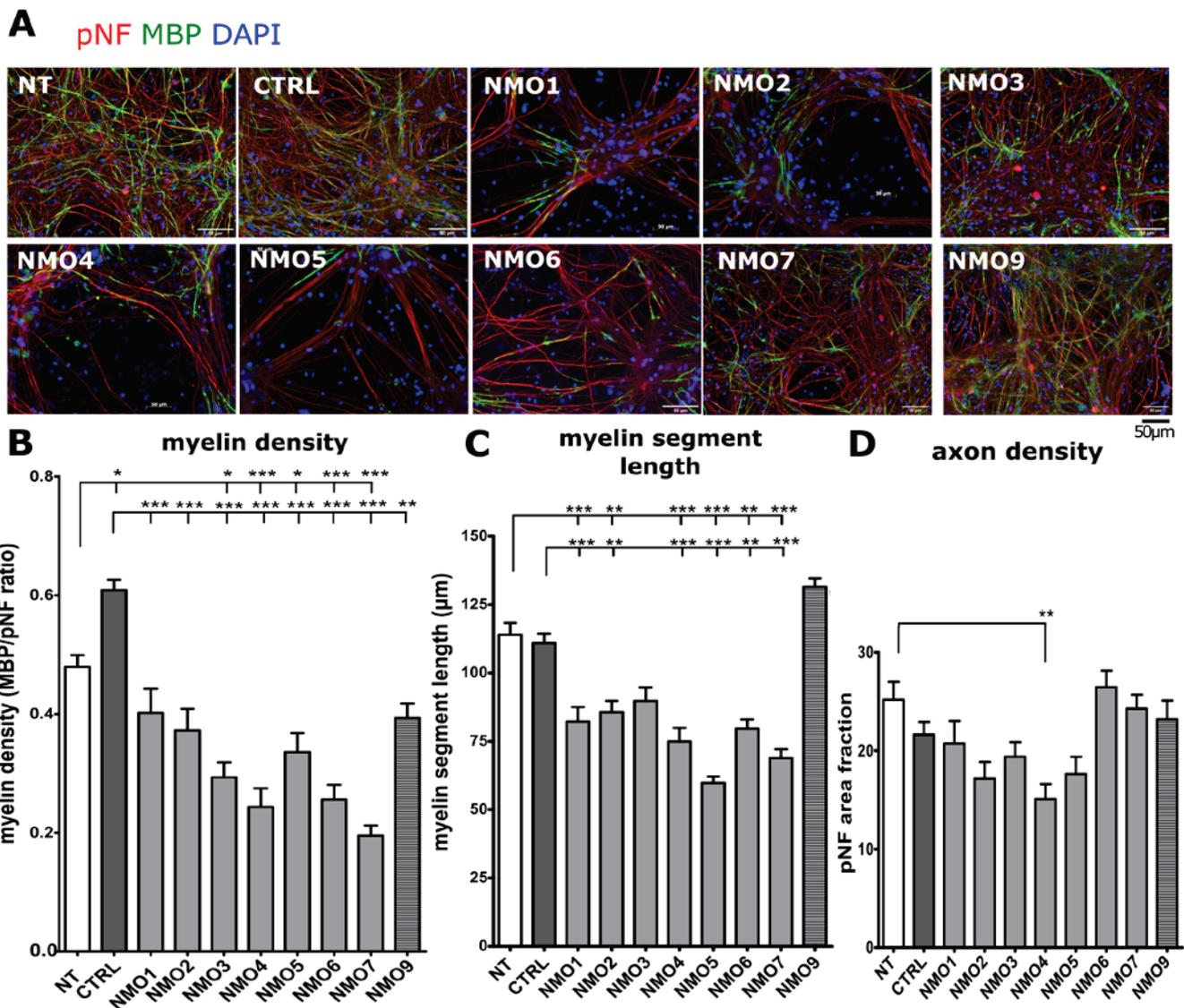


Figure 1: Demyelination is induced by NMO-IgG without complement addition. A: Co-immunolabeling with myelin marker myelin basic protein (MBP, in green) and axon marker phosphorylated neurofilament (pNF, in red) after 48 h treatment with culture medium (no treatment-NT), CTRL-IgG (CTRL) or NMO-IgGs (from 8 different NMO patients: NMO1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 9) B: Myelinated axon density, expressed by the ratio of the amount of MBP on pNF area fraction, is strongly decreased by NMO3, 4, 5, 6, 7 and increased by CTRL when compared to NT. NMO1-7 and NMO9 strongly decrease myelin density when compared to CTRL. C: Myelinated segment length is strongly decreased by NMO1, 2, 4, 5, 6 and 7 compared to NT and compared to CTRL. D: pNF area fraction is only decreased by NMO4 compared to NT. Bars represent mean values + SEM; Kruskal-Wallis analysis and Dunn's post hoc test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. $n = 3$ cultures, each condition in duplicate

NMO-IgG induce a dynamic modification of Cx43 membrane expression

Our hypothesis was that, by targeting AQP4 on astrocyte, NMO-IgG could induce connexin alteration and lead to subsequent demyelination. We first focused on Cx43, the main astrocytic connexin, and assessed its expression in glial cell culture with co-immunolabeling Cx43 and AQP4 after 1 h or 24 h treatment with CTRL-IgG or NMO-IgG (NMO: pool of three patients' IgG - Fig 2A). It showed that NMO-IgG induced an increase in AQP4 spot size and the partial colocalization of AQP4 and Cx43 after 1 h treatment (higher magnification). After 24 h, NMO-IgG increased Cx43 spot size and this was associated to a decrease of AQP4 immunoreactivity (higher magnification). This observation was then validated by a co-immunolabeling of Cx43 with astrocytic cytoskeleton marker GFAP (Fig. 2B), that also showed an increase of Cx43 spot size after 24 h treatment with NMO-IgG but no colocalization with GFAP. To evaluate the presence of gap junctions between astrocytes and oligodendrocytes we performed a co-immunolabeling of Cx43 with Cx47 in our myelinated culture model (Fig. 2C) after 24h treatment with either NT, CTRL-IgG, or NMO-IgG (summative data from 4 NMO patients' IgG) and showed the presence of Cx43-Cx47 partial colocalization (white arrowheads) and an increase of Cx43 spot size with NMO-IgG (NMO1 was chosen for illustration - pink arrowheads). To quantify this alteration, we performed a particle analysis of Cx47 (Fig. 2D) and Cx43 (Fig. 2E) spot size showing no difference between NT, CTRL-IgG and NMO-IgG conditions for Cx47 but an increase in Cx43 spot size induced by NMO-IgG compared to NT (+26.4%, $p < 0.01$) and CTRL-IgG (+25.6% $p < 0.05$).

We then evaluated the presence and the size of gap junction plaques between astrocytes by electron microscopy in a myelinated culture treated 24 with either NT, CTRL-IgG or NMO-IgG (Fig. 2F and G: summative data from 3 NMO patients' IgG). Astrocytes were identified by the abundance of filaments and by the light grey color of their cytoplasm. Gap junction plaque size was increased by NMO-IgG (+60%, $p < 0.01$) when compared to CTRL-IgG (Fig. 2G). Finally, we performed a cell fractioning assay on an astrocytic culture to study the expression of AQP4, and astrocytic connexins Cx43 and Cx30 after either 1 h or 24 h treatment with NT, CTRL-IgG or NMO-IgG (NMO: pool of three patients' IgG). We analyzed their expression in the membrane fraction (comprising cell membrane and organelles) by Western blot (Fig. 2H). Pan Cadherin was used as loading control to perform a semi-quantitative analysis of AQP4, Cx43 and Cx30 expressions (ratio above bands). AQP4, Cx43 and Cx30 expression in the membrane fraction are decreased by respectively 50%, 82% and 40% after 1 h treatment with NMO-IgG compared to CTRL-IgG. After 24 h, AQP4 expression is still decreased by 79% while Cx43 and Cx30 expressions are respectively increased by 79% and 69% by NMO compared to CTRL-IgG.

Altogether, these results show a quick subcellular reorganization of AQP4 and Cx43, induced by NMO-IgG, followed by loss of AQP4 and Cx43 increased expression at membrane associated to larger gap junction plaques.

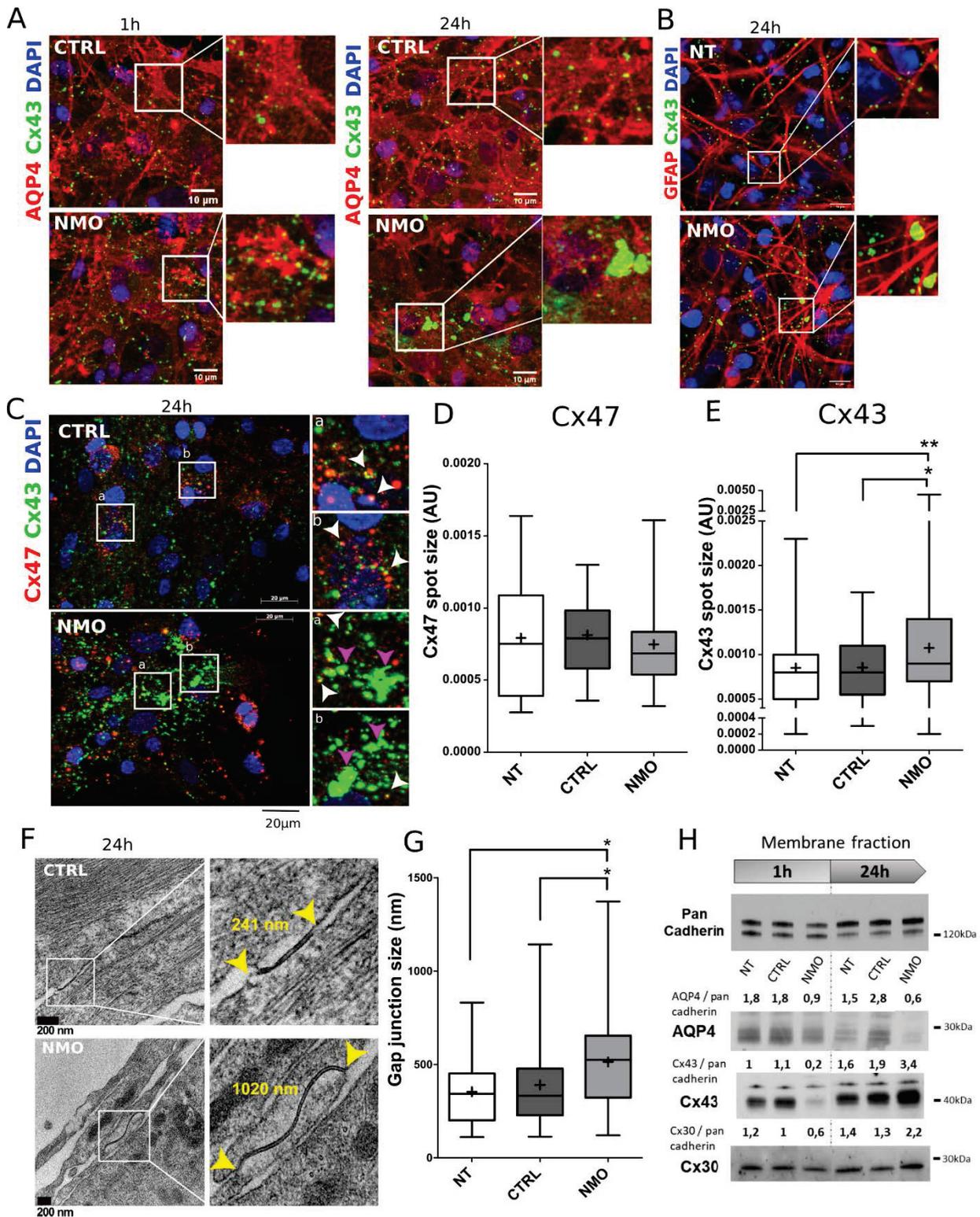


Figure 2: Astrocytic Cx43 membrane expression is altered by NMO-IgG. A: Confocal microscope imaging of Cx43 and AQP4 co-immunolabeling after 1h or 24h treatment of a glial cell culture with CTRL-IgG (CTRL) or NMO IgG (NMO: from a pool of NMO1-3 patients' IgG) showing an increase of Cx43 spot size and a decrease of AQP4 immunoreactivity induced by NMO-IgG after 24h. B: Confocal microscope imaging of Cx43 and GFAP co-immunolabeling in glial cell culture after 24 h in no treatment (NT) and NMO-IgG (NMO: NMO8 patient's IgG) conditions showing an increase of Cx43 spot size in astrocytes C: Apotome image of co-immunolabeling of Cx43 and Cx47 after 24h treatment with CTRL-IgG (CTRL) or NMO-IgG (NMO: NMO1 chosen for illustration) in a myelinated culture showing the presence of Cx43-Cx47 gap junctions in both conditions (white arrows on a and b high magnifications) and an increase in Cx43 spot size (pink arrows on "a" and "b" high magnifications) in NMO condition. D-E: Analysis of Cx47 (D) and Cx43 (E) spot size after 24 h treatment with NT, CTRL-IgG (CTRL) and NMO-IgG (NMO: summative data of NMO1, 2, 4 and 5 patients' IgG) in a myelinated culture showing no significant modification of Cx47 spot size but increased Cx43 spot size in all NMO condition compared to CTRL and NT conditions. F: Electron microscopy imaging of gap junction plaques (delimited by

yellow arrows) in a myelinated culture after 24h treatment with CTRL-IgG (CTRL) or NMO-IgG (NMO: NMO4 chosen for illustration). G: Measurement of gap junction plaque size on electron microscopy pictures after 24 h treatment with NT, CTRL-IgG (CTRL) and NMO-IgG (NMO: summative data of NMO2, 4 and 5 patients' IgG) showing an increase in NMO condition compared to NT and CTRL. H: Connexins expression in astrocyte using cell fractioning and Western blot (Wb) analysis of membrane/organelle fraction after 1 h or 24 h treatment with NT, CTRL-IgG (CTRL) and NMO-IgG (NMO: from a pool of NMO1-3 patients' IgG). Pan Cadherin is a loading control for membrane/organelle fraction that was used to perform a semi-quantitative analysis of AQP4, Cx43 and Cx30 expressions (ratio above bands). AQP4, Cx43 and Cx30 expression are decreased after 1 h in NMO condition compared to CTRL. After 24 h, AQP4 expression is still decreased whereas Cx43 and Cx30 expressions are increased in NMO condition compared to CTRL. Bars represent mean values+ SEM; Kruskal-Wallis analysis of variance and Dunn's post hoc test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; n=1 culture for immunofluorescence assays, n=2 independent experiments for electron microscopy, n=1 experiment for Wb.

NMO-IgG induce connexin dysfunction

Since an alteration of connexin expression could lead to its dysfunction, we studied gap junction and hemichannel functions in glial cultures. Gap junction function was assessed by performing scrap loading dye transfer technic on a myelinated culture treated 24 h in NT, CTRL-IgG or NMO-IgG (NMO : summative data of two pools of three patients' IgG) conditions. We measured the area of diffusion of Lucifer yellow (LY-a fluorescent dye crossing from one cell to another through gap junctions -Fig. 3A), reflecting the amount of gap junction coupling between cells. Dye diffusion area (Fig. 3B) was decreased by NMO-IgG (-57%, $p < 0.001$) compared to CTRL-IgG after 24 h treatment (Fig. 3B). To make sure of the implication of connexins, we blocked either all connexins using carbenoxolone (CBX) or specifically Cx43 gap junctions using the mimetic peptide GAP27, and found, respectively a drastic reduction of dye diffusion (-83% $p < 0.001$ compared to CTRL-IgG) and a decrease of dye diffusion (-44% $p < 0.001$ compared to CTRL-IgG) comparable to NMO-IgG condition ($p > 0.05$).

We also studied hemichannel function and performed ethidium bromide (EtBr) uptake assay on a glial cell culture treated 24 h with NT, CTRL-IgG or NMO-IgG (NMO : summative data of two pools of three patients' IgG). To validate hemichannel functionality in our cell models, we used lipopolysaccharide (LPS) to induce hemichannel opening and CBX to block connexins. EtBr fluorescence was measured in each nucleus of astrocytes (Fig 3C). EtBr uptake in astrocytes was increased by NMO-IgG and LPS compared to CTRL-IgG. As expected, CBX had no effect compared to NT and CTRL-IgG (Fig 3D). To ensure that EtBr increase was not due to cell death, we performed propidium iodide assay of cell death by flow cytometry and showed comparable number of dead cells in NMO-IgG (7,21%), CTRL-IgG (9,65%) and NT (10,9%) conditions after 24 h treatment (supplementary Fig. 2A). A study of the release of glutamate in the supernatant of mixed glial cell culture showed a transient increase in glutamate release after 10 min induced by NMO-IgG (summative data of four patients' IgG) compared to CTRL-IgG (supplementary Fig. 2B). This glutamate release was strongly reduced by CBX in both conditions demonstrating the involvement of connexins in glutamate release. Altogether these results show a severe alteration of glial connexin gap junction and hemichannel functions that could be responsible for a toxic microenvironment and participate in NMO-IgG induced demyelination.

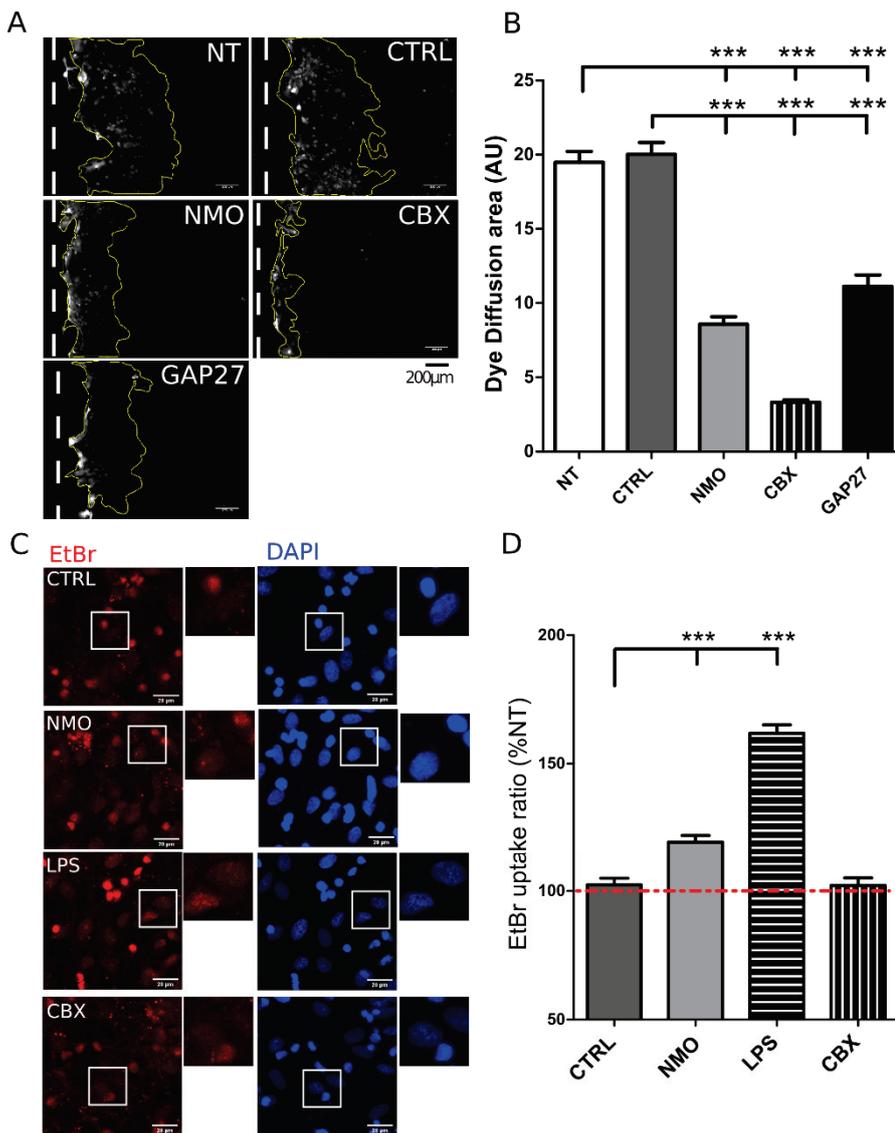


Figure 3: Gap junctional coupling decrease and Hemichannel opening are induced by NMO-IgG. A: Fluorescence images of scrap loading dye transfer assay showing Lucifer yellow diffusion (area delimited by yellow line) from the scrap (white dot line) in a myelinated culture treated 24 h with either no treatment (NT), CTRL-IgG (CTRL) or NMO-IgG (NMO : summative data of two pools of NMO1-3 and NMO4-6 patients' IgG) or treated 5 min with connexin inhibitor carbenoxolone (CBX 50µM); or treated 30 min with GAP27, a mimetic peptide blocking Cx43 gap junction channel. B: Dye diffusion area is strongly decreased in NMO and GAP27 conditions and is almost abolished by CBX compared CTRL and NT conditions (n=2 cultures with each condition in duplicate). C: Confocal microscopy imaging of EtBr (red) and DAPI (blue) after EtBr uptake experiment in mixed glial cells treated 24 h with NT, CTRL-IgG (CTRL), NMO-IgG (NMO : summative data of two pools of NMO1-3 and NMO4-6 patients' IgG) or lipopolysaccharide (LPS) or 5 min with CBX (50µM). D: Measurement of EtBr immunoreactivity in astrocyte nuclei showing an increase induced by NMO and LPS conditions compared to CTRL. EtBr uptake is expressed as a percentage of NT condition showed by the dotted red line (n=1 culture with each condition in duplicate). Bars represent mean values + SEM. Kruskal-Wallis analysis of variances and Dunn's post-hoc analysis *** p<0.001.

Cx43 is implicated in demyelination induced by NMO-IgG

We studied connexins expression in the NMO-rat model, at day seven post-IgG infusion, characterized by decreased loss of astrocyte processes labeled with GFAP (Supplementary Fig. 3A), decreased AQP4 expression (Supplementary Fig. 3C), axonal loss and demyelination (Supplementary Fig. 3E,G) (Marignier *et al.*, 2016). Labeling of Cx43 and GFAP on day seven post-IgG infusion on rat brain sections showed decreased astrocytic Cx43 expression in NMO-rat compared to CTRL-rat in corpus callosum (Fig. 4A) and myelinated fibers of the putamen (Fig. 4B). Since these early alterations may participate in NMO physiopathology, we studied connexins expression at day 21 post-IgG infusion when demyelination is still present, AQP4 and GFAP are decreased (Supplementary Fig. 3B, D, F) together with motor impairment (Marignier *et al.*, 2016).

Immunohistochemistry co-labeling of astrocytic Cx43 with GFAP and oligodendrocytic Cx47 with oligodendrocyte marker Olig2, was performed in the spinal cord of CTRL-rats and NMO-rats (Fig. 4C-F) at day 21 post-IgG-infusion. Cx43 was highly expressed by astrocytes in CTRL-rats spinal cord grey matter (Fig. 4C) and was decreased in NMO-rat (Fig.

4G: -36% $p < 0.0001$) associated to decreased GFAP immunoreactivity in NMO-rats' astrocytes (Fig. 4H: -40%, $p < 0.0001$) compared to CTRL-rats. We also observed a decrease of Cx43 expression in the white matter of the spinal cord (Fig. 4D, K: -44%, $p = 0.0004$) associated to a decrease of GFAP immunoreactivity (Fig. 4D, L: -30%, $p = 0.0031$) in NMO-rats compared to CTRL-rats. The co-immunolabeling of Cx47 and Olig2 (Fig. 4E-F) showed a decrease in both grey and white matter of Cx47 expression (Fig. 4I -25%, $p < 0.0001$; Fig. 4M: -33%, $p < 0.0001$) associated to a loss of Olig2 positive oligodendrocytes (Fig. 4J: -25%, $p < 0.0001$; Fig. 4N: -31%, $p < 0.0001$) in NMO-rats compared to CTRL-rats.

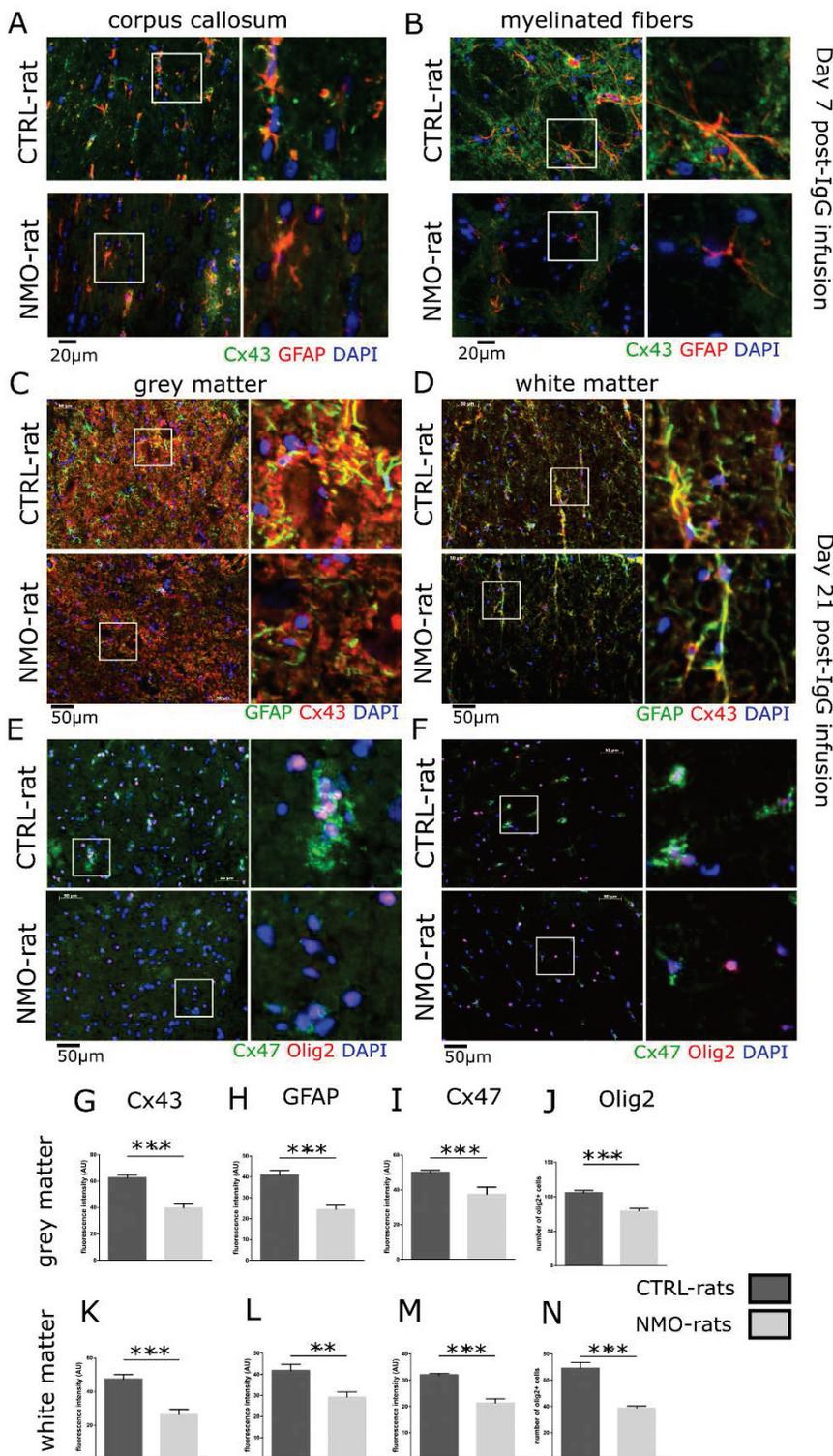


Figure 4: Astrocytic Cx43 and oligodendrocytic Cx47 are decreased by NMO-IgG in the NMO-rat model. A-B: co-immunolabeling of Cx43 (green) and GFAP (red) in rat brain sections in the corpus callosum (A) and myelinated fibers of the putamen (B) regions after 7 days post-IgG-infusion (n=1 CTRL-rat and n=1 NMO-rat). C-D: co-immunolabeling of Cx43 (in red) and GFAP (in green) in spinal cord grey matter (C) and white matter (D) of CTRL-rats and NMO-rats at day 21 post-IgG-infusion. E-F: co-immunolabeling of Cx47 (in green) and Olig2 (in red) in spinal cord grey matter (E) and white matter (F) of CTRL-rats and NMO-rats at day 21 post-IgG-infusion. G-N: Analysis Cx43, GFAP, Cx47 and Olig2 expression in spinal cord grey (G-J) and white matter (K-N). Measure of Cx43 (G, K), GFAP (H, L) and Cx47 (I, M) immunoreactivities and count of Olig2 positive cells (J, N) showing a decrease of their expression in NMO-rats compared to CTRL-rats. Bars represent mean values + SEM; Mann-Whitney test ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$; n=3 CTRL-rats and n=5 NMO-rats.

To further test the direct implication of Cx alteration on demyelination induced by NMO-IgG, we treated myelinated cultures for 48 h with either NT, CTRL-IgG or NMO-IgG (summative data of two pools of three patients' IgG) or those three conditions co-treated with the mimetic peptide GAP19 that blocks specifically astrocytic Cx43 hemichannels. GAP27 mimetic peptide was also used alone to test the effect of Cx43 gap junction and hemichannel blockade on myelin integrity. Co-immunolabeling of MBP and pNF (Fig. 5A) and evaluation of myelin density and length of myelinated segments showed a decrease induced by NMO-IgG compared to CTRL-IgG (Fig. 5B: -40%, $p < 0.001$; Fig. 5C: -32%, $p < 0.001$). But more interestingly, myelin was preserved in NMO-IgG treated condition co-treated with GAP19 (Fig. 5A).

Indeed, density of myelin was not significantly reduced by NMO-IgG compared to CTRL-IgG when co-treated with GAP19 (Fig 5B), and it even induced an increase in myelinated segment length in NMO-IgG with GAP19 compared to CTRL-IgG with GAP19 (Fig 5C: +27%, $p < 0.001$). By contrast, GAP27 peptide had a deleterious effect on myelin, comparable to NMO effect, inducing a drastic reduction of myelin density and myelinated segment length compared to CTRL-IgG (Fig. 5B: -49%, $p < 0.001$; Fig. 5C: -34%, $p < 0.001$). GAP19 peptide alone didn't have any effect on myelin density or segment length (Fig 5, NT GAP19). Quantification of axon density didn't show significant differences between all conditions (Fig. 5D).

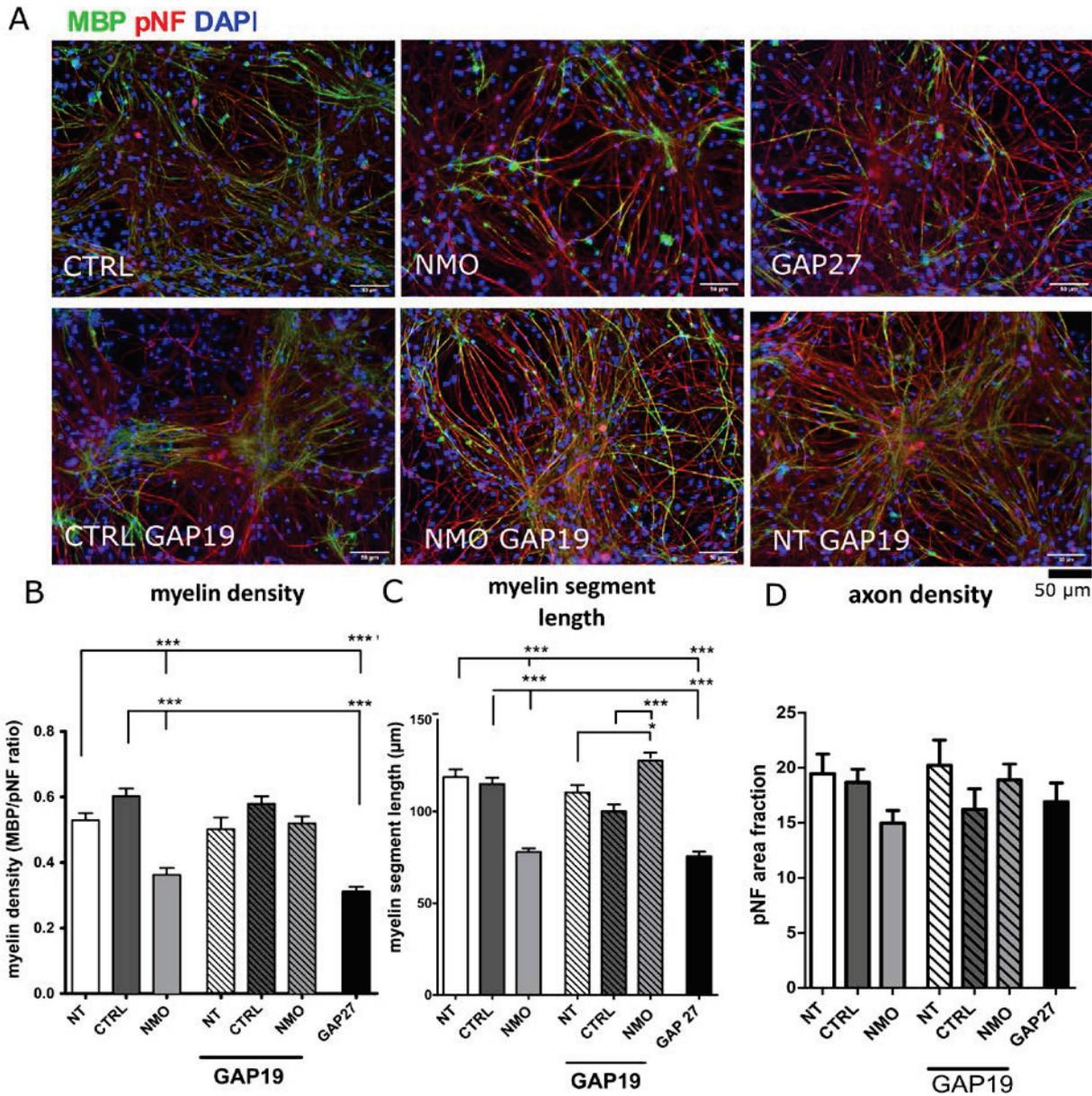


Figure 5: Modulation of Cx43 functions impacts demyelination induced by NMO-IgG. A: Co-immunolabeling of axons (pNF, in red) and myelin (MBP, in green) on a myelinated culture at DIV28 after 48 h treatment with either NT (not shown), CTRL-IgG (CTRL) or NMO-IgG (NMO : summative data of two pools of NMO1-3 and NMO4-6 patients' IgG) and in co-treatment with the Cx43 hemichannel blocker GAP19, or treated solely with the Cx43 gap junction and hemichannel blocker GAP27. B: Evaluation of myelin density showing a decrease induced by NMO compared to CTRL condition that is prevented by a co-treatment with GAP19. C: Evaluation of myelin segment length showing a decrease induced by NMO compared to CTRL and an increase in NMO with GAP19 co-treatment compared to NT and CTRL co-treated with GAP19. GAP27 alone strongly decreases both density and length of myelin segments compared to NT (B-C). D: Evaluation of pNF density by the area fraction of pNF immunoreactivity showing no statistical differences between conditions. Kruskal-Wallis analysis of variances and Dunn's post-hoc analysis * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Bars represent mean values + SEM. $n = 2$ culture with each condition in duplicate.

DISCUSSION

Here we demonstrated that NMO patients' IgG, but not healthy donor IgG, are responsible for a complement independent demyelination. In parallel, we showed an alteration of both expression and function of astrocytic connexins Cx43 and Cx30 after NMO-IgG exposure with a rapid but transient loss of those connexins at membrane

followed by an increased size of gap junction plaques. This was associated to connexin dysfunction, with decreased gap junction coupling in neuroglial syncytium and increased connexin hemichannel opening. These alterations are suggested to be responsible for demyelination induced by NMO-IgG, since blocking Cx43 hemichannels prevented demyelinating effect of NMO auto antibodies.

If we consider that alteration of glial connexins is the link between astrocyte dysfunction and demyelination in NMO, the factors responsible for demyelination remain to be identified. Many signalling molecules, such as gliotransmitters and ions, are released by connexin hemichannels (Giaume *et al.*, 2013) and could have toxic effect. This idea is supported by our previous work showing the cell toxicity of molecules released by NMO-IgG-treated astrocytes (Marignier *et al.*, 2010).

ATP and glutamate are good candidates as they could be over-released by astrocytes with elevated Cx43 hemichannel activity and are known to be toxic for neurons and oligodendrocytes (Orellana *et al.*, 2011). In addition, hemichannels are activated by glutamate (De Vuyst *et al.*, 2007). Thus, the reported downregulation of glutamate transporters expression (Hinson *et al.*, 2008; Marignier *et al.*, 2016) induced by NMO-IgG and elevated extracellular glutamate level may be a major trigger of connexin hemichannel dysfunction and the subsequent demyelination. We show that blocking Cx43 hemichannel activity by GAP19 prevents myelin loss, showing the crucial role of Cx43 hemichannel in NMO-IgG-induced demyelination. By contrast, blocking Cx43 gap junction channels and hemichannels, by GAP27, led to an even worse demyelinating effect than NMO-IgG.

The low level of hemichannel activity in basal conditions in our cellular study model suggests that GAP27 primarily blocked Cx43 gap junction activity, leading to demyelination, and mimicking the NMO-IgG effect. Thus, NMO-IgG-induced demyelination could result from concomitant hyperactivity of Cx43 hemichannel and disruption intercellular coupling supported by Cx43 gap junction channels. The loss of trophic support from astrocytes towards oligodendrocytes, as well as ions homeostasis disruption, could also be implicated in NMO-IgG-induced demyelination. In fact, not only astrocytes are coupled to one another but they form gap junction channels with oligodendrocytes (Nualart-Martí *et al.*, 2013). Since Cx43 is essential for Cx47 expression and stability (May *et al.*, 2013), one may hypothesize that the downregulation of Cx43 precedes Cx47 which could participate to oligodendrocyte suffering and demyelination. Our results corroborates observations made in NMO and MS patients showing decrease of both connexins in active lesions and a link between Cx43 loss and disease severity (Masaki *et al.*, 2013). Interestingly Cx43, because of its high expression in astrocyte endfeet, plays a key role in promoting immune quiescence of the brain (Boulay *et al.*, 2015).

Apart from direct action of NMO-IgG on AQP4, a proinflammatory environment can decrease gap junction activity and increase hemichannel activities in astrocytes (De Vuyst *et al.*, 2007; Retamal *et al.*, 2007; Orellana *et al.*, 2013). Interestingly, it has been shown that NMO-IgG can induce a specific immune response characterized by the activation of proinflammatory cytokines and chemokines genes (Howe *et al.*, 2014). Thus, NMO-IgG could trigger astrocyte

dysfunction and promote the formation of a proinflammatory environment responsible for connexin dysfunction. Since auto antibodies can also bind to Fc receptors, NMO-IgG could activate microglia and induce the release of ATP, glutamate or proinflammatory cytokines that could sustain a deleterious dialogue between astrocytes and microglia. This vicious circle could trigger connexin dysfunction and change astrocyte phenotype that may be neurotoxic (Retamal *et al.*, 2007; Liddelow *et al.*, 2017).

Apart from demyelination, alteration of connexin may also interfere with neuronal function. In fact, astrocytes are known for their role in tripartite synapse and are part of the neuroglial network, sustained by connexins, which is crucial for synaptic plasticity and cognitive functions (Rouach *et al.*, 2008; Pannasch *et al.*, 2011; Dallérac and Rouach, 2016). Evidence of cognitive impairments in NMO patients with cortical lesions, characterized by neuronal loss but no demyelination, could also involve astrocyte dysfunction, since AQP4 expression is decreased without astrocyte loss (Saji *et al.*, 2013). It would be interesting to the effect of NMO-IgG on neuronal activity and synaptic plasticity in presence of NMO-IgG since they trigger connexin dysfunction.

To conclude, this study highlights the crucial role of neuroglial interactions in NMO and shows how astrocytic connexin dysfunction can lead to deleterious effects on oligodendrocytes and neurons (Cotrina and Nedergaard, 2012).

Prevention of demyelination by connexin inhibitors, as demonstrated on our myelinated culture model, should be further validated *in vivo*. In fact, in other diseases, treatment with connexin modulators has recently shown interesting outcomes in patients (Charvériat *et al.*, 2017). This opens modulators of connexins as a promising therapeutic alternative in neurological disorder.

Acknowledgements

We thank Nathalie Dufay from NeuroBioTec-Banques (Hospices Civiles de Lyon, France) for providing Neuromyelitis Optica patients' samples and plasmaphereses, Sandrine Parrot from Neurodialytics platform (Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, France) for performing extracellular glutamate dosage and Elisabeth Errazuriz and Christel Cassin from CIQLE (Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est, France) for their expertise in electron microscopy.

Funding

The present study is supported by a grant from ARSEP foundation ; a grant provided by the French State and handled by the "Agence Nationale de la Recherche" within the framework of the "Investments for the Future" program, under the reference ANR-10-COHO-002 Observatoire Français de la Sclérose en Plaques (OFSEP) and by a grant from "Déchaine ton Coeur" association.

Competing interest:

The authors declare having no competing interest relative to this study.

REFERENCES

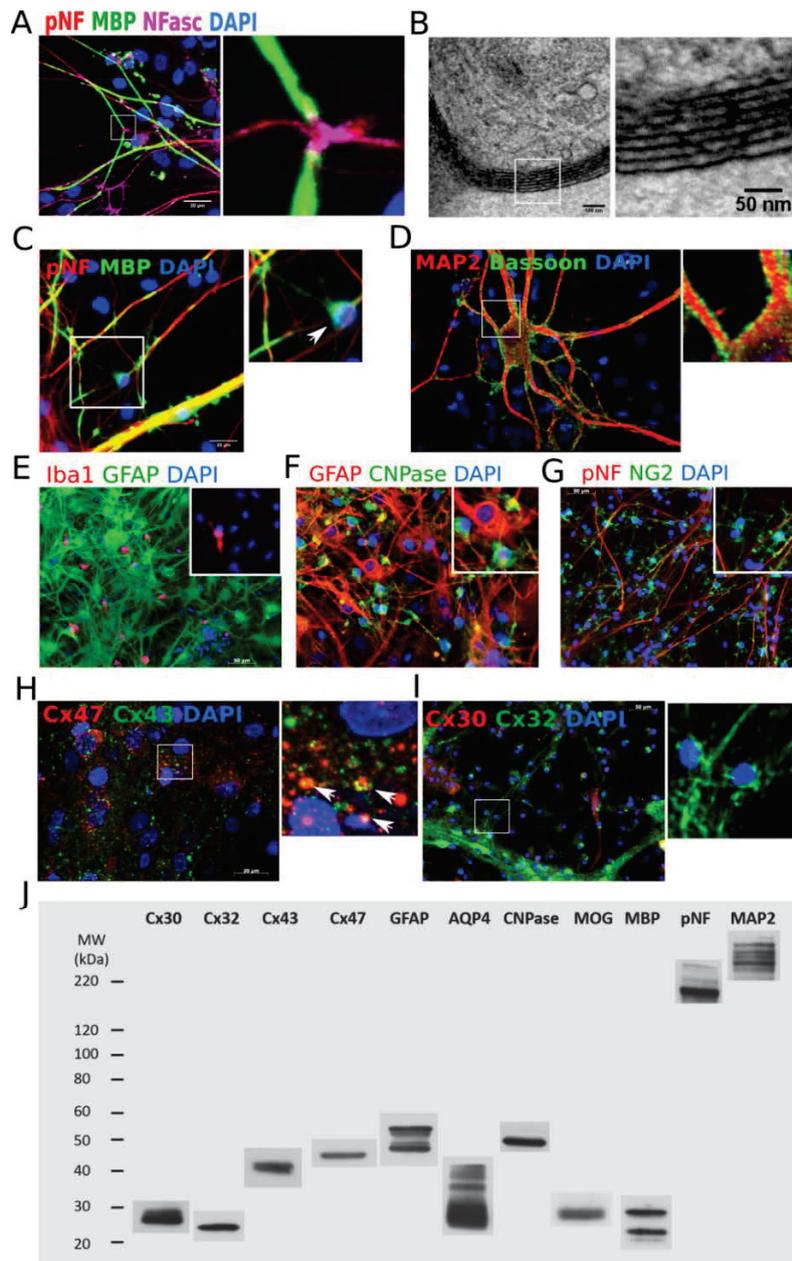
- Abrams CK, Rash JE. Connexins in the Nervous System. In: Harris AL, Locke D, editor(s). *Connexins: A Guide*. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. p. 323–357.
- Abudara V, Bechberger J, Freitas-Andrade M, De Bock M, Wang N, Bultynck G, et al. The connexin43 mimetic peptide Gap19 inhibits hemichannels without altering gap junctional communication in astrocytes. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2014; 8: 306.
- Bao X, Reuss L, Altenberg GA. Regulation of Purified and Reconstituted Connexin 43 Hemichannels by Protein Kinase C-mediated Phosphorylation of Serine 368. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 20058–20066.
- Bennett JL, Lam C, Kalluri SR, Saikali P, Bautista K, Dupree C, et al. Intrathecal pathogenic anti-aquaporin-4 antibodies in early neuromyelitis optica. *Annals of Neurology* 2009; 66: 617–629.
- Boulay A-C, Mazeraud A, Cisternino S, Saubamea B, Maily P, Jourden L, et al. Immune Quiescence of the Brain Is Set by Astroglial Connexin 43. *Journal of Neuroscience* 2015; 35: 4427–4439.
- Bradl M, Misu T, Takahashi T, Watanabe M, Mader S, Reindl M, et al. Neuromyelitis optica: Pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. *Annals of Neurology* 2009; 66: 630–643.
- Brimberg L, Mader S, Fujieda Y, Arinuma Y, Kowal C, Volpe BT, et al. Antibodies as Mediators of Brain Pathology.[Review]. *Trends in Immunology* 2015; 36: 709–724.
- Charvériat M, Naus CC, Leybaert L, Sáez JC, Giaume C. Connexin-Dependent Neuroglial Networking as a New Therapeutic Target.[Review]. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2017; 11: 174.
- Cotrina ML, Nedergaard M. Brain connexins in demyelinating diseases: Therapeutic potential of glial targets.[Review]. *Brain Research* 2012; 1487: 61–68.
- Dallérac G, Rouach N. Astrocytes as new targets to improve cognitive functions.[Review]. *Progress in Neurobiology* 2016; 144: 48–67.
- De Vuyst E, Decrock E, De Bock M, Yamasaki H, Naus CC, Evans WH, et al. Connexin Hemichannels and Gap Junction Channels Are Differentially Influenced by Lipopolysaccharide and Basic Fibroblast Growth Factor. *Molecular Biology of the Cell* 2007; 18: 34–46.
- Diamond B, Honig G, Mader S, Brimberg L, Volpe BT. Brain-Reactive Antibodies and Disease.[Review] *Annual Review of Immunology* 2013; 31: 345–385.
- Ek-Vitorin JF, King TJ, Heyman NS, Lampe PD, Burt JM. Selectivity of connexin 43 channels is regulated through protein kinase C-dependent phosphorylation. *Circulation research* 2006; 98: 1498–1505.
- Evans WH, Leybaert L. Mimetic Peptides as Blockers of Connexin Channel-Facilitated Intercellular Communication. *Cell Communication & Adhesion* 2007; 14: 265–273.
- Falk MM, Kells RM, Berthoud VM. Degradation of connexins and gap junctions.[Review]. *FEBS Letters* 2014; 588: 1221–1229.
- Giaume C, Leybaert L, Naus C C, Sáez J-C. Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles.[Review]. *Frontiers in Pharmacology* 2013; 4: 88.
- Giaume C, Venance L. Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia* 1998; 24: 50–64.
- Hinson SR, McKeon A, Lennon VA. Neurological autoimmunity targeting aquaporin-4.[Review]. *Neuroscience* 2010; 168: 1009–1018.
- Hinson SR, Roemer SF, Lucchinetti CF, Fryer JP, Kryzer TJ, Chamberlain JL, et al. Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating EAAT2. *Journal of Experimental Medicine* 2008; 205: 2473–2481.
- Howe CL, Kaptzan T, Magaña SM, Ayers-Ringler JR, LaFrance-Corey RG, Lucchinetti CF. Neuromyelitis optica IgG stimulates an immunological response in rat astrocyte cultures: NMO IgG Stimulates Astrocyte Reactivity. *Glia* 2014; 62: 692–708.
- Iorio R, Fryer JP, Hinson SR, Fallier-Becker P, Wolburg H, Pittock SJ, et al. Astrocytic autoantibody of neuromyelitis optica (NMO-IgG) binds to aquaporin-4 extracellular loops, monomers, tetramers and high order arrays. *J Autoimmun* 2013; 40: 21–27.
- Jacob A, McKeon A, Nakashima I, Sato DK, Elson L, Fujihara K, et al. Current concept of neuromyelitis optica (NMO) and NMO spectrum disorders.[Review]. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2013; 84: 922–930.
- Kira J. Autoimmunity in neuromyelitis optica and opticospinal multiple sclerosis: Astrocytopathy as a common denominator in demyelinating disorders.[Review]. *Journal of the Neurological Sciences* 2011; 311: 69–77.
- Lennon VA. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *Journal of Experimental Medicine* 2005; 202: 473–477.
- Li T, Giaume C, Xiao L. Connexins-Mediated Glia Networking Impacts Myelination and Remyelination in the Central Nervous System.[Review]. *Molecular Neurobiology* 2014; 49: 1460–1471.

- Liddelw SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 2017; 541: 481–487.
- Mader S, Brimberg L, Diamond B. The Role of Brain-Reactive Autoantibodies in Brain Pathology and Cognitive Impairment.[Review]. *Frontiers in Immunology* 2017; 8: 1101.
- Marignier R, Nicolle A, Watrin C, Touret M, Cavagna S, Varrin-Doyer M, et al. Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury. *Brain* 2010; 133: 2578–2591.
- Marignier R, Ruiz A, Cavagna S, Nicole A, Watrin C, Touret M, et al. Neuromyelitis optica study model based on chronic infusion of autoantibodies in rat cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroinflammation* 2016; 13: 111.
- Markoullis K, Sargiannidou I, Schiza N, Roncaroli F, Reynolds R, Kleopa KA. Oligodendrocyte Gap Junction Loss and Disconnection From Reactive Astrocytes in Multiple Sclerosis Gray Matter. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2014; 73: 865–879.
- Masaki K, Suzuki SO, Matsushita T, Matsuoka T, Imamura S, Yamasaki R, et al. Connexin 43 Astrocytopathy Linked to Rapidly Progressive Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica. *PLoS ONE* 2013; 8: e72919.
- May D, Tress O, Seifert G, Willecke K. Connexin47 Protein Phosphorylation and Stability in Oligodendrocytes Depend on Expression of Connexin43 Protein in Astrocytes. *Journal of Neuroscience* 2013; 33: 7985–7996.
- Misu T, Höftberger R, Fujihara K, Wimmer I, Takai Y, Nishiyama S, et al. Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica. *Acta Neuropathologica* 2013; 125: 815–827.
- Nicchia GP, Srinivas M, Li W, Brosnan CF, Frigeri A, Spray DC. New possible roles for aquaporin-4 in astrocytes: cell cytoskeleton and functional relationship with connexin43. *The FASEB Journal* 2005; 19: 1674–1676.
- Niu J, Li T, Yi C, Huang N, Koulakoff A, Weng C, et al. Connexin-based channels contribute to metabolic pathways in the oligodendroglial lineage. *Journal of Cell Science* 2016; 129: 1902–1914.
- Nualart-Martí A, Solsona C, Fields RD. Gap junction communication in myelinating glia.[Review]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2013; 1828: 69–78.
- Orellana JA, Froger N, Ezan P, Jiang JX, Bennett MVL, Naus CC, et al. ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels: Astroglial hemichannels induce neuronal death. *Journal of Neurochemistry* 2011; 118: 826–840.
- Orellana JA, Martínez AD, Retamal MA. Gap junction channels and hemichannels in the CNS: Regulation by signaling molecules.[Review]. *Neuropharmacology* 2013; 75: 567–582.
- Pannasch U, Vargova L, Reingruber J, Ezan P, Holcman D, Giaume C, et al. Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; 108: 8467–8472.
- Ratelade J, Verkman AS. Neuromyelitis optica: Aquaporin-4 based pathogenesis mechanisms and new therapies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2012; 44: 1519–1530.
- Retamal MA, Froger N, Palacios-Prado N, Ezan P, Saez PJ, Saez JC, et al. Cx43 Hemichannels and Gap Junction Channels in Astrocytes Are Regulated Oppositely by Proinflammatory Cytokines Released from Activated Microglia. *Journal of Neuroscience* 2007; 27: 13781–13792.
- Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 2008; 322: 1551–1555.
- Saadoun S, Waters P, Bell BA, Vincent A, Verkman AS, Papadopoulos MC. Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice. *Brain* 2010; 133: 349–361.
- Saji E, Arakawa M, Yanagawa K, Toyoshima Y, Yokoseki A, Okamoto K, et al. Cognitive impairment and cortical degeneration in neuromyelitis optica. *Annals of Neurology* 2013; 73: 65–76.
- Solan JL, Lampe PD. Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. *FEBS Letters* 2014; 588: 1423–1429.
- Sorensen A, Moffat K, Thomson C, Barnett SC. Astrocytes, but not olfactory ensheathing cells or Schwann cells, promote myelination of CNS axons in vitro. *Glia* 2008; 56: 750–763.
- Su V, Lau AF. Connexins: Mechanisms regulating protein levels and intercellular communication. *FEBS Letters* 2014; 588: 1212–1220.
- Thomson CE, McCulloch M, Sorenson A, Barnett SC, Seed BV, Griffiths IR, et al. Myelinated, synapsing cultures of murine spinal cord - validation as an *in vitro* model of the central nervous system. *European Journal of Neuroscience* 2008; 28: 1518–1535.
- Varrin-Doyer M, Nicolle A, Marignier R, Cavagna S, Benetollo C, Wattel E, et al. Human T Lymphotropic Virus Type 1 Increases T Lymphocyte Migration by Recruiting the Cytoskeleton Organizer CRMP2. *The Journal of Immunology* 2012; 188: 1222–1233.
- Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* 2015; 85: 177–189.

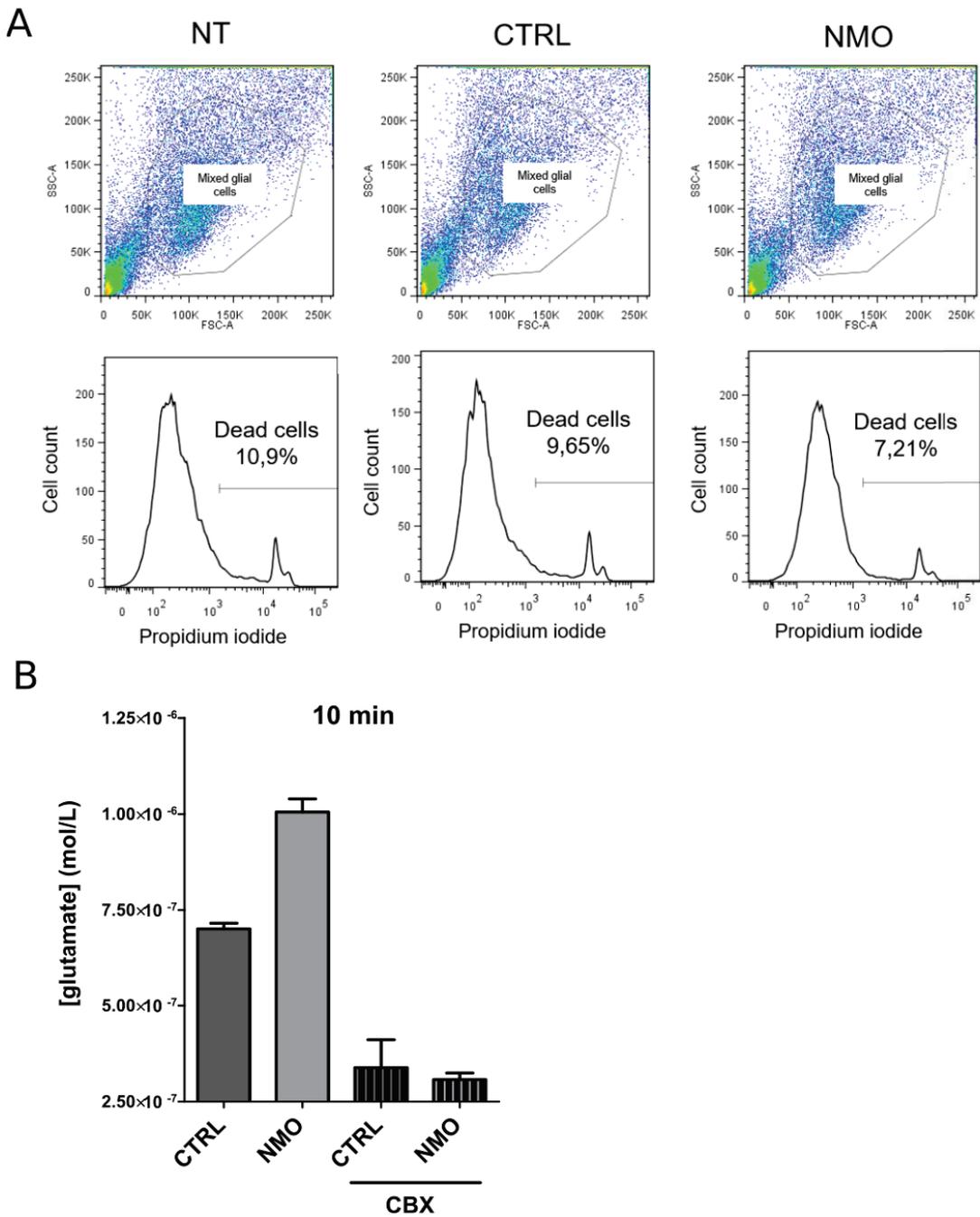
SUPPLEMENTARY MATERIAL

Protein	Reference	Supplier	Host	ICC	IHC	WB	Used in figure
Aquaporin-4	AB2218	Millipore	Rabbit	1/50	1/50	1/4000	Fig. 2, Supplementary Fig. 1
Bassoon	AB82958	Abcam	Mouse	1/200			Supplementary Fig. 1
2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	C5922	Sigma	Mouse	1/100		1/500	Supplementary Fig. 1
Connexin 30	712200	Life technology	Rabbit	1/50		1/300	Supplementary Fig. 1
Connexin 32	345700	Invitrogen	Rabbit	1/50		1/600	Supplementary Fig. 1
Connexin 43	610062	BD pharmingen	Mouse	1/50		1/600	Fig. 2, Supplementary Fig. 1
Connexin 43	710700	Invitrogen	Rabbit	1/50	1/500	1/1000	Fig. 2 , Fig. 4, Supplementary Fig. 1
Connexin 47	374500	Invitrogen	Mouse	1/50	1/200	1/500	Fig. 2, Fig. 4, Supplementary Fig. 1
Glial Fibrillary Acidic Protein	556330	BD pharmingen	Mouse	1/100	1/1000	1/40.000	Fig. 2, Fig. 4, Supplementary Fig. 1
Ionized calcium binding adaptor molecule 1	019-19741	Wako	Rabbit	1/100			Supplementary Fig. 1
microtubule associated protein 2	AB5622	Abcam	Rabbit	1/100		1/2000	Supplementary Fig. 1
Myelin Basic Protein	MCA70	Serotec	Mouse	1/50	1/50	1/250	Fig.1, Fig. 4, Fig. 5, Supplementary Fig. 1, Supplementary Fig. 3
Myelin oligodendrocyte glycoprotein	MAB5680	Millipore	Mouse			1/2000	Supplementary Fig. 1
Neurofascin	AF3235	R&D systems	Chicken	1/100			Supplementary Fig. 1
Neuroglial antigen 2	MAB5384	Chemicon	Mouse	1/200			Supplementary Fig. 1
Oligodendrocyte transcription factor	Ab9610	abcam	Rabbit	1/100	1/500		Fig. 4, Supplementary Fig. 1
Pan Cadherin	C1821	Sigma	Mouse			1/250	Fig. 2
Phosphorylated neurofilament	BLE840801	Biolegend	Rabbit	1/250		1/5000	Fig.1, Fig. 4, Fig. 5, Supplementary Fig. 1, Supplementary Fig. 3
Proteo Lipid protein	MAB3888	Chemicon	Mouse	1/100	1/100	1/250	Supplementary Fig 1, Supplementary Fig. 3

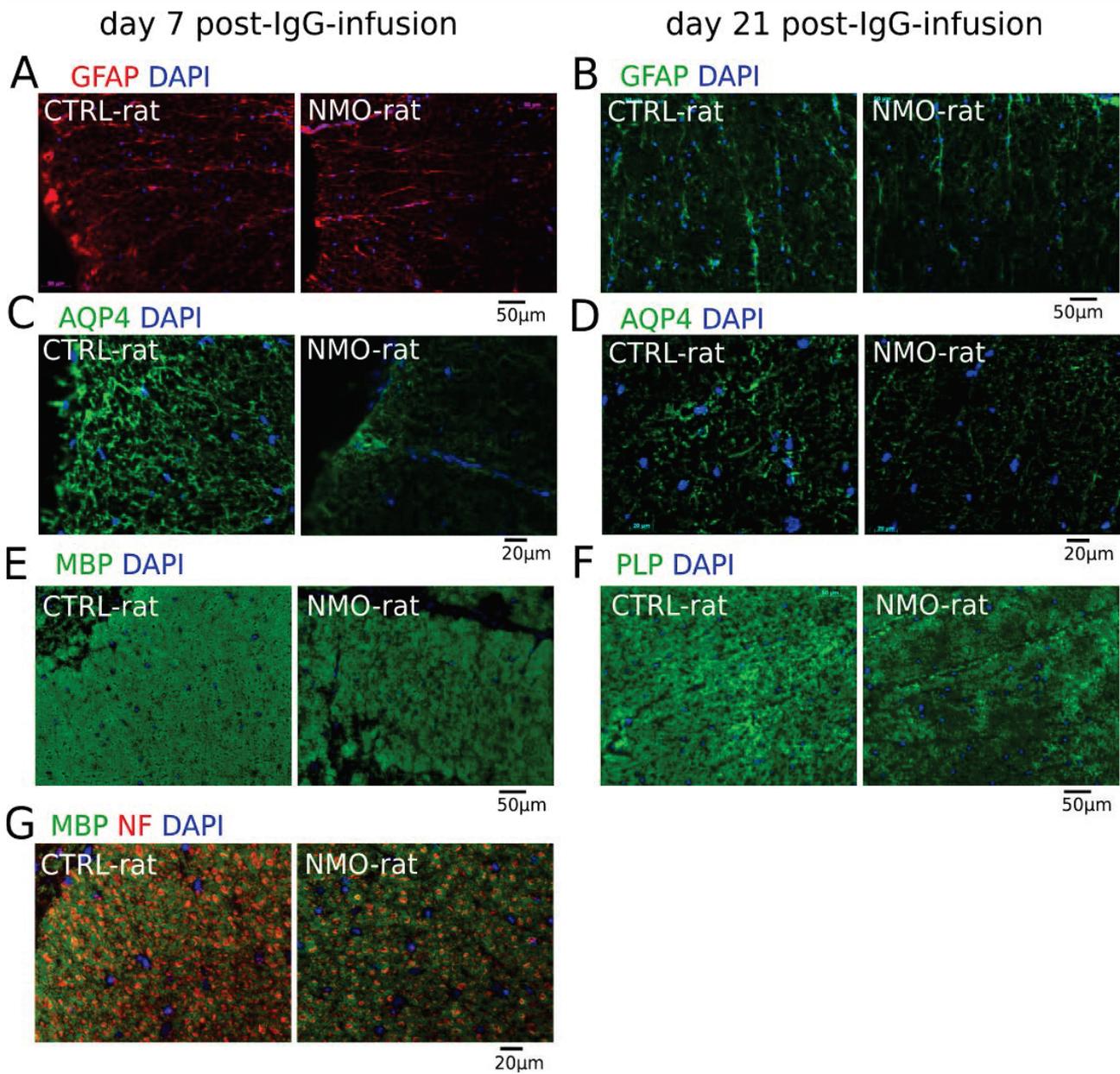
Table 1: Primary antibodies for immunodetection: references of antibodies used for immunodetection and their working dilutions for immunocytochemistry (ICC), immunohistochemistry (IHC) and western blot (WB) assays.



Supplementary Figure 1: Validation of myelinated culture model at day-in-vitro 28. A: Confocal image of co-immunolabeling of phosphorylated neurofilament (pNF, in red), myelin basic protein (MBP, in green) and Neurofascin (Nfasc, in pink) to identify nodes of Ranvier. B: Electron microscopy image of myelin showing compaction of myelin sheath around axons. C: Co-immunolabeling of pNF and MBP showing a myelinating oligodendrocyte labelled with MBP (higher magnification: arrow) and myelinated axons. D: Co-immunolabeling of microtubule associated protein 2 (MAP2, in red) and Bassoon, a protein of the active zone, showing the presence of active synapse in the culture. E: Co-immunolabeling of astrocytic glial fibrillary acidic protein (GFAP, in green) and microglial/macrophage marker ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1, in red) showing the presence of numerous astrocytes and few microglial cells. F: Co-immunolabeling of GFAP (in red) and 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase, in green) showing the presence of mature oligodendrocytes in the culture. G: Co-immunolabeling of neural/glial antigen 2 (NG2, in green) and pNF (in red) showing the presence of oligodendrocyte precursor cells in the culture near neurons. H: Co-immunolabeling of astrocytic Cx43 and oligodendrocytic Cx47 in myelinated culture showing the presence of Cx43-Cx47 gap junctions (higher magnification: arrow). I: Co-immunolabeling of astrocytic Cx30 and oligodendrocytic Cx32 in myelinated culture showing low expression of Cx30 and the high expression of Cx32 in oligodendrocyte processes. J: Western blot analysis of astrocytic and oligodendrocytic connexins expression (Cx30, Cx32, Cx43 and Cx47), astrocytic proteins (GFAP and AQP4), oligodendrocytic and myelin proteins (CNPase, MOG, MBP) and neuronal proteins (pNF and MAP2).



Supplementary Figure 2: Validation of hemichannel activity in *in vitro* mixed glial cell cultures. A: Propidium iodide cell death assay followed by flow cytometry showing comparable percentage of dead cells in no treatment (NT), CTRL-IgG (CTRL) and NMO-IgG (NMO: NMO1 patient's IgG) treated glial cell cultures after 24 h treatment. B: Measure of extracellular glutamate showing an increase in glutamate release in glial cell cultures treated with NMO-IgG (NMO: summative data from 4 patients' IgG) after 10 min compared to CTRL-IgG (CTRL). Glutamate level is strongly decreased by Carbenoxolone (CBX-50 μ M), a connexin inhibitor, in both NMO and CTRL conditions.



Supplementary Figure 3: Neuromyelitis Optica lesion features in NMO-rat model in spinal cord white matter. A-B: Immunofluorescent labelling of astrocytic GFAP showing a decrease in the complexity of astrocytes in the NMO-rat compared to CTRL-rat at both 7 (A) and 21 (B) days post-IgG-infusion. **C-D:** Immunofluorescent labelling of astrocytic AQP4 showing a decrease in the NMO-rat compared to CTRL-rat at both 7 (C) and 21 (D) days post-IgG-infusion. **E-F:** Immunofluorescent labelling of myelin using MBP (E) and proteolipid protein (PLP, F) showing a decrease in the NMO-rat compared to CTRL-rat at both 7 (E) and 21 (F) days post-IgG-infusion. **G:** Co-immunolabeling of MBP and neurofilament (NF) showing a decrease in myelinated axons in the NMO-rat.

III. Altération de la transmission synaptique glutamatergique induite par les autoanticorps de patients NMO : un rôle pour les connexines ?

Contexte de l'étude

L'astrocyte exerce un rôle crucial dans la régulation des fonctions synaptiques. En effet, il fait partie de l'unité neuro-glio-vasculaire et régule l'apport énergétique aux neurones en fonction de leur activité (Leybaert, 2005; Giaume et al., 2010). Les astrocytes sont également clés dans la synapse tripartite où ils régulent la force de la transmission synaptique et participent aux mécanismes de plasticité synaptique en contrôlant la présence de neurotransmetteurs et en libérant des gliotransmetteurs, des facteurs de croissance ou des cytokines (Halassa et al., 2007a; Perea et al., 2009; Pannasch et al., 2011). De plus, le blocage de la gliotransmission, impliquant les hémicanaux de connexines de l'astrocyte, a un impact négatif sur les processus cognitifs comme la mémoire et l'apprentissage (Stehberg et al., 2012; Walrave et al., 2016). Les hémicanaux astrocytaires sont essentiellement composés de Cx43 et leur inhibition spécifique, par des peptides inhibiteurs, modifie la transmission synaptique basale, notamment par des mécanismes impliquant l'ATP (Chever et al., 2014; Abudara et al., 2018). Ainsi une altération des fonctions astrocytaires, et des activités dépendantes des connexines, pourrait fortement impacter la transmission synaptique. Récemment, des troubles cognitifs ont été identifiés chez les patients atteints de Neuromyélie Optique et touchent principalement : les capacités attentionnelles, la mémoire de travail, la vitesse de traitement des informations visuelles (spatiales) et auditives, l'apprentissage verbal et la fluidité verbale et enfin les fonctions exécutives. L'ensemble de ces atteintes a des répercussions négatives sur la qualité de vie des patients (Meng et al., 2017). Mais, à ce jour, les mécanismes sous-jacents restent méconnus. Un rôle de l'AQP4, cible des autoanticorps de patients NMO, a été révélé dans les mécanismes de consolidation de la mémoire et de plasticité synaptique (Fan et al., 2013; Scharfman and Binder, 2013). L'altération des connexines, au-delà de l'implication démontrée dans la démyélinisation, pourrait également participer dans une perturbation de la transmission synaptique. Nous avons donc émis l'hypothèse que, l'IgG-NMO, en ciblant l'AQP4 astrocytaire et en induisant une dysfonction astrocytaire, pourrait être à l'origine d'altérations de la transmission synaptique. Comme les astrocytes dysfonctionnels présentent une diminution de la recapture du glutamate, nous avons émis l'hypothèse que l'accumulation de glutamate augmenterait ou serait délétère pour la transmission synaptique glutamatergique. Cette

étude avait donc pour objectif d'étudier l'effet aigu des IgG-NMO sur la transmission glutamatergique basale au sein de l'hippocampe.

Choix méthodologique : Nous avons choisi comme modèle expérimental une synapse de l'hippocampe, la synapse des collatérales de Schaffer (axone des cellules pyramidales de CA3) sur les cellules pyramidales de CA1 (synapse CS-CA1). Cette synapse est particulièrement intéressante car elle représente une voie monosynaptique plus facile à étudier que les synapses des réseaux complexes du néocortex. L'organisation anatomique de la synapse CS-CA1, située dans le *stratum radiatum*, est bien connue de même que celle du réseau astrocytaire de voisinage. Cette organisation remarquable explique pourquoi de très nombreuses études sur la gliotransmission ont été effectuées sur ce modèle (Panatier et al., 2006; Araque et al., 2014; Murphy-Royal et al., 2015). Chez le rongeur, cette synapse joue un rôle clef dans des processus cognitifs comme le codage spatial et la mémoire spatiale à court et long-terme. De plus, la présence des IgG-NMO dans le LCR des patients leur donne un accès privilégié à cette structure proche des ventricules latéraux et du 3^{ème} ventricule.

Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un appel d'offre interne, lancé en 2016, au sein du Centre de Recherche en Neurosciences en collaboration avec l'équipe Forgetting. Elle a donc bénéficié de la synergie entre l'expertise en électrophysiologie, portée par Paul Salin, et de notre expertise sur la NMO, afin d'étudier l'impact des IgG-NMO dans les altérations neuronales et plus précisément synaptiques. Les résultats de cette étude n'ont pas été publiés et les expérimentations sont en cours dans le laboratoire.

Matériel et méthodes

Echantillons de patients et purification d'IgG

Les plasmaphérèses de trois patients de la cohorte française NOMADMUS, diagnostiqués avec le spectre NMOSD (Wingerchuk et al., 2015) ont été sélectionnées depuis la biobanque NeuroBioTec et ont été testées positives pour la présence d'anticorps anti-AQP4 et négatifs pour la présence d'anticorps anti-MOG par « *cell-based assay* ». Le sérum d'un donneur sain, provenant de l'établissement français du sang, testé négatif pour les anticorps anti-AQP4 et anti-MOG, a été sélectionné. Les échantillons ont d'abord été concentrés par centrifugation différentielle et ont été incubés en présence de billes de protéine A sépharose « 4 fast flow » (P924 Sigma-Aldrich) avant d'être déposés dans une colonne. Les IgG ont été éluées avec un tampon glycine à 0,1M (pH 2,8) et le pH a été neutralisé avec un tampon Tris 1,5M (pH 8,8). Les fractions positives pour la présence de protéines ont été sélectionnées grâce à un dosage

colorimétrique « *Biorad protein assay* » (500-0006 Biorad) puis regroupées. Le milieu a été échangé contre du liquide céphalorachidien artificiel ou solution Ringer (composition en mM : 124 NaCl, 26 NaHCO₃, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2.5 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 10 glucose ; 300 mOsm) par dialyse sur la nuit à 4°C sous agitation. Puis les IgG dialysées ont été aliquotées et conservées à -20°C. La concentration en IgG a été évaluée grâce au kit BCA (Pierce). Les IgG issues du sérum d'un donneur sain ont été nommés IgG-CTRL. Les IgG issues de sera de trois patients NMO ont été regroupées dans un pool et ont été nommées IgG-NMO.

Protocole d'électrophysiologie

Animaux : Cette étude a utilisé 12 rats Sprague Dawley mâles âgés de 6 à 8 semaines provenant de Janvier Labs (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France).

Prélèvement cerveau et tranches : Une anesthésie profonde est provoquée par l'injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (150mg/kg), suite à laquelle les animaux sont décapités. Une large ouverture crânienne est pratiquée et le cerveau est prélevé. Le cerveau isolé est immédiatement placé dans une solution refroidie à 4°C reproduisant les concentrations en espèces ioniques proches de celles du LCR. Cette solution Ringer modifiée présente la composition suivante (en mM : 124 NaCl, 26 NaHCO₃, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2.5 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 10 glucose ; 300 mOsm). Cette solution est oxygénée par bullage d'un mélange gazeux O₂-CO₂ (95:5) qui permet également d'ajuster le pH de la solution à 7.3 grâce au pouvoir tampon des ions carbonates. Dans la solution Ringer refroidie, la partie rostrale du cerveau, contenant les bulbes olfactifs et l'extrémité rostrale des lobes frontaux, est enlevée puis les 2 hémisphères sont séparés au moyen d'une lame de rasoir. Les 2 hémisphères sont délicatement posés sur un bloc d'agar (4%) puis leur partie rostrale est collée avec le bloc d'agar à la plateforme mobile d'un vibratome (Leica VT1000S) au moyen de colle cyanoacrylate. Les 2 hémisphères sont alors sectionnés en tranches coronales d'une épaisseur de 300-400µm. Dans la plus grande partie (rostrale) de l'hippocampe, l'organisation topographique des réseaux de connexions est dans un plan parallèle au plan coronal du cerveau. Ainsi, le plan de section préserve les principales projections excitatrices de l'hippocampe : les fibres mossues (des cellules granulaires du gyrus denté vers les cellules pyramidales de CA3), et les collatérales de Schaffer (des cellules pyramidales de CA3 vers les dendrites apicales des cellules pyramidales de CA1). Les tranches sont ensuite prélevées de la cuve du vibratome et transférées dans une chambre à interface contenant la solution Ringer oxygénée. L'enregistrement peut commencer après une heure de réchauffement progressif des tranches jusqu'à température ambiante. Pendant

Résultats

l'expérience, une tranche est placée dans une chambre d'enregistrement de petit volume alimentée en continu par perfusion (~2ml/min) de la même solution Ringer oxygénée à 33°C. La tranche de cerveau est stabilisée au fond de la chambre par un petit dispositif en forme de lyre constitué à partir de fils de platine.

Enregistrement des potentiels de champ locaux : L'enregistrement des potentiels de champs locaux (LFP, pour "*local field potentials*") est effectué au moyen de pipettes de verre borosilicate (diamètre externe 1.5 mm, diamètre interne 0.86 mm, Clark Instruments, Royaume-Uni), étirée au moyen d'une étireuse horizontale (P-97, Sutter Instruments, Etats-Unis). Ces électrodes remplies de la solution Ringer précédemment décrite ont une résistance de ~1-3MW. Cette électrode d'enregistrement est placée dans le stratum radiatum de CA1. La réponse extracellulaire ainsi obtenue est située au niveau d'un "puits" de potentiel ("*sink*") correspondant à l'activation de toute une population de synapses excitatrices sur de nombreuses cellules pyramidales. La totalité des expériences a été effectuée en présence de l'antagoniste des récepteurs GABAergiques de type A, picrotoxine (100µM dans la solution Ringer). Pour éviter la propagation d'une activité de type épileptiforme de la région CA3 à la région CA1, lorsque l'inhibition synaptique est bloquée, CA3 et CA1 sont séparées mécaniquement au moyen d'un micro-couteau et sous le contrôle du microscope.

Analyses de signaux et statistiques

Lors de l'enregistrement (en LFP et courant imposé) des potentiels post-synaptiques excitateurs (EPSP), la réponse synaptique est quantifiée par la mesure de la pente initiale de la réponse ou de l'amplitude de la réponse. Le rapport de « *paired-pulse facilitation* » (PPF ratio) est donné par le rapport de la seconde réponse sur la première, lorsque deux stimulations sont appliquées à 50ms d'intervalle.

Les enregistrements ont été réalisés et analysés avec le logiciel libre de droits Elphy (développé par Gerard Sadoc, institut des neurosciences Paris-Saclay, France). Le placement de curseurs sur les enregistrements électrophysiologiques a permis de déterminer le niveau de la ligne de base (« *baseline* ») ainsi que l'amplitude et la pente des réponses post synaptiques (« *excitatory post-synaptic potentials* » - EPSP) aussi appelés EPSP *amplitude* et EPSP *slope*. Cela a également permis de calculer le ratio des pentes ou des amplitudes des EPSP des deux réponses (deux « *pulse* » : P2/P1) appelé PPF pour « *paired pulse facilitation* ».

Les représentations graphiques ainsi que les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism 5.0. Les données représentent l'amplitude ou la pente des EPSP ainsi que le ratio de PPF au cours du

temps. La comparaison des moyennes des EPSP, exprimés en pourcentage de la valeur de la ligne de base, dans deux conditions (NMO-IgG vs CTRL-IgG) a été opérée avec un test non paramétrique de Mann et Whitney. Le risque alpha a été fixé à 5% et les différences ont été considérées significatives pour une p-value inférieure à 0,05. Les données graphiques représentent soit des valeurs discrètes soit la moyenne +/- l'erreur standard à la moyenne (SEM).

Résultats préliminaires

i) Les IgG-NMO induisent une forte diminution de la transmission glutamatergique basale dans l'hippocampe

Nous avons dans un premier temps voulu déterminer l'effet d'IgG-NMO sur la transmission synaptique glutamatergique basale en aigu. Notre protocole consistait en deux impulsions électriques pairées des collatérales de Schaffer, séparées de 50ms (PPF). Après avoir obtenu une réponse synaptique stable pendant au moins 10 min, les IgG-NMO ou IgG-CTRL (diluées dans du LCR artificiel d'enregistrement à une concentration de 0,345mg/ml) sont infusées pendant 20 min dans le LCR qui entoure la tranche. L'application d'IgG-NMO, après un délai de 20 min, induit une diminution prolongée de 59 % de l'amplitude des EPSP. (**Figure 25B**). En revanche, l'application d'IgG-CTRL produit un effet variable avec parfois une augmentation transitoire de la réponse (**Figure 25A**). Le décours temporel de l'amplitude de l'EPSP montre une forte diminution induite par IgG-NMO et non par IgG-CTRL (**Figure 25C et D**). Cet effet inhibiteur sur la transmission synaptique est observé au cours de 8 expériences indépendantes (IgG-CTRL ; n=4 et IgG-NMO ; n=8). La comparaison des effets des IgG-NMO et des IgG-CTRL montre une forte diminution de la réponse en présence d'IgG-NMO (**Figure 25F** : -51,9% ; p=0,004). Cette diminution de la réponse en présence d'IgG-NMO ne revient pas à sa valeur initiale après la fin de l'infusion de l'IgG (**Figure 25E**).

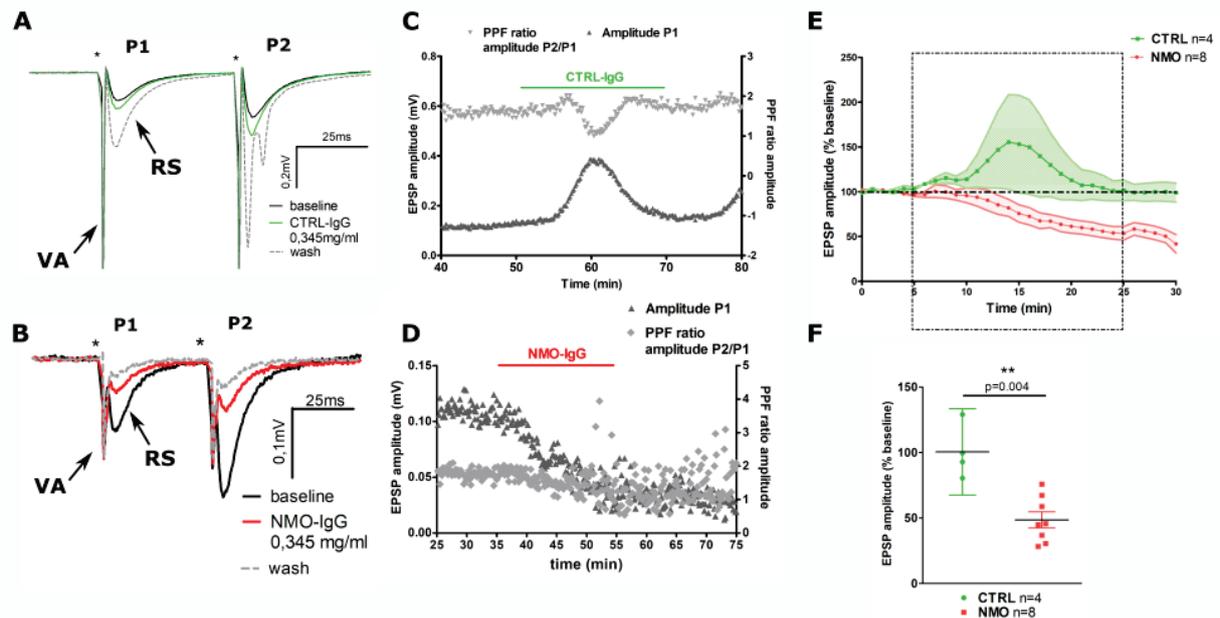


Figure 25 : La transmission glutamatergique basale est fortement réduite par les IgG-NMO et pas les IgG-CTRL. A-B) Exemples de réponses post-synaptiques observées avec un protocole d'impulsions paarées espacées de 50 ms avec stimulation des collatérales de Schaffer et enregistrement du potentiel de champs local dans la région CA1 de l'hippocampe. Deux conditions ont été utilisées : l'infusion de la tranche avec des IgG-CTRL (A) ou avec des IgG-NMO (B) durant 20 min à une concentration de 0,345 mg/ml. Une légère augmentation ou une forte diminution de l'amplitude de la réponse est observée sur les deux impulsions en condition IgG-CTRL ou IgG-NMO respectivement. * = artéfact de la stimulation électrique **C-D)** Exemple de décours temporel de l'amplitude du potentiel post synaptique excitateur (EPSP) en mV et du ratio de l'amplitude stimulation paarée (PPF : amplitude 2/ amplitude1). L'amplitude de l'EPSP est transitoirement augmentée par les IgG-CTRL, le ratio PPF suit la même dynamique (C). L'amplitude de l'EPSP est diminuée par les IgG-NMO et le PPF est légèrement augmenté (D). **E)** Moyenne des décours temporels de l'amplitude de l'EPSP exprimé en pourcentage de la réponse synaptique avant l'application de l'IgG. Le rectangle pointillé représente le temps d'infusion avec des IgG (CTRL ou NMO). L'amplitude de l'EPSP est transitoirement augmentée en condition infusé avec IgG-CTRL (n=4, vert, aire vert pâle = SEM) et revient à son niveau basal en fin d'infusion. Cependant l'amplitude de l'EPSP est fortement diminuée en présence d'IgG-NMO (n=8, rouge, aire rouge pâle = SEM) à partir de 8 min d'infusion et perdure après la période d'infusion. **F)** L'amplitude de l'EPSP, exprimée comme le pourcentage de la ligne de base de l'amplitude en fin d'infusion, est fortement diminuée par les IgG-NMO (n=8 ; 48,6%) en comparaison aux IgG-CTRL (n=4 ; 100,5%). « Scatter dot plot » représentant la moyenne +/- SEM ** p=0.004, test non paramétrique Mann Whitney. VA= volée afférente (potentiels d'action des collatérales de Schaffer), RS= réponse synaptique, P1= « pulse1 », P2= « pulse 2 ».

Ne disposant que d'une faible quantité d'IgG purifiées, dans la 1^{ère} série d'expérience, nous avons recyclé la solution perfusant la tranche. Nous nous sommes demandé si ce recyclage ne contribue pas à l'effet délétère d'IgG-NMO sur la synapse CS-CA1. Des facteurs sécrétés par la tranche pourraient contribuer aux atteintes synaptiques. Nous avons donc étudié l'effet d'IgG-NMO sans recyclage mais à une concentration moins importante d'IgG. Ainsi, nous avons dilués les IgG-NMO et IgG-CTRL à une concentration de 0,07mg/ml dans le LCR artificiel d'enregistrement. Tout comme dans la première partie, les IgG-NMO induisent une diminution de l'amplitude et de la pente des EPSP alors que les IgG-CTRL ont l'effet inverse (**Figure 26A et B**). Le suivi au cours du temps de l'effet des IgG confirme ces effets (**Figure 2 E** : IgG-CTRL n=5 ; IgG-NMO n=4). Cependant l'effet inhibiteur des IgG-NMO est transitoire et la réponse synaptique retrouve son amplitude initiale après lavage (**Figure 26B** : « wash » même profil que la « baseline »; **Figure 26E** : augmentation de la pente des EPSP après la fin d'infusion). La comparaison des effets des IgG-NMO et IgG-CTRL, exprimés en pourcentage de la ligne de base, montre une forte diminution de la pente de l'EPSP par IgG-NMO (**Figure 26F** : -42% ; p=0,032). Ainsi l'effet inhibiteur des IgG NMO n'est pas induit par le recyclage de la solution. Une faible concentration de cet IgG induit une dépression synaptique qui est restaurée au lavage de l'IgG.

ii) L'effet des IgG-NMO est bloqué en présence de bloqueurs de connexines

Nous nous sommes demandé ensuite si une atteinte astrocytaire pourrait expliquer cette dépression synaptique. Comme notre hypothèse était qu'un effet des IgG-NMO impliquerait une dysfonction des connexines astrocytaires, nous avons voulu tester l'effet de la carbenoxolone (CBX), un inhibiteur de toutes les connexines, sur les effets des IgG-NMO. L'infusion de CBX (50µM) diminue l'amplitude de l'EPSP (**Figure 26C** -45% par rapport à la ligne de base). En revanche l'infusion d'IgG-NMO après l'application de CBX (n=2) pendant 10 min n'a pas d'effet sur la pente de l'EPSP (**Figure 26D-F** : -1,7% comparé à IgG-CTRL et +40% comparé à IgG-NMO). Ce résultat suggère donc que le CBX bloque l'effet délétère des IgG-NMO sur la transmission synaptique.

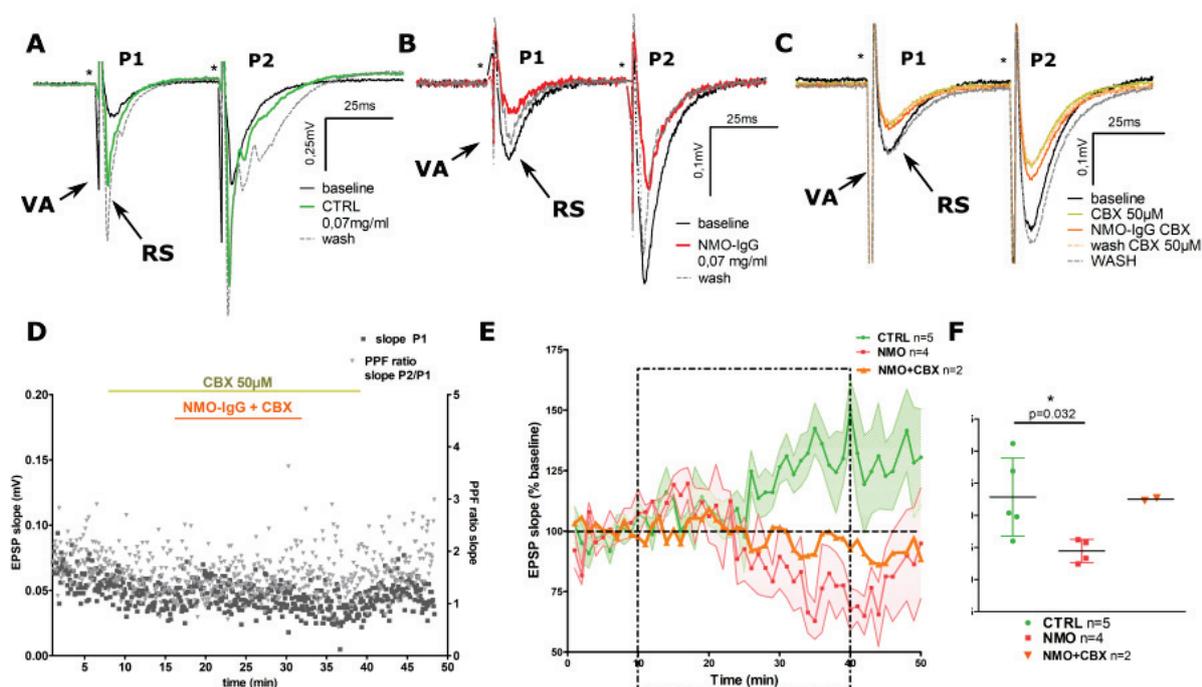


Figure 26 : La transmission glutamatergique basale n'est pas modifiée par IgG-NMO en présence d'un bloqueur de connexine. A-C) Exemples de réponses post-synaptiques observées avec un protocole d'impulsions pairées espacées de 50 ms avec stimulation des collatérales de Schaffer et enregistrement du potentiel de champs local dans la région CA1 de l'hippocampe. Trois conditions ont été utilisées : l'infusion de la tranche avec des IgG-CTRL (A) ou avec des IgG-NMO (B) durant 30 min à une concentration de 0,07 mg/ml ou l'infusion avec de la carbenoxolone (CBX) à 50 μ M avec ou sans IgG-NMO à 0,07mg/ml (C). * : artéfact de stimulation. D) Exemple de décours temporel de la pente du potentiel post synaptique excitateur (EPSP) en mV et du ratio de l'amplitude stimulation pairée (PPF : amplitude 2/ amplitude1) : la CBX diminue la pente de l'EPSP mais les IgG-NMO, en présence de CBX, ne diminuent pas l'amplitude de la réponse, l'amplitude basale est rétablie sans CBX. E) Moyenne des décours temporels de la pente de l'EPSP exprimé en pourcentage de la ligne de base (*baseline*). Le rectangle pointillé représente le temps d'infusion avec des IgG-CTRL, des IgG-NMO ou des IgG-NMO et de la CBX. L'amplitude de l'EPSP est augmentée en condition infusée avec IgG-CTRL (n=5, vert, aire vert pâle = SEM), mais est fortement diminuée en présence d'IgG-NMO (n=4, rouge, aire rouge pâle = SEM) et n'est pas modifiée en présence d'IgG-NMO coinfusés avec de la CBX (n=2, orange). F) Pente de l'EPSP, exprimée comme le pourcentage de la ligne de base de la pente en fin d'infusion, est fortement diminuée par les IgG-NMO (n=4 ; 72,23%) en comparaison aux IgG-CTRL (n=5 ; 114,2%) mais ne semble pas être modifiée en condition IgG-NMO +CBX (n=2 ; 112,5%). « Scatter dot plot » représentant la moyenne +/- SEM ** p=0.032, test non paramétrique Mann Whitney. VA= volée afférente, RS= réponse synaptique, P1= « pulse1 », P2= « pulse 2 ».

Discussion

Cette étude a démontré un effet des autoanticorps de patients NMO (IgG-NMO) sur la transmission synaptique glutamatergique : la présence d'IgG-MNO diminuant fortement l'amplitude et la pente du potentiel post-synaptique. Cet effet est spécifique car il n'est pas retrouvé en présence d'IgG d'un donneur sain. Le blocage des connexines, par la carbenoxolone, prévient cette diminution de réponse induite par IgG-NMO suggérant leur implication dans ce phénomène.

Ces résultats semblent indiquer que l'effet des IgG-NMO est délétère sur la transmission synaptique. Or, nos précédentes études ont démontré que les IgG-NMO étaient responsables d'une altération de l'expression des transporteurs au glutamate associée à une diminution de la recapture du glutamate et son accumulation dans le milieu extracellulaire (Marignier et al., 2010, 2016). Ces observations ont été réalisées après sept jours d'infusion *in vivo* dans le rat-NMO ou après 18h *in vitro* dans des cultures gliales. De plus, la perte d'expression des transporteurs au glutamate était observée dès 1 h de contact avec IgG—NMO en culture astrocytaire. Or les temps d'infusion d'IgG-NMO dans notre étude électrophysiologique ont été de l'ordre de 20 à 30 min. Notre étude démontre ainsi un effet aigu des IgG-NMO dont les mécanismes ne sont pas encore élucidés, nous pouvons néanmoins proposer les mécanismes suivants (**Figure27**) :

1) Il pourrait donc y avoir une **modification de la libération de neurotransmetteurs par les collatérales de Schaffer**. Les variations de la PPF (« *paired-pulse facilitation* ») sont assez modérées et très variables avec une légère augmentation en présence d'IgG-NMO. La PPF est un paramètre important pour étudier la transmission synaptique. Une augmentation de la PPF, lorsque l'on observe une diminution de la réponse synaptique, suggère que le mécanisme à l'origine de cette diminution est présynaptique. L'augmentation de la PPF résulte d'une augmentation du taux d'échec de la transmission pour la réponse à la 1^{ère} stimulation, autrement dit, d'une diminution de la probabilité de libération du neurotransmetteur. Cet effet pourrait être provoqué par la présence d'adénosine pérисynaptique, issue de la dégradation de l'ATP par l'ecto-nucléotidase, activant les récepteurs A1 présynaptiques (situés sur les collatérales de Schaffer) et réduisant la libération de glutamate (Pascual, 2005; Panatier et al., 2011). Cependant la baisse de réponse induite par IgG-NMO est très importante par rapport aux variations de PPF. Cette modulation réduite de la PPF suggère que d'autres mécanismes sont probablement impliqués à côté des effets présynaptiques. L'utilisation d'antagonistes des récepteurs A1 permettra de déterminer leur importance dans la dépression synaptique induite par les IgG-NMO. De plus, la stabilité de l'amplitude des volées

afférentes suggère que la propagation des potentiels d'action le long des collatérales de Schaffer n'est pas affectée.

2) **Une augmentation de glutamate extracellulaire** due à une diminution de sa recapture et/ou sa libération par les astrocytes pourrait aussi participer à la diminution de réponse synaptique observée. En effet le glutamate peut **activer des récepteurs métabotropiques au glutamate du groupe I** (mGluRI), présents sur le neurone postsynaptique (CA1) en extrasynaptique. Ces récepteurs sont en effet plus accessibles pour les gliotransmetteurs que les récepteurs synaptiques du fait de la distance à parcourir depuis le pied astrocytaire jusqu'à la fente synaptique. De plus ces récepteurs sont très sensibles et ont une désactivation/désensibilisation plus lente que les récepteurs synaptiques (Araque et al., 2014). Cela en fait une cible privilégiée pour les gliotransmetteurs se fixant aux récepteurs du groupe mGluRI, dont le principal est mGluR5, pouvant provoquer une dépression à long terme (LTD). En effet, la présence d'ARNm à proximité de la synapse (dans l'épine dendritique par exemple) permet une synthèse locale de protéine qui peut être modifiée en contexte pathologique, comme dans le syndrome du X fragile. L'activation de mGluR5 réduit la synthèse protéique locale et diminue le nombre de récepteurs AMPA et NMDA postsynaptiques (Huber, 2000; Bear et al., 2004). Ce mécanisme étant rapide, il pourrait être impliqué dans la dépression synaptique induite par IgG-NMO. Nous testerons cette hypothèse par l'utilisation d'antagonistes spécifiques des récepteurs mGluRI. Ce mécanisme est particulièrement intéressant car son implication a été démontrée dans les troubles cognitifs de l'autisme, des maladies d'Alzheimer, de Parkinson et de l'addiction à la drogue (Lüscher and Huber, 2010).

3) **Induction d'une LTD NMDA-dépendante** : Notre protocole, utilisant les enregistrements en potentiels de champ et du Mg extracellulaire ne permettait pas d'étudier directement l'implication des récepteurs NMDA qui est activé par la dépolarisation du neurone postsynaptique. Cependant ce récepteur peut contribuer à la dépression synaptique que nous avons observée. En effet une LTD peut également être induite par activation des récepteurs NMDA et ces deux formes de LTD, mGluRI et NMDA dépendantes, peuvent coexister au sein de la région CA1 de l'hippocampe (Oliet et al., 1997; Bear et al., 2004). Cependant leurs mécanismes sont très différents et la différence majeure réside dans le fait que la LTD NMDA-indépendante nécessite une synthèse protéique et n'est pas bidirectionnelle. Bien que l'hypothèse de l'induction d'une LTD NMDA-dépendante par IgG-NMO soit moins plausible, nous testerons également son implication par inhibition pharmacologique.

Par ailleurs, les IgG-NMO utilisés ont été purifiés du sérum de trois patients sélectionnés pour leur capacité à induire une forte diminution de l'expression d'AQP4 en culture gliale. L'utilisation d'anticorps issus de patients séronégatifs pour les anti-AQP4 ainsi que la déplétion des IgG-NMO en anticorps anti-AQP4 permettrait de déterminer le rôle des anti-AQP4 dans l'altération de la transmission synaptique. L'implication de l'AQP4 est suspectée car, chez des animaux AQP4^{-/-}, les mécanismes de potentialisation à long terme sont altérés sans modification de la transmission glutamatergique basale (Skucas et al., 2011; Fan et al., 2013). Ainsi une diminution de l'expression d'AQP4 ou une altération de sa fonction induite par IgG-NMO pourrait également avoir des effets sur la potentialisation à long terme et pourrait être impliquée dans l'effet chronique des IgG-NMO.

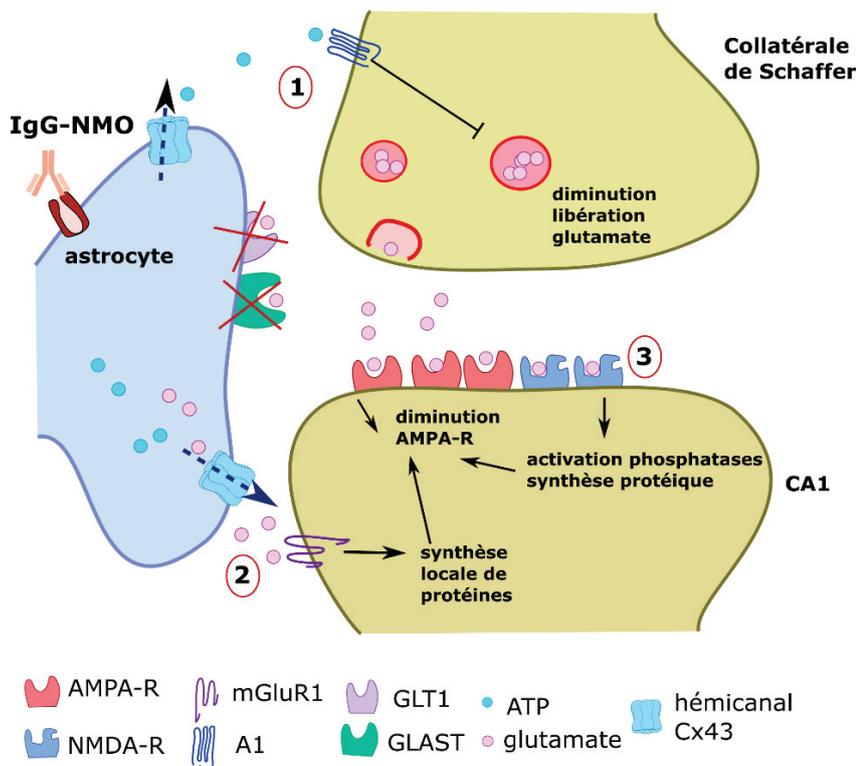


Figure 27 : Mécanismes hypothétiques d'altération de la transmission glutamatergique par IgG-NMO. 1) la libération d'ATP, convertie en adénosine, active les récepteurs A1 pérисynaptiques des collatérales de Schaffer et diminue la probabilité de libération de glutamate conduisant à une diminution des réponses synaptiques. L'accumulation ou la libération de glutamate par l'astrocyte peut conduire soit à l'activation de récepteurs mGluR1 et à la synthèse locale de protéines (2) ou à l'activation des récepteurs NMDA et une faible dépolarisation, activant des phosphatases et induisant une synthèse protéique (3). Ces deux mécanismes réduisent la quantité de récepteurs AMPA conduisant à une dépression à long terme de la transmission synaptique (LTD).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail de thèse, nous avons mis au point des méthodologies adaptées pour l'étude de l'effet des IgG-NMO sur le phénotype astrocytaire, la démyélinisation et pour l'exploration des fonctions des connexines. Nous avons ainsi pu démontrer une importante altération du phénotype astrocytaire induite par IgG-NMO caractérisée par une altération de protéines fonctionnelles : la perte d'expression d'AQP4, de transporteurs au glutamate et du canal potassique Kir4.1, mais aussi l'altération fonctionnelle des connexines avec une diminution de l'activité *jonction communicante* et une augmentation de l'activité *hémicanal*. Ces astrocytes dysfonctionnels sont aussi caractérisés par l'expression et la sécrétion de cytokines et chimiokines proinflammatoires. Enfin ce travail a permis de démontrer l'effet démyélinisant des IgG-NMO, ainsi que du milieu conditionné d'astrocytes traités par IgG-NMO, sur un modèle de culture myélinisante. Cet effet a pu être inversé par l'addition de TGF- β 1, une cytokine anti-inflammatoire, ou par le co-traitement avec un inhibiteur des hémicanaux de Cx43, le peptide Gap19. Cependant un certain nombre de questions clés à l'origine de ces mécanismes, restent à élucider (**Figure 28**).

Quels sont les mécanismes d'induction de l'« astrocyte NMO » par les autoanticorps de patients ?

Quels sont les mécanismes d'induction du phénotype astrocytaire spécifique induit par IgG-NMO ?

Une alternative à l'activation du complément, l'endocytose de la cible AQP4 : Une fois dans le parenchyme, les IgG-NMO reconnaissent l'astrocyte en se fixant à l'AQP4. La reconnaissance de la cible peut avoir divers effets et notamment via l'activation du complément provoquant la mort astrocytaire (Saadoun et al., 2010). Cependant, par l'absence de complément, empêchant l'activation des mécanismes de mort cellulaire dépendantes du complément, dans nos modèles d'étude, nous nous intéressons essentiellement à une modulation de la cellule cible. L'effet des anticorps sur leur cible sont divers et peuvent aussi impliquer une endocytose de la cible (Diamond et al., 2009). Nous avons démontré que l'expression d'AQP4 est rapidement diminuée, dès 1 h de contact avec IgG-NMO, et n'est pas récupérée après 24h. La diminution de l'expression d'AQP4 varie d'un patient à l'autre mais aussi chez un même patient prélevé à différents stades de sa pathologie (en poussée, en rémission, avec/sans traitement etc.). Le titre d'anticorps, la spécificité et l'affinité pour la cible sont probablement des facteurs variables qui dépendent de chaque patient et qui peuvent moduler l'effet de celui-ci sur sa cible.

Co-endocytose d'autres protéines membranaires : La perte d'AQP4 est accompagnée de la perte des transporteurs au glutamate GLT1 et GLAST et du canal potassique Kir4.1. Or, ces protéines sont enrichies dans les prolongements astrocytaires distaux (Boulay et al., 2017). De plus, Kir4.1 et AQP4 sont coexprimées et associées à des complexes de dystrophine-glycoprotéine (Connors et al., 2004). Il est donc probable que la perte d'expression membranaire de ces molécules résulte d'une co-endocytose d'AQP4 et d'autres protéines membranaires exprimées au sein de complexes moléculaires à la membrane de l'astrocyte. Cette hypothèse a été confirmée pour le transporteur au glutamate GLT1 et sera discutée dans le chapitre « altération de la recapture du glutamate »

Modulation de l'expression d'autres molécules : Les IgG-NMO induisent également une augmentation de l'expression de GFAP, un marqueur de réactivité astrocytaire, par des mécanismes qui restent mal compris. La GFAP étant un filament intermédiaire de l'astrocyte, la modulation des interactions directes ou indirectes entre AQP4 et les éléments du cytosquelette, induite par IgG-NMO, pourrait ici jouer un rôle. Cette hypothèse n'a cependant pas été démontrée. De plus, l'expression de GFAP est modulée par la présence d'AQP4. En effet, chez des animaux KO pour l'AQP4 l'augmentation d'expression de GFAP induite par blessure contondante du tissu nerveux est diminuée (Ikeshima-Kataoka et al., 2015). L'effet d'IgG-NMO pourrait également passer par l'activation de voies intracellulaires et induire l'activation de l'expression de gènes incluant celui de la GFAP, modifiant la morphologie astrocytaire. De plus, la détection d'anticorps anti-GFAP a été identifiée chez des patients présentant aussi des anti-AQP4 (Yang et al., 2018). Ainsi la modulation de la fonction astrocytaire et de l'expression de GFAP pourrait aussi impliquer ces auto-anticorps chez certains patients. La détection de GFAP dans le LCR est un marqueur d'atteinte astrocytaire et est augmentée chez les patients NMO durant les poussées. La présence de GFAP peut également être détectée dans le sérum de patients atteints d'une névrite optique (Misu et al., 2009; Storoni et al., 2011). Ainsi l'astrocytopathie dans la NMO peut être associée à une altération de l'expression d'AQP4 et de GFAP.

Nous avons également démontré que les IgG-NMO étaient responsables d'une altération des connexines, plus particulièrement de la Cx43 astrocytaire, qui serait une nouvelle caractéristique de la dysfonction astrocytaire et que nous discuterons dans le prochain chapitre.

Enfin, toutes ces molécules membranaires astrocytaires (AQP4, transporteurs au glutamate, Kir4.1 et connexines) sont impliquées dans des fonctions de régulation de la composition du milieu extracellulaire. Ainsi, l'altération concomitante de leur expression par IgG-NMO pourrait être expliquée par un lien fonctionnel entre ces molécules.

Effet IgG-NMO et action sur les voies de signalisation intracellulaire: Un auto-anticorps est également susceptible de modifier le phénotype de la cellule cible via l'activation de voies intracellulaires, l'action comme un agoniste/antagoniste de la cible ou la coactivation de récepteurs aux cytokines (Diamond et al., 2009). Nos résultats démontrent une profonde altération du phénotype astrocytaire donnant naissance à un astrocyte dysfonctionnel, réactif et proinflammatoire, spécifique de la NMO avec diminution d'expression d'AQP4 et de GLAST et augmentation de GFAP, appelé « astrocyte NMO ». Ce phénotype est spécifique de la NMO car induit par les IgG issus de patients NMO et pas par les IgG-CTRL, issues de donneurs sains, ou les IgG-SEP, issus de patients atteints de sclérose en plaques. Parmi les altérations astrocytaires, nous avons mis en évidence la sécrétion d'un milieu inflammatoire avec la libération de cytokines et chimiokines proinflammatoire par les astrocytes NMO. Cette sécrétion pourrait résulter de l'activation de voies intracellulaires comme le facteur de transcription NFκB dont l'inactivation dans des modèles pathologiques proinflammatoires (tels que l'encéphalite autoimmune expérimentale ou EAE; blessure de la moelle épinière, du cerveau ou du nerf optique) diminue la sévérité de la maladie, l'inflammation, l'activation gliale associé à une diminution de la démyélinisation et des dommages aux neurones (Colombo and Farina, 2016).

IgG-NMO et action via les Fc-récepteurs : Enfin les IgG peuvent également activer, de manière non spécifique à la cible reconnue, des récepteurs Fc exprimés par les astrocytes ou les cellules microgliales. L'activation de ces récepteurs est impliquée dans des pathologies neuroinflammatoires et neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Cao et al., 2010; Fuller et al., 2014). Ainsi, par des mécanismes moins spécifiques, les IgG-NMO pourraient induire une activation astrocytaire et microgliale participant également à l'induction et au maintien du phénotype astrocytaire observé.

Activation microgliale : Bien qu'à notre connaissance, peu ou pas d'intérêt ait été porté aux cellules microgliales dans la NMO, il est probable qu'elles sont activées par les IgG-NMO et/ou en présence de facteurs libérés par les astrocytes et qu'elles contribuent aux mécanismes de physiopathogénèse de la NMO. L'activation microgliale qui pourrait être concomitante ou bien précéder l'activation astrocytaire dans la NMO. Les interactions entre microglies et astrocytes sont susceptibles de potentialiser la réactivité astrocytaire de la NMO. En effet, l'activation microgliale et la production de cytokines proinflammatoires induit un phénotype astrocytaire réactif (Liddelow et al., 2017) et potentialise les effets néfastes des astrocytes sur les neurones dans divers contextes pathologiques (Chen et al., 2015; Kirkley et al., 2017; Ahmad et al., 2019).

Comment l'IgG-NMO pénètre-il dans le SNC et atteint-il sa cible ?

La Neuromyéélite optique est une pathologie caractérisée par la présence d'autoanticorps pathogènes en périphérie, et retrouvés dans le LCR durant les attaques. Les mécanismes conduisant à l'entrée d'autoanticorps dans le SNC restent méconnus. Cependant, bien que ce travail de thèse n'ait pas eu pour objectif d'étudier les mécanismes conduisant à l'entrée d'anticorps dans le SNC, l'altération des fonctions astrocytaires et des connexines gliales mises en évidence dans cette étude pourraient participer à l'ouverture de cette barrière et faciliter l'entrée des auto-anticorps.

Effet IgG-NMO sur la BHE : Dans la plupart des pathologies neuroinflammatoires, une atteinte de la BHE permet l'entrée de cellules immunes dans le SNC. C'est le cas de la NMO où il a été démontré qu'une ouverture de barrière est corrélée à la sévérité de la pathologie et provoque l'entrée de cellules immunes comme les granulocytes (Vincent et al., 2008; Tomizawa et al., 2012) mais aussi le passage d'IgG qui sont souvent retrouvées autour des vaisseaux. Une fois dans le parenchyme cérébral, les IgG-NMO pourraient cibler l'astrocyte et modifier ses fonctions résultant en un cercle vicieux maintenant l'ouverture de barrière. Les astrocytes réactifs, induits par les IgG-NMO produisent des cytokines et chimiokines proinflammatoires comme le TNF- α ou l'IL-1 β dont l'effet sur la perméabilité de la BHE a été démontré (Deli et al., 1995; Didier et al., 2004). De plus, les astrocytes étant séparés des cellules endothéliales par la lame basale, ces deux types cellulaires ne peuvent pas former de jonctions communicantes. En revanche la présence d'hémicanaux de connexines aux pieds astrocytaires a été démontrée : ils participent aux interactions entre astrocyte et cellules endothéliales. La présence d'IL-1 β et de TNF- α augmente l'ouverture des hémicanaux qui libèrent de l'ATP, activant l'inflammasome dans la cellule endothéliale, qui produit, en retour, des cytokines proinflammatoires (De Bock et al., 2017). Ainsi la dysfonction astrocytaire, induite par les IgG-NMO, pourrait participer à l'entrée d'IgG et de cellules immunes en augmentant la perméabilité de la BHE (**Figure 28-1**).

Présence d'IgG-NMO dans le LCR : La détection de lésions dans le nerf optique, la moelle épinière et dans les régions périventriculaires chez le rat-NMO suggère un rôle des IgG-NMO présents dans le LCR (Marignier et al., 2016). Or, l'épendyme bordant les ventricules cérébraux est le seul autre type cellulaire du SNC avec une importante expression d'AQP4. Des résultats préliminaires, obtenus par Maxime Bigotte, étudiant en thèse au sein de notre équipe, ont démontré que les IgG-NMO sont capables de reconnaître l'AQP4 de l'épendyme et d'induire une modification de sa morphologie et de son phénotype. De plus, une étude a montré la perte d'AQP4 dans l'épendyme de patients NMO (Guo et al., 2017). Cela suggère que les IgG-NMO dans le LCR, en ciblant l'AQP4 de l'épendyme et en modifiant ses fonctions, pourraient

pénétrer plus facilement dans le parenchyme cérébral. L'abondance du LCR autour du le nerf optique et l'accessibilité de la cible dans la moelle épinière pourrait aussi expliquer pourquoi les lésions sont majoritairement observées dans ces régions chez les patients. En effet, les astrocytes présents dans la glie *limitans* expriment un taux élevé d'AQP4 ce qui donne une cible privilégiée pour les anticorps présents dans le LCR. De plus, une perte d'AQP4 à la glie limitans a été observée et est spécifique des patients NMO car elle n'est pas présente chez les patients SEP (Guo et al., 2017) (**Figure 28-1**).

Qu'est ce qui caractérise la dysfonction astrocytaire induite par IgG-NMO ?

Production de cytokines proinflammatoires

Nous avons démontré la présence d'une production de cytokines proinflammatoires telles que : IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , qui est plus particulièrement augmentée dans les astrocytes avec une perte expression d'AQP4 (*AQP4down*) induits par IgG-NMO. Nous avons également démontré la production de chémokines CCL20, CCL3 et CCL5 par les astrocytes NMO confirmant des données d'un autre groupe montrant l'augmentation de l'expression génique de ces chimiokines dans des astrocytes traités par des IgG purifiées ou du sérum de patients NMO (Howe et al., 2014). De plus celle-ci est spécifique car la déplétion en anti-AQP4 des IgG-NMO réduit la sécrétion de ces chimiokines. Cela suggère que les anticorps anti-AQP4 sont capables d'induire une signalisation intracellulaire à l'origine de la production de ces cytokines et chimiokines. Par ailleurs, IL-1 β induit la production de CCL2, CCL20, CXCL2 et CCL5 par l'astrocyte (Kim et al., 2004; Rothhammer and Quintana, 2015) ce qui pourrait potentialiser l'effet d'IgG-NMO.

Toutes ces chémokines ont des effets chémoattractants et facilitent l'infiltration de cellules immunes dans le parenchyme cérébral. Notamment CCL5 (aussi appelée RANTES pour « *regulated upon activation normal T cell expressed and secreted* »), a un effet chémoattractant et activateur sur les lymphocytes T et les monocytes. De plus la production de RANTES est stimulée par l'IL-1 β avec l'IFN- γ via l'activation de la voie MAPK (Kim et al., 2004). CCL20 (aussi appelée MIP-3 α pour « *macrophage inflammatory protein-3 α* »), quant à elle, est fortement produite en présence d'IL-1 β et de TNF- α et active la voie NF κ B et STAT3. Cette chimiokine est impliquée dans l'attraction des LT, LB et des cellules dendritiques immatures notamment dans des modèles d'EAE (Reboldi et al., 2009; Rothhammer and Quintana, 2015). Enfin la production de CCL3 (aussi appelée MIP-1 α pour « *macrophage inflammatory protein-1 α* »), est induite en présence de LPS (qui induit la production d'IL-1 β et TNF- α) et induit une activation microgliale et la production de ROS

(Zhu et al., 2016, p 3; Liddelow et al., 2017). Cela suggère que la production de ces cytokines et chimiokines, en plus d'être une caractéristique de la dysfonction astrocytaire, serait impliquée dans la physiopathogénèse de la NMO. Ces chimiokines ont également un effet d'attraction pour les granulocytes, qui est une infiltration caractéristique de la NMO.

L'altération de l'homéostasie hydrique et ionique

Parmi les altérations fonctionnelles de l' « astrocyte NMO », la perte d'AQP4 et de Kir4.1 pourrait fortement impacter les mouvements hydriques et le « K^+ spatial buffering ». En effet, l'excès de K^+ extracellulaire $[K^+]_e$ produit pendant l'activité neuronale est récupéré par l'astrocyte et redistribué dans le réseau astrocytaire pour être évacué dans la circulation sanguine. Ce processus dépend de la forte expression des canaux Kir4.1 au pied astrocytaire et est accompagné de mouvements d'eau via les canaux hydriques AQP4 (Hertz and Chen, 2016).

L'altération d'AQP4 a été retrouvée par un autre groupe ayant démontré que l'anticorps peut à la fois induire une endocytose d'AQP4, notamment en reconnaissant l'isoforme M1, mais peut aussi induire l'activation du complément en reconnaissant l'isoforme M23 ces deux mécanismes conduisant à une perte d'AQP4 accompagnée ou non d'une perte astrocytaire (Hinson et al., 2007, 2012). De plus, nous avons retrouvé cette perte d'AQP4 à la fois *in vitro* et *in vivo* dans notre modèle de rat-NMO où elle était accompagnée d'une démyélinisation. La présence d'anti-AQP4 et leur pathogénicité a conduit à proposer une nouvelle définition de la NMO comme une canalopathie autoimmune (Vincent, 2013; Hinson et al., 2016). De plus, la présence d'œdèmes vasogéniques, associés à une inflammation, a été identifiée dans des lésions cérébrales de patients présentant des anticorps anti-AQP4 (Matsushita et al., 2009). Par ailleurs, la présence d'une hydrocéphalie a été détectée chez certains patients NMO séropositifs (Clardy et al., 2014). Ces observations suggèrent une atteinte des flux hydriques par l'action des anticorps anti-AQP4 dans la NMO.

Nous avons démontré une perte de Kir4.1 induite par IgG-NMO, qui à notre connaissance n'avait pas encore été démontrée. La perte de Kir4.1 n'est cependant pas spécifique d'IgG-NMO car nous l'avons également observée en présence d'IgG-SEP. De plus, des études ont démontré la perte de Kir4.1 dans les oligodendrocytes autour de la plaque démyélinisées et dans les astrocytes périvasculaires ainsi qu'au sein des lésions actives chroniques de patients SEP (Schirmer et al., 2014). Enfin, des études ont démontré la présence d'anticorps anti-Kir4.1 dans les pathologies démyélinisantes comme la SEP ou la NMO. Notamment, la présence des anticorps anti-Kir4.1 a été évaluée chez des patients SEP et NMO et étaient

présents chez 12% et 16% respectivement (Zhong et al., 2016) alors qu'une autre étude démontre une fréquence plus élevée avec 26,1% de patients SEP et 22% de patients NMO présentant des anti-Kir4.1 contre 6% chez des donneurs sains (Brill et al., 2015). Cependant ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres études qui observent des taux inférieurs ou même l'absence de ces anti-Kir4.1 chez des patients SEP et NMO dont les proportions ne diffèrent pas des donneurs sains (Nerrant et al., 2014; Higuchi et al., 2016; Navas-Madroñal et al., 2017). Ainsi nous pouvons émettre l'hypothèse que la perte de Kir4.1 et d'AQP4 est une caractéristique de la dysfonction astrocytaire qui, dans notre cas, est induite par IgG-NMO (**Figure 28-2**).

L'altération de la recapture du glutamate

Une autre caractéristique de la dysfonction astrocytaire induite par IgG-NMO est la perte d'expression des transporteurs au glutamate GLAST et GLT-1. Notre travail a permis de confirmer les précédentes observations de l'équipe ainsi que celles d'un autre groupe démontrant une perte d'expression de GLT1 (EAAT2) et une diminution de la recapture du glutamate (Hinson et al., 2008, 2017; Marignier et al., 2010, 2016). Hinson et collaborateurs ont d'ailleurs démontré en 2017 que l'internalisation d'AQP4 et de GLT-1 faisait intervenir les Fc récepteurs astrocytaires ce qui suggère un nouveau mécanisme d'action des IgG-NMO (Hinson et al., 2017). Notre travail a également permis de montrer une altération de GLAST (EAAT1), autre transporteur au glutamate majoritaire. De plus, cette perte est spécifique des IgG-NMO car elle n'est pas retrouvée avec les IgG-SEP à l'inverse de la perte de GLT-1 retrouvée à la fois dans les astrocytes traités avec IgG-NMO ou IgG-SEP. Ainsi la perte d'expression des transporteurs au glutamate peut être à l'origine d'une augmentation de la concentration de glutamate et d'effets toxiques sur les oligodendrocytes et les neurones.

Ainsi nos données suggèrent collectivement qu'IgG-NMO induit une profonde modification du phénotype astrocytaire, via i) l'endocytose de sa cible AQP4 et d'autres protéines membranaires (GLT-1, GLAST et Kir4.1), ii) la modulation de l'expression d'autres molécules comme la GFAP et les connexines astrocytaires et probablement via iii) une signalisation intracellulaire impliquant des voies telles que MAPK et NFκB, conduisant à la production de cytokines et chimiokines proinflammatoires. Ces cytokines et chimiokines sont probablement impliquées dans l'infiltration de cellules immunes *in vivo*. De plus, l'effet du milieu conditionné d'astrocytes traités par IgG-NMO suggère que la dysfonction astrocytaire est à l'origine de la production d'un milieu toxique pour la myéline et les oligodendrocytes et que la présence de ces cytokines et chimiokines pourrait jouer un rôle. Cependant les mécanismes associant la dysfonction astrocytaire et la démyélinisation restent mal compris et vont être discutés dans les prochains paragraphes.

La NMO est-elle une « connexinopathie » ?

L'altération des connexines : une nouvelle caractéristique de l'« astrocyte NMO »

Nos résultats ont montré une altération dynamique de l'expression des connexines astrocytaires induite par IgG-NMO caractérisée par une perte rapide suivie d'une augmentation de l'expression, plus particulièrement de Cx43, associée à l'augmentation de la taille des plaques de jonction communicantes. De façon surprenante, nous avons observé une diminution de l'activité *jonction communicante* concomitante avec l'augmentation de la taille des plaques de jonction communicante. Ces observations pourraient être expliquées par une endocytose précoce de Cx43 induite par IgG-NMO suivie de modifications post-traductionnelles et/ou de la synthèse de nouvelles connexines dont la fonctionnalité est altérée.

En effet, l'activation de certaines kinases comme la PKC, induite par une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , peut induire la **phosphorylation** de la Cx43. Cette augmentation de Ca^{2+} intracellulaire peut être provoquée par l'activation de récepteurs couplés à des protéines G (comme les récepteurs purinergiques P2Y activés par l'ATP) ou par l'entrée de Ca^{2+} par des canaux. L'activation de la PKC réduit les communications inter-astrocytaires et la propagation de vagues calciques (Enkvist and McCarthy, 1992). Cela pourrait impliquer la phosphorylation de la sérine 368 réduisant la conductance des canaux et diminuant la communication intercellulaire (Lampe et al., 2000; Solan and Lampe, 2009). Ainsi nous pouvons émettre l'hypothèse que les IgG-NMO en induisant l'activation de voies intracellulaires, directement ou indirectement via la libération de facteurs extracellulaire, altèrent la fonction des connexines et réduisent le **couplage intercellulaire** par les jonctions communicantes.

Par ailleurs, la présence de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF- α diminue également l'activité *jonction communicante* (Retamal et al., 2007a). Or les astrocytes NMO induits par IgG-NMO produisent ces cytokines. Ainsi l'altération du phénotype astrocytaire et la production de cytokines proinflammatoire serait à l'origine et/ou entretiendrait la perte d'activité *jonction communicante*.

Ces cytokines ont néanmoins un effet opposé sur la fonction *hémicanal*, augmentant l'ouverture des hémicanaux (Retamal et al., 2007a; Froger et al., 2009, 2010). Nous avons également démontré une augmentation de l'activité *hémicanal* induite par IgG-NMO qui peut participer à la libération de glutamate (démontrée dans notre étude et bloquée par la carbenoxolone), ou à la libération d'autres molécules telles

que l'ATP (non démontrée). Glutamate et ATP sont également susceptibles d'entretenir, en retour, l'altération fonctionnelle des connexines en réduisant l'activité jonction communicante et en augmentant l'activité hémicanal (Même et al., 2004; De Vuyst et al., 2009). Il serait donc intéressant de d'étudier la libération d'ATP par les astrocytes en présence d'IgG-NMO ainsi que de vérifier l'implication de l'ATP et du glutamate dans les altérations des fonctions *hémicanal* et *jonction communicante* (**Figure 28-2 et 3**).

Dysfonction astrocytaire, connexinopathie et démyélinisation

Anticorps anti-AQP4 et démyélinisation : Nous avons démontré que les IgG-NMO induisent une démyélinisation. Celle-ci semble dépendre des patients, la proportion de diminution de la densité et la longueur des segments de myéline étant variable selon les patients. De plus, l'effet dépend de la présence d'anticorps anti-AQP4. En effet, un des patients testés ne présentait pas d'anticorps anti-AQP4 (NMO9) et l'effet démyélinisant des IgG de ce patient était moindre et il n'avait pas d'effet sur la longueur des segments de myéline tout comme les IgG-CTRL de donneurs sains. Comme discuté précédemment, les mécanismes d'action d'IgG-NMO sur l'astrocyte sont donc liés à la reconnaissance de la cible AQP4 et à l'induction d'un phénotype astrocytaire l'« astrocyte NMO » qui participerait dans la démyélinisation. La déplétion en anticorps anti-AQP4 ainsi que l'utilisation d'IgG issus de patients présentant des anti-MOG mais pas d'anti-AQP4 et de patients double séronégatifs, nous permettrait de confirmer cette observation.

Nous proposons ainsi plusieurs mécanismes à l'origine de la démyélinisation induite par NMO-IgG :

Glutamate, ATP et toxicité : Nos précédentes études et la présente ont démontré l'augmentation du glutamate dans le milieu extracellulaire d'astrocytes traités par IgG-NMO. Celle-ci peut résulter d'une dysfonction des hémicanaux mais aussi de la diminution de la recapture du glutamate. Nos précédents travaux ont démontré un effet toxique du glutamate, libéré par les astrocytes en contact avec les IgG-NMO, pour les oligodendrocytes, toxicité réduite en présence d'antagoniste compétitif des récepteurs NMDA (Marignier et al., 2010). Une importante diminution de l'expression de GLT-1 a été démontrée en présence de bloqueurs de jonctions communicantes, comme Gap27, démontrant un potentiel lien fonctionnel entre la régulation du transport du glutamate et les jonctions communicantes (Figiel et al., 2007). De plus, l'activité augmentée des hémicanaux de connexine induite par l'IgG-NMO pourrait être impliquée dans la libération de glutamate. Ainsi, l'accumulation de glutamate dans le milieu extracellulaire pourrait avoir un effet excitotoxique pour les neurones et les oligodendrocytes. Cette hypothèse est en accord avec nos précédents résultats et les présents démontrant une altération de glutamate extracellulaire et une mort oligodendrocytaire ainsi qu'une démyélinisation (Marignier et al., 2010, 2016).

Discussion

Ainsi l'inhibition des hémicanaux de Cx43 s'avère être bénéfique pour prévenir la démyélinisation dans la NMO. Par ailleurs, l'effet neuroprotecteur de l'inhibition des hémicanaux a déjà été démontré dans la maladie d'Alzheimer où la boldine, un alcaloïde inhibant spécifiquement les hémicanaux des astrocytes et microglies sans affecter les jonctions communicantes, bloque la libération d'ATP et de glutamate et diminue le stress oxydant des neurones de l'hippocampe (Yi et al., 2017). Cet effet neurotoxique du glutamate et de l'ATP, libérés par les hémicanaux, a été confirmé dans un modèle combinant une hypoxie et l'accumulation de peptide amyloïde- β (Orellana et al., 2011).

Cet effet délétère des hémicanaux de Cx43 a également été mis en évidence dans la sclérose latérale amyotrophique où la survie des motoneurons est augmentée en présence d'inhibiteurs d'hémicanaux (Almad et al., 2016). Mais aussi, dans un modèle d'EAE, le blocage des récepteurs purinergiques P2X7 réduit fortement la mort oligodendrocytaire, la réactivité astrocytaire et la démyélinisation (Matute, 2011; Grygorowicz et al., 2016; Domercq et al., 2018). Ainsi il serait intéressant de vérifier l'implication de l'ATP dans la démyélinisation car elle peut être libérée par les hémicanaux de Cx43 dont l'ouverture est activée par IgG-NMO.

Altération du K^+ et du réseau neuroglial : La rupture du réseau neuroglial, sous-tendu par les connexines, ainsi que la perte de Kir4.1, pourraient être à l'origine d'une augmentation de la concentration de $[K^+]_e$. De plus, une diminution du K^+ « *spatial buffering* » pourrait être impliquée dans la démyélinisation : en effet, l'augmentation de $[K^+]_e$ a des effets délétères sur les oligodendrocytes et sur la myéline (Menichella et al., 2006). De plus, le KO de Kir4.1 a des effets semblables au double KO des connexines oligodendrocytaires Cx47/Cx32 et induit une démyélinisation (Neusch et al., 2001). Notre étude a démontré une altération de l'expression des connexines astrocytaires et oligodendrocytaires dans le rat-NMO de manière concomitante aux lésions démyélinisantes. Cela pourrait être expliqué par la rupture du réseau neuroglial, impliqué non seulement dans la régulation du K^+ mais aussi dans la distribution de métabolites énergétiques (glucose et lactate) aux neurones et aux oligodendrocytes (Giaume et al., 2010). La perte de couplage intercellulaire par les jonctions communicantes, induite par Gap27 ou IgG-NMO, pourrait conduire à une perte de couplage métabolique entre astrocytes-oligodendrocytes-neurones et pourrait altérer leurs fonctions.

Milieu proinflammatoire : Nous avons démontré l'augmentation d'expression de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-1 β et TNF- α par les astrocytes NMO. Par ailleurs, la production de ces cytokines et du composant de la cascade du complément C1q, par les cellules microgliales, induit un phénotype astrocytaire neurotoxique (Liddel et al., 2017). Ces facteurs sont donc probablement

impliqués dans l'induction et le maintien du phénotype réactif astrocytaire dont les effets toxiques ont été démontrés sur la myéline et les oligodendrocytes par l'utilisation du milieu conditionné. En plus de l'effet direct de ces cytokines sur l'astrocyte, elles induisent la production d'espèces réactives de l'oxygène qui ont un effet délétère sur les neurones et les oligodendrocyte (John et al., 2003; Rothhammer and Quintana, 2015). Ainsi la modification du phénotype astrocytaire résulte en la production d'un milieu inflammatoire et toxique impliqué dans la démyélinisation. Cependant d'autres molécules et ions présents dans le milieu extracellulaire sont susceptibles d'être impliqués dans la démyélinisation induite par IgG-NMO. Comme évoqué précédemment, la présence d'IL-1 β et TNF- α pourrait induire et/ ou maintenir l'altération de fonction des connexines en diminuant l'activité *jonction communicante* et en augmentant l'activité *hémicanal* (Même et al., 2004; Hinkerohe et al., 2005; Retamal et al., 2007b; Froger et al., 2009). La présence de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- β 1 ou l'IFN- β est capable de réverser cet effet (Robe et al., 2000; Hinkerohe et al., 2005). Il serait donc intéressant de vérifier l'implication des cytokines proinflammatoires dans l'altération de fonction des connexines en utilisant des anticorps bloquant l'IL-1 β et le TNF- α ou des cytokines anti-inflammatoires comme le TGF- β 1.

Dysfonction astrocytaire et transmission synaptique : un rôle pour les connexines ?

Nous avons démontré un effet délétère des IgG-NMO sur la transmission synaptique glutamatergique. En effet, ils réduisent fortement les réponses post-synaptiques en condition basale. Cela pourrait résulter d'une altération de la fonction astrocytaire, la libération de molécules actives comme des cytokines, facteurs de croissance ou des gliotransmetteurs par l'astrocyte. Nous avons démontré la présence de cytokines et chimiokines proinflammatoires en présence d'IgG-NMO. Notre étude se basait sur des temps d'infusion court, or, l'effet de ces cytokines sur la transmission basale n'est pas clair et elles seraient plus probablement impliquées sur le long terme. En effet, la présence de taux élevés de TNF- α et d'IL-1 β , par exemple, altère la LTP et provoque des comportement dits dépressifs, des troubles mnésiques et de l'humeur dans des modèles animaux (Jankowsky and Patterson, 1999; Khairova et al., 2009). En contexte neuroinflammatoire, comme dans les modèles EAE, l'augmentation de TNF- α augmentant la quantité de récepteurs AMPA de l'élément post-synaptique ainsi que la perturbation de la recapture du glutamate conduit à une perte synaptique par excitotoxicité (Rizzo et al., 2018). Ainsi l'effet des IgG-NMO sur le long terme pourrait être toxique pour les synapses par des mécanismes similaires.

Discussion

Notre étude suggère l'implication des connexines dans la diminution des réponses synaptiques, cet effet devra être validé par répétition. Les hémicanaux de Cx43 sont impliqués dans la régulation de la transmission glutamatergique basale par des mécanismes impliquant la libération d'ATP (Chever et al., 2014). Ainsi le blocage des hémicanaux de Cx43 (avec le peptide inhibiteur Gap26) diminuait l'amplitude des potentiels post-synaptiques excitateurs en réduisant drastiquement la libération d'ATP. Il se pourrait donc qu'une altération précoce de l'activité hémicanal, induite par IgG-NMO, participant dans la gliotransmission, soit impliquée dans la diminution des réponses observée dans notre étude et devra être vérifiée par l'utilisation d'un peptide inhibiteur d'hémicanaux de Cx43 (TAT-Gap19).

Cependant la gliotransmission peut aussi impliquer d'autres mécanismes que les hémicanaux comme la libération vésiculaire par les astrocytes. Ainsi, la libération d'ATP par les astrocytes, convertie en adénosine dans l'espace extracellulaire, conduit à une diminution des réponses basales et une augmentation de la potentialisation à long terme (Pascual, 2005) ce qui va à l'encontre de l'effet démontré par Chever et collaborateurs. Cela pourrait être expliqué par les différentes signalisation possibles des purines (ATP et adénosine) via différents récepteurs. Ainsi de nombreux mécanismes modulant la gliotransmission pourraient être impliqués dans la modulation de l'activité synaptique induite par IgG-NMO. Ceux-ci devront être considérés dans nos futures approches par l'utilisations de bloqueurs pharmacologiques spécifiques et notamment de l'ATP/adénosine et du glutamate, des gliotransmetteurs majoritaires.

La carbenoxolone bloquant à la fois les jonctions communicantes et hémicanaux de toutes les connexines, nous utiliserons des bloqueurs spécifiques des fonctions hémicanal ou jonction communicantes (peptides TAT-Gap19 et Gap27 respectivement) afin de déterminer le rôle de chacune de ces fonctions dans l'effet des IgG-NMO. En effet, le blocage des jonctions communicantes pourrait résulter en une augmentation de la concentration de K^+ extracellulaire $[K^+]_e$ par diminution du K^+ « spatial buffering » par les astrocytes comme démontré *in vivo* avec une augmentation de $[K^+]_e$ en présence de bloqueurs de connexine : la carbenoxolone et le peptide inhibiteur de jonction communicante de Cx43 (Gap27) et qui n'était pas observée en présence du peptide inhibiteur d'hémicanaux de Cx43 (Gap19) (Bazzigaluppi et al., 2017). L'augmentation de $[K^+]_e$ a un effet sur les réponses neuronales et diminue fortement l'amplitude des réponses enregistrées en potentiel de champs local. Dans notre étude, la carbenoxolone diminue l'amplitude des réponses et l'ajout d'IgG-NMO n'a pas d'effet. Or nous avons montré une forte diminution de l'activité jonction communicante en présence d'IgG-NMO. Cet effet, induit par IgG-NMO pourrait donc impliquer une altération de la redistribution du K^+ via les jonctions communicantes inter-astrocytaires.

Discussion

La NMO est considérée comme une maladie rémittente avec des poussées sévères liées à une activité auto-immune, or les troubles cognitifs évoluent de façon progressive et sans corrélation avec les poussées. La présence d'une atteinte chronique de l'expression et de la fonction des connexines, au-delà des atteintes lésionnelles aiguës, suggère leur implication dans une progression lente des altérations cognitives observées chez les patients NMO.

Enfin, cette étude visait à étudier l'effet aigu des IgG-NMO dans un premier temps afin d'ensuite évaluer l'effet chronique des IgG-NMO sur la transmission glutamatergique basale chez des rats infusés sept jours avec des IgG-NMO ou des IgG-CTRL, modèle que nous avons mis en place au laboratoire (rat-NMO). Une infusion de plus longue durée permettrait d'associer une altération de la transmission synaptique à d'éventuelles altérations cognitives, comme celles observées chez les patients, en testant par exemple la mémoire des animaux (Eizaguirre et al., 2017; Meng et al., 2017). Les altérations cognitives étant généralement associées à des altérations des mécanismes de potentialisation à long terme, ils pourraient également être altérés en présence d'IgG-NMO. De plus, les lésions NMO touchant principalement le nerf optique et la moelle épinière, il serait intéressant de compléter cette étude par un protocole analysant la vitesse de conduction dans les voies visuelles. En effet, la démyélinisation induite par IgG-NMO pourrait être à l'origine d'une diminution de la vitesse de conduction des potentiels d'action dans le nerf optique et dans les voies visuelles résultant en une augmentation de la latence de réponse à un stimulus visuel.

En résumé, les IgG-NMO sont responsables d'une altération de l'expression de protéines astrocytaires comprenant la perte d'expression des transporteurs au glutamate et du canal Kir4.1, et l'altération fonctionnelle des connexines, qui pourraient participer aux mécanismes d'altération de la transmission synaptique. Ces mécanismes pourraient impliquer à la fois une altération de la gliotransmission mais aussi une rupture de l'homéostasie du glutamate et du potassium.

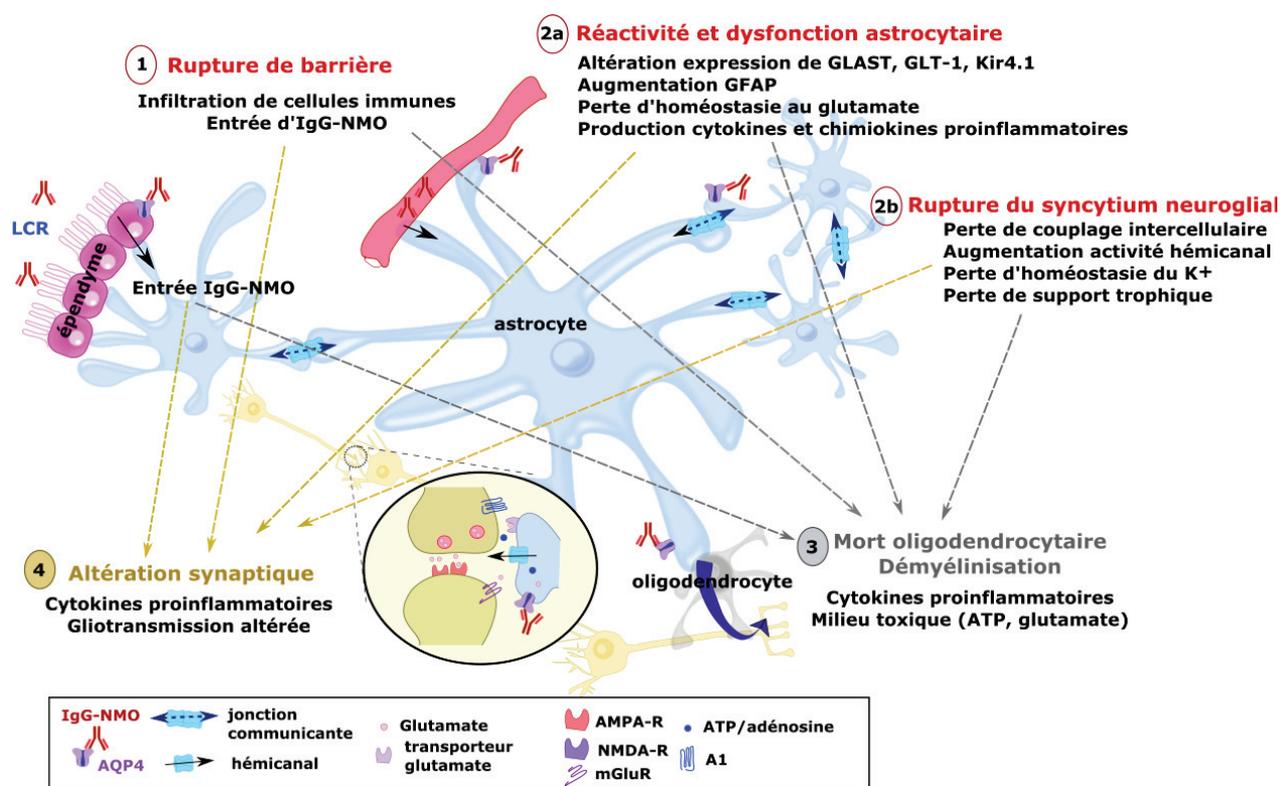


Figure 28 : Schéma des mécanismes potentiels d'action d'IgG-NMO conduisant à la démyélinisation et à l'altération synaptique. 1) les IgG-NMO présents dans le sang et dans le LCR peuvent pénétrer dans le parenchyme cérébral et altérer les fonctions de barrières en modifiant les fonctions des astrocytes et des épendymocytes exprimant l'AQP4. Cette rupture de barrière pourrait faciliter l'entrée de cellules immunes participant à la démyélinisation (3) et maintenir l'entrée des IgG-NMO. 2) Les IgG-NMO induisent un phénotype astrocytaire réactif et dysfonctionnel caractérisé par la perte d'expression des transporteurs au glutamate conduisant à une rupture de l'homéostasie du glutamate, la perte de Kir4.1, l'augmentation de GFAP, la production de cytokines et chimiokines proinflammatoires (2a) participant à la formation d'un milieu toxique pour la myéline et les oligodendrocytes (3). Les IgG-NMO altèrent les fonctions des connexines conduisant à une rupture du réseau neuroglial et à une perte de l'homéostasie du potassium et du support trophique aux oligodendrocytes (2b) participant à la démyélinisation (3). 3) La dysfonction astrocytaire peut également conduire à la formation d'un milieu toxique pour la myéline avec la production de cytokines proinflammatoires et de molécules excitotoxiques telles que l'ATP et le glutamate. 4) L'entrée d'IgG-NMO suivie de l'altération des fonctions astrocytaire et des connexines peut également participer à une diminution des réponses synaptiques avec une altération de la gliotransmission et la libération de cytokines proinflammatoires.

Vers de nouvelles voies thérapeutiques de protection de la myéline et des neurones dans la NMO ?

Réversion du phénotype astrocytaire

Au cours de cette thèse, nous avons également envisagé et testé de nouveaux mécanismes visant à réduire la cascade lésionnelle induite par IgG-NMO. Nos résultats démontrant un phénotype astrocytaire dysfonctionnel, proinflammatoire et toxique nous avons envisagé que la réversion de ce phénotype pourrait avoir des effets bénéfiques sur les oligodendrocytes et la myéline. C'est pourquoi nous avons utilisé le TGF- β 1, un facteur de croissance aux effets anti-inflammatoires modulant la fonction astrocytaire. En effet, le TGF- β 1 agit en activant des récepteurs au TGF- β de type II (T β RII) ou type I (T β RI). Les récepteurs de type III (T β RIII) quant à eux jouent un rôle de recrutement et de présentation des ligands aux récepteurs de type I et II. La fixation de TGF- β 1 sur T β RII provoque la phosphorylation de T β RI qui permet la phosphorylation de molécules cytoplasmique du complexe de facteurs de transcription Smad régulant l'expression de gènes cibles. Le TGF- β 1 peut également induire l'activation d'enzyme, kinases, intracellulaires participent également à la signalisation de TGF- β 1 (Guo and Wang, 2009; Weiss and Attisano, 2013).

Ainsi, par l'induction de voies de signalisation intracellulaire, TGF- β 1 pourrait contrecarrer l'effet des IgG-NMO en réduisant la production de cytokines proinflammatoires. De plus un effet neuroprotecteur du TGF- β 1 a été démontré dans des modèles d'accident vasculaire cérébral et d'infection du SNC réduisant l'inflammation et les dommages aux neurones (Cekanaviciute et al., 2014a; b). Nos résultats ont démontré que le TGF- β 1 réduisait l'expression astrocytaire du TNF- α et de l'IL-1 β démontrant un effet anti-inflammatoire de ce facteur sur les astrocytes. Il existe également un lien entre TGF- β 1 et les transporteurs au glutamate : la déplétion en TGF- β 1 dans le cerveau adulte de souris conduit à une diminution d'expression des transporteurs au glutamate GLAST et GLT-1 résultant en une augmentation de l'excitotoxicité et une perte neuronale (Koeglsperger et al., 2013). Cette étude a également démontré que le TGF- β 1 induit l'expression de GLAST et GLT-1 en culture astrocytaire. Ces résultats sont en accord avec nos observations : le TGF- β 1 empêche la diminution d'AQP4, et GLAST et GLT1 induite par IgG-NMO dans des cultures astrocytaires mais également que l'utilisation du TGF- β 1 empêchait la démyélinisation induite par IgG-NMO.

Ainsi, l'utilisation du TGF- β 1 peut réverser le phénotype réactif et dysfonctionnel des astrocytes traités par IgG-NMO et rétablir ses fonctions indispensables au fonctionnement du SNC. Ces effets bénéfiques en font une voie thérapeutique potentielle qui a déjà été proposé dans le traitement d'atteintes neuroinflammatoires du SNC comme la maladie d'Alzheimer (Diniz et al., 2018) et qui pourrait être envisagée dans les pathologies démyélinisantes du SNC.

Modulation des fonctions des connexines

Notre étude a montré un rôle des connexines dans la démyélinisation induite par IgG-NMO. En effet, la dysfonction astrocytaire est caractérisée par une perte de communication intercellulaire via les *jonctions communicantes* et une augmentation de l'ouverture des *hémicanaux*. L'inhibition des *jonctions communicantes* et des *hémicanaux* de Cx43 par le peptide inhibiteur Gap27 dans une culture myélinisante conduisait à une perte de myéline semblable à celle des IgG-NMO. Cependant l'inhibition des *hémicanaux* de Cx43, sans inhibition des *jonctions communicantes* par le peptide Gap 19 (Abudara et al., 2014), empêchait la démyélinisation induit par IgG-NMO. Ainsi, une rupture du réseau neuroglial sous tendu par les jonctions communicantes, mais aussi l'ouverture des hémicanaux, induites par IgG-NMO, serait délétères pour la myéline.

Ainsi, un intérêt grandissant est porté aux connexines car elles sont des cibles thérapeutiques prometteuses pour les pathologies du SNC (Charvériat et al., 2017). A l'heure actuelle, des thérapies combinées sont proposées avec l'utilisation de stimulateurs d'éveils (modafinil) et de bloqueurs de connexine (flécainide) pour le traitement de la narcolepsie. La combinaison modafinil + flecainide (THN102) potentialise l'effet du modafinil et augmente le métabolisme du glucose dans des régions cérébrales impliquées dans les cycles veille-sommeil, les émotions et les fonctions cognitives (Vodovar et al., 2018). Ce traitement THN102 est en essai clinique de phase 2 dans la Narcolepsie et dans maladie de Parkinson (Communiqué de Presse, Theranexus®, 2019). De plus d'autres combinaisons de traitements avec des inhibiteurs de connexines sont également en essai clinique de phase 1 pour le traitement de la maladie d'Alzheimer et les douleurs neuropathiques.

Ainsi une étude de l'effet des inhibiteurs de connexines *in vivo* permettrait de valider leur implication dans les altérations de la NMO et d'envisager des thérapies ciblant les connexines. Nos futures approches auront pour objectif de valider, *in vivo*, l'implication de la dysfonction des connexines, induite par IgG-NMO, dans les atteintes de la NMO. Pour cela, nous pourrions co-infuser les IgG-NMO avec les peptides Gap27 ou Gap19 durant sept jours dans le ventricule de rats et évaluer la présence de lésions typiques

Discussion

(perte axonale, démyélinisation, perte d'AQP4). Ce modèle nous permettrait également d'étudier l'implication des IgG-NMO et des connexines à plus long terme dans les altérations synaptiques. L'étude des connexines dans les pathologies démyélinisantes, telles que la NMO, pourrait fournir d'intéressantes voies thérapeutiques spécifiques des mécanismes physiopathologiques.

REFERENCES

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. 2006. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* 7:41–53.
- Abrams CK, Rash JE. 2009. Connexins in the Nervous System. In: Harris AL, Locke D, editors. *Connexins: A Guide*. Totowa, NJ: Humana Press. p 323–357.
- Abudara V, Bechberger J, Freitas-Andrade M, De Bock M, Wang N, Bultynck G, Naus CC, Leybaert L, Giaume C. 2014. The connexin43 mimetic peptide Gap19 inhibits hemichannels without altering gap junctional communication in astrocytes. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8:306.
- Abudara V, Retamal MA, Del Rio R, Orellana JA. 2018. Synaptic Functions of Hemichannels and Pannexons: A Double-Edged Sword. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11:1–24.
- Ahmad MH, Fatima M, Mondal AC. 2019. Influence of microglia and astrocyte activation in the neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer’s disease: Rational insights for the therapeutic approaches. *Journal of Clinical Neuroscience* 59:6–11.
- Almad AA, Doreswamy A, Gross SK, Richard J-P, Huo Y, Haughey N, Maragakis NJ. 2016. Connexin 43 in astrocytes contributes to motor neuron toxicity in amyotrophic lateral sclerosis: Connexin 43 Plays a Role in Loss of Motor Neurons in ALS. *Glia* 64:1154–1169.
- Almeida RG. 2018. The Rules of Attraction in Central Nervous System Myelination. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12:1–9.
- Anderson MA, Ao Y, Sofroniew MV. 2014. Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neuroscience Letters* 565:23–29.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SHR, Robitaille R, Volterra A. 2014. Gliotransmitters Travel in Time and Space. *Neuron* 81:728–739.
- Arinuma Y, Yanagida T, Hirohata S. 2008. Association of cerebrospinal fluid anti-NR2 glutamate receptor antibodies with diffuse neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 58:1130–1135.
- Axelsen LN, Calloe K, Holstein-Rathlou N-H, Nielsen MS. 2013. Managing the complexity of communication: regulation of gap junctions by post-translational modification. *Frontiers in Pharmacology* 4:1–18.
- Bachoo RM, Kim RS, Ligon KL, Maher EA, Brennan C, Billings N, Chan S, Li C, Rowitch DH, Wong WH, DePinho RA. 2004. Molecular diversity of astrocytes with implications for neurological disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:8384–8389.
- Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC. 2001. Late Oligodendrocyte Progenitors Coincide with the Developmental Window of Vulnerability for Human Perinatal White Matter Injury. *The Journal of Neuroscience* 21:1302–1312.

Références

- Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. 2018. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron* 97:742–768.
- Bai D, Wang AH. 2014. Extracellular domains play different roles in gap junction formation and docking compatibility. *Biochemical Journal* 458:1–10.
- Ball KK, Harik L, Gandhi GK, Cruz NF, Diemel GA. 2011. Reduced gap junctional communication among astrocytes in experimental diabetes: Contributions of altered connexin protein levels and oxidative-nitrosative modifications. *Journal of Neuroscience Research* 89:2052–2067.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. 2004. The blood–brain barrier: an overview. *Neurobiology of Disease* 16:1–13.
- Barateiro A, Fernandes A. 2014. Temporal oligodendrocyte lineage progression: In vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843:1917–1929.
- Barnett SC, Linington C. 2013. Myelination: Do Astrocytes Play a Role? *The Neuroscientist* 19:442–450.
- Baroja-Mazo A, Barberà-Cremades M, Pelegrín P. 2013. The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828:79–93.
- Barres BA, Raff MC. 1999. Axonal control of oligodendrocyte development. *The Journal of cell biology* 147:1123–1128.
- Barrio LC, Suchyna T, Bargiello T, Xu LX, Roginski RS, Bennett MV, Nicholson BJ. 1991. Gap junctions formed by connexins 26 and 32 alone and in combination are differently affected by applied voltage. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8410–8414.
- Bazzigaluppi P, Weisspapir I, Stefanovic B, Leybaert L, Carlen PL. 2017. Astrocytic gap junction blockade markedly increases extracellular potassium without causing seizures in the mouse neocortex. *Neurobiology of Disease* 101:1–7.
- Bear MF, Huber KM, Warren ST. 2004. The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends in Neurosciences* 27:370–377.
- Bellot-Saez A, Kékesi O, Morley JW, Buskila Y. 2017. Astrocytic modulation of neuronal excitability through K⁺ spatial buffering. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 77:87–97.
- Ben Achour S, Pascual O. 2012. Astrocyte–Neuron Communication: Functional Consequences. *Neurochemical Research* 37:2464–2473.
- Ben Achour S, Pont-Lezica L, Béchade C, Pascual O. 2010. Is astrocyte calcium signaling relevant for synaptic plasticity? *Neuron Glia Biology* 6:147–155.
- Ben Haim L, Carrillo-de Sauvage M-A, Ceyzériat K, Escartin C. 2015. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* 9:1–27.

Références

- Bercury KK, Macklin WB. 2015. Dynamics and Mechanisms of CNS Myelination. *Developmental Cell* 32:447–458.
- Bittman K, Owens DF, Kriegstein AR, LoTurco JJ. 1997. Cell Coupling and Uncoupling in the Ventricular Zone of Developing Neocortex. *The Journal of Neuroscience* 17:7037–7044.
- Bjelke B, Seiger A. 1989. Morphological distribution of MBP-like immunoreactivity in the brain during development. *International Journal of Developmental Neuroscience* 7:145–164.
- Blanc F, Zéphir H, Lebrun C, Labauge P, Castelnovo G, Fleury M, Sellal F, Tranchant C, Dujardin K, Vermersch P, de Seze J. 2008. Cognitive Functions in Neuromyelitis Optica. *Archives of Neurology* 65:84–88.
- Blomstrand F, Åberg ND, Eriksson PS, Hansson E, Rönnbäck L. 1999. Extent of intercellular calcium wave propagation is related to gap junction permeability and level of connexin-43 expression in astrocytes in primary cultures from four brain regions. *Neuroscience* 92:255–265.
- Bondurand N. 2001. Human Connexin 32, a gap junction protein altered in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease, is directly regulated by the transcription factor SOX10. *Human Molecular Genetics* 10:2783–2795.
- Bost C, Pascual O, Honnorat J. 2016. Autoimmune encephalitis in psychiatric institutions: current perspectives. *Neuropsychiatric Disease and Treatment Volume* 12:2775–2787.
- Boulay A-C, Mazeraud A, Cisternino S, Saubamea B, Mailly P, Jourdain L, Blugeon C, Mignon V, Smirnova M, Cavallo A, Ezan P, Ave P, Dingli F, Loew D, Vieira P, Chretien F, Cohen-Salmon M. 2015. Immune Quiescence of the Brain Is Set by Astroglial Connexin 43. *Journal of Neuroscience* 35:4427–4439.
- Boulay A-C, Saubaméa B, Adam N, Chasseigneaux S, Mazaré N, Gilbert A, Bahin M, Bastianelli L, Blugeon C, Perrin S, Pouch J, Ducos B, Le Crom S, Genovesio A, Chrétien F, Declèves X, Laplanche J-L, Cohen-Salmon M. 2017. Translation in astrocyte distal processes sets molecular heterogeneity at the gliovascular interface. *Cell Discovery* 3:1–20.
- Braet K, Cabooter L, Paemeleire K, Leybaert L. 2004. Calcium signal communication in the central nervous system. *Biology of the Cell* 96:79–91.
- Brambilla R, Persaud T, Hu X, Karmally S, Shestopalov VI, Dvorientchikova G, Ivanov D, Nathanson L, Barnum SR, Bethea JR. 2009. Transgenic Inhibition of Astroglial NF- κ B Improves Functional Outcome in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Suppressing Chronic Central Nervous System Inflammation. *The Journal of Immunology* 182:2628–2640.
- Brill L, Goldberg L, Karni A, Petrou P, Abramsky O, Ovadia H, Ben-Hur T, Karussis D, Vaknin-Dembinsky A. 2015. Increased anti-KIR4.1 antibodies in multiple sclerosis: Could it be a marker of disease relapse? *Multiple Sclerosis Journal* 21:572–579.
- Brimberg L, Mader S, Fujieda Y, Arinuma Y, Kowal C, Volpe BT, Diamond B. 2015. Antibodies as Mediators of Brain Pathology. *Trends in Immunology* 36:709–724.
- Bruzzone R, Dermietzel R. 2006. Structure and function of gap junctions in the developing brain. *Cell and Tissue Research* 326:239–248.

Références

- Bruzzone R, White TW, Paul DL. 1994. Expression of chimeric connexins reveals new properties of the formation and gating behavior of gap junction channels. *Journal of Cell Science* 107:955–967.
- Buosi AS, Matias I, Araujo APB, Batista C, Gomes FCA. 2018. Heterogeneity in Synaptogenic Profile of Astrocytes from Different Brain Regions. *Molecular Neurobiology* 55:751–762.
- Burda JE, Sofroniew MV. 2014. Reactive Gliosis and the Multicellular Response to CNS Damage and Disease. *Neuron* 81:229–248.
- Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostenfeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. 1999. Leukocyte Infiltration, Neuronal Degeneration, and Neurite Outgrowth after Ablation of Scar-Forming, Reactive Astrocytes in Adult Transgenic Mice. *Neuron* 23:297–308.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. 2002. Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains. *The Journal of Neuroscience* 22:183–192.
- Cao S, Theodore S, Standaert DG. 2010. Fcγ receptors are required for NF-κB signaling, microglial activation and dopaminergic neurodegeneration in an AAV-synuclein mouse model of Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration* 5:1–12.
- Cekanaviciute E, Dietrich HK, Axtell RC, Williams AM, Egusquiza R, Wai KM, Koshy AA, Buckwalter MS. 2014a. Astrocytic TGF-β Signaling Limits Inflammation and Reduces Neuronal Damage during Central Nervous System Toxoplasma Infection. *The Journal of Immunology* 193:139–149.
- Cekanaviciute E, Fathali N, Doyle KP, Williams AM, Han J, Buckwalter MS. 2014b. Astrocytic transforming growth factor-beta signaling reduces subacute neuroinflammation after stroke in mice: Astrocytic TGFβ Reduces Neuroinflammation. *Glia* 62:1227–1240.
- Ceyzériat K, Abjean L, Carrillo-de Sauvage M-A, Ben Haim L, Escartin C. 2016. The complex STATes of astrocyte reactivity: How are they controlled by the JAK–STAT3 pathway? *Neuroscience* 330:205–218.
- Ceyzériat K, Ben Haim L, Denizot A, Pommier D, Matos M, Guillemaud O, et al. Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications* 2018; 6
- Chaboub LS, Deneen B. 2013. Astrocyte Form and Function in the Developing Central Nervous System. *Seminars in Pediatric Neurology* 20:230–235.
- Chang Q, Gonzalez M, Pinter MJ, Balice-Gordon RJ. 1999. Gap Junctional Coupling and Patterns of Connexin Expression among Neonatal Rat Lumbar Spinal Motor Neurons. *The Journal of Neuroscience* 19:10813–10828.
- Chanson M, Kotsias B, Peracchia C, Ogrady S. 2007. Interactions of connexins with other membrane channels and transporters. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 94:233–244.
- Charvériat M, Naus CC, Leybaert L, Sáez JC, Giaume C. 2017. Connexin-Dependent Neuroglial Networking as a New Therapeutic Target. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11:1–14.

Références

- Chen L-W, Dong M-H, Kuang F, Liu J-T, Zhang J-Q, Bai Y. 2015. Microglia and astroglia: the role of neuroinflammation in lead toxicity and neuronal injury in the brain. *Neuroimmunology and Neuroinflammation* 2:131–137.
- Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion M. 2014. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of Neuroinflammation* 11:1–15.
- Chever O, Dossi E, Pannasch U, Derangeon M, Rouach N. 2016. Astroglial networks promote neuronal coordination. *Science Signaling* 9:1–8.
- Chever O, Lee C-Y, Rouach N. 2014. Astroglial Connexin43 Hemichannels Tune Basal Excitatory Synaptic Transmission. *Journal of Neuroscience* 34:11228–11232.
- Cho EB, Han CE, Seo SW, Chin J, Shin J-H, Cho H-J, Seok JM, Kim ST, Kim BJ, Na DL, Lee K-H, Seong J-K, Min J-H. 2018. White Matter Network Disruption and Cognitive Dysfunction in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Frontiers in Neurology* 9:1–10.
- Ciccarelli O, Barkhof F, Bodini B, Stefano ND, Golay X, Nicolay K, Pelletier D, Pouwels PJW, Smith SA, Wheeler-Kingshott CAM, Stankoff B, Yousry T, Miller DH. 2014. Pathogenesis of multiple sclerosis: insights from molecular and metabolic imaging. *The Lancet Neurology* 13:807–822.
- Cina C, Bechberger JF, Ozog MA, Naus CCG. 2007. Expression of connexins in embryonic mouse neocortical development. *The Journal of Comparative Neurology* 504:298–313.
- Clardy SL, Lucchinetti CF, Krecke KN, Lennon VA, O'Toole O, Weinshenker BG, Boyd CD, Krieger S, McGraw C, Guo Y, Pittock SJ. 2014. Hydrocephalus in neuromyelitis optica. *Neurology* 82:1841–1843.
- Cobo-Calvo A, Ruiz A, Maillart E, Audoin B, Zephir H, Bourre B, Ciron J, Collongues N, Brassat D, Cotton F, Papeix C, Durand-Dubief F, Laplaud D, Deschamps R, Cohen M, Biotti D, Ayrignac X, Tilikete C, Thouvenot E, Brochet B, Dulau C, Moreau T, Tourbah A, Lebranchu P, Michel L, Lebrun-Frenay C, Montcuquet A, Mathey G, Debouverie M, Pelletier J, Labauge P, Derache N, Coustans M, Rollot F, De Seze J, Vukusic S, Marignier R. 2018. Clinical spectrum and prognostic value of CNS MOG autoimmunity in adults: The MOGADOR study. *Neurology* 90:e1858–e1869.
- Colombo E, Farina C. 2016. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends in Immunology* 37:608–620.
- Connors NC, Adams ME, Froehner SC, Kofuji P. 2004. The Potassium Channel Kir4.1 Associates with the Dystrophin-Glycoprotein Complex via α -Syntrophin in Glia. *Journal of Biological Chemistry* 279:28387–28392.
- Contreras JE, Saez JC, Bukauskas FF, Bennett MVL. 2003. Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:11388–11393.
- Cornell-Bell A, Finkbeiner S, Cooper M, Smith S. 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247:470–473.

Références

- Covarrubias-Pinto A, Acuña A, Beltrán F, Torres-Díaz L, Castro M. 2015. Old Things New View: Ascorbic Acid Protects the Brain in Neurodegenerative Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* 16:28194–28217.
- Crane JM, Van Hoek AN, Skach WR, Verkman AS. 2008. Aquaporin-4 Dynamics in Orthogonal Arrays in Live Cells Visualized by Quantum Dot Single Particle Tracking. *Molecular Biology of the Cell* 19:3369–3378.
- Dai X, Lercher LD, Clinton PM, Du Y, Livingston DL, Vieira C, Yang L, Shen MM, Dreyfus CF. 2003. The Trophic Role of Oligodendrocytes in the Basal Forebrain. *The Journal of Neuroscience* 23:5846–5853.
- Dbouk HA, Mroue RM, El-Sabban ME, Talhouk RS. 2009. Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Communication and Signaling* 7:1–17.
- De Bock M, Leybaert L, Giaume C. 2017. Connexin Channels at the Glio-Vascular Interface: Gatekeepers of the Brain. *Neurochemical Research* 42:2519–2536.
- De Bock M, Wang N, Bol M, Decrock E, Ponsaerts R, Bultynck G, Dupont G, Leybaert L. 2012. Connexin 43 Hemichannels Contribute to Cytoplasmic Ca²⁺ Oscillations by Providing a Bimodal Ca²⁺-dependent Ca²⁺ Entry Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 287:12250–12266.
- De Vuyst E, Wang N, Decrock E, De Bock M, Vinken M, Van Moorhem M, Lai C, Culot M, Rogiers V, Cecchelli R, Naus CC, Evans WH, Leybaert L. 2009. Ca²⁺ regulation of connexin 43 hemichannels in C6 glioma and glial cells. *Cell Calcium* 46:176–187.
- Deli MA, Descamps L, Dehouck M-P, Cecchelli R, Joó F, Abraham CS, Torpier G. 1995. Exposure of tumor necrosis factor- α to luminal membrane of bovine brain capillary endothelial cells cocultured with astrocytes induces a delayed increase of permeability and cytoplasmic stress fiber formation of actin: Effects of TNF- α on Blood-Brain Barrier. *Journal of Neuroscience Research* 41:717–726.
- Derecki NC, Cardani AN, Yang CH, Quinlins KM, Criehtfield A, Lynch KR, Kipnis J. 2010. Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *The Journal of Experimental Medicine* 207:1067–1080.
- Dermietzel R, Hertberg E, Kessler J, Spray D. 1991. Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis. *The Journal of Neuroscience* 11:1421–1432.
- Diamond B, Honig G, Mader S, Brimberg L, Volpe BT. 2013. Brain-Reactive Antibodies and Disease. *Annual Review of Immunology* 31:345–385.
- Diamond B, Huerta PT, Mina-Osorio P, Kowal C, Volpe BT. 2009. Losing your nerves? Maybe it's the antibodies. *Nature Reviews Immunology* 9:449–456.
- Didier N, Romero IA, Créminon C, Wijkhuisen A, Grassi J, Mabondzo A. 2004. Secretion of interleukin-1 β by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor- α effects on human brain microvascular endothelial cell permeability: Endothelin-1 in blood-brain barrier breakdown. *Journal of Neurochemistry* 86:246–254.

Références

- Diniz LP, Matias I, Siqueira M, Stipursky J, Gomes FCA. 2018. Astrocytes and the TGF- β 1 Pathway in the Healthy and Diseased Brain: a Double-Edged Sword. *Molecular Neurobiology* [Internet]. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1396-y>
- DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. 2016. Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of Neurochemistry* 139:136–153.
- Domercq M, Zabala A, Matute C. 2018. Purinergic receptors in multiple sclerosis pathogenesis. *Brain Research Bulletin* [Internet] 11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.11.018>
- Dringen R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology* 62:649–671.
- Dutta DJ, Woo DH, Lee PR, Pajevic S, Bukalo O, Huffman WC, et al. Regulation of myelin structure and conduction velocity by perinodal astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2018; 115: 11832–11837.
- Eghbali B, Kessler JA, Spray DC. 1990. Expression of gap junction channels in communication-incompetent cells after stable transfection with cDNA encoding connexin 32. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87:1328–1331.
- Eizaguirre MB, Alonso R, Vanotti S, Garcea O. 2017. Cognitive impairment in neuromyelitis optica spectrum disorders: What do we know? *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 18:225–229.
- Elias LAB, Kriegstein AR. 2008. Gap junctions: multifaceted regulators of embryonic cortical development. *Trends in Neurosciences* 31:243–250.
- Elias LAB, Turmaine M, Parnavelas JG, Kriegstein AR. 2010. Connexin 43 Mediates the Tangential to Radial Migratory Switch in Ventrally Derived Cortical Interneurons. *Journal of Neuroscience* 30:7072–7077.
- Elias LAB, Wang DD, Kriegstein AR. 2007. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* 448:901–907.
- Eng LF, Ghirnikar RS. 1994. GFAP and Astrogliosis. *Brain Pathology* 4:229–237.
- Enkvist MOK, McCarthy KD. 1992. Activation of Protein Kinase C Blocks Astroglial Gap Junction Communication and Inhibits the Spread of Calcium Waves. *Journal of Neurochemistry* 59:519–526.
- Evans WH, De Vuyst E, Leybaert L. 2006. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochemical Journal* 397:1–14.
- Ezan P, André P, Cisternino S, Saubaméa B, Boulay A-C, Doutremer S, Thomas M-A, Quenech'du N, Giaume C, Cohen-Salmon M. 2012. Deletion of astroglial connexins weakens the blood–brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 32:1457–1467.
- Falk MM, Baker SM, Gumpert AM, Segretain D, Buckheit RW. 2009. Gap Junction Turnover Is Achieved by the Internalization of Small Endocytic Double-Membrane Vesicles. *Mol Biol Cell* 20:3342–3352.

Références

- Falk MM, Kells RM, Berthoud VM. 2014. Degradation of connexins and gap junctions. *FEBS Letters* 588:1221–1229.
- Fan Y, Liu M, Wu X, Wang F, Ding J, Chen J, Hu G. 2013. Aquaporin-4 promotes memory consolidation in Morris water maze. *Brain Structure and Function* 218:39–50.
- de Faria O, Gonsalvez DG, Nicholson M, Xiao J. 2019. Activity-dependent central nervous system myelination throughout life. *Journal of Neurochemistry* 148:447–461.
- Farina C, Aloisi F, Meinl E. 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in Immunology* 28:138–145.
- Ffrench-Constant C, Miller RH, Kruse J, Schachner M, Raff MC. 1986. Molecular specialization of astrocyte processes at nodes of Ranvier in rat optic nerve. *The Journal of cell biology* 102:844–852.
- Figiel M, Allritz C, Lehmann C, Engele J. 2007. Gap junctional control of glial glutamate transporter expression. *Molecular and Cellular Neuroscience* 35:130–137.
- Filosa JA, Bonev AD, Straub SV, Meredith AL, Wilkerson MK, Aldrich RW, Nelson MT. 2006. Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nature Neuroscience* 9:1397–1403.
- Flotho A, Melchior F. 2013. Sumoylation: A Regulatory Protein Modification in Health and Disease. *Annual Review of Biochemistry* 82:357–385.
- Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, Tansey MG. 2009. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Molecular Neurodegeneration* 4:1–12.
- Frisch C, Theis M, De Souza Silva MA, Dere E, Sohl G, Teubner B, Namestkova K, Willecke K, Huston JP. 2003. Mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43 exhibit increased exploratory behaviour, impaired motor capacities, and changes in brain acetylcholine levels. *European Journal of Neuroscience* 18:2313–2318.
- Froger N, Orellana JA, Calvo C-F, Amigou E, Kozoriz MG, Naus CC, Sáez JC, Giaume C. 2010. Inhibition of cytokine-induced connexin43 hemichannel activity in astrocytes is neuroprotective. *Molecular and Cellular Neuroscience* 45:37–46.
- Froger N, Orellana JA, Cohen-Salmon M, Ezan P, Amigou E, Sáez JC, Giaume C. 2009. Cannabinoids prevent the opposite regulation of astroglial connexin43 hemichannels and gap junction channels induced by pro-inflammatory treatments. *Journal of Neurochemistry* 111:1383–1397.
- Fuller JP, Stavenhagen JB, Teeling JL. 2014. New roles for Fc receptors in neurodegeneration-the impact on Immunotherapy for Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience* 8:1–10.
- Furman CS, Gorelick-Feldman DA, Davidson KGV, Yasumura T, Neely JD, Agre P, Rash JE. 2003. Aquaporin-4 square array assembly: Opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:13609–13614.
- Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E. 2005. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 438:185–192.

Références

- Gaillard PJ, de Boer G, Breimer DD. 2003. Pharmacological investigations on lipopolysaccharide-induced permeability changes in the blood– brain barrier in vitro. *Microvascular Research*:24–31.
- Gajardo-Gómez R, Labra VC, Orellana JA. 2016. Connexins and Pannexins: New Insights into Microglial Functions and Dysfunctions. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9:1–19.
- Gankam Kengne F, Nicaise C, Soupart A, Boom A, Schiettecatte J, Pochet R, Brion JP, Decaux G. 2011. Astrocytes Are an Early Target in Osmotic Demyelination Syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology* 22:1834–1845.
- Garre JM, Retamal MA, Cassina P, Barbeito L, Bukauskas FF, Saez JC, Bennett MVL, Abudara V. 2010. FGF-1 induces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens pannexin and connexin hemichannels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:22659–22664.
- Gary DS, Malone M, Capestany P, Houdayer T, McDonald JW. 2012. Electrical stimulation promotes the survival of oligodendrocytes in mixed cortical cultures. *Journal of Neuroscience Research* 90:72–83.
- Gautier HOB, Evans KA, Volbracht K, James R, Sitnikov S, Lundgaard I, James F, Lao-Peregrin C, Reynolds R, Franklin RJM, Káradóttir RT. 2015. Neuronal activity regulates remyelination via glutamate signalling to oligodendrocyte progenitors. *Nature Communications* 6:1–15.
- Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. 2010. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nature Reviews Neuroscience* 11:87–99.
- Giaume C, Leybaert L, C. Naus C, C. Sáez J. 2013. Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Frontiers in Pharmacology* 4:1–17.
- Giaume C, Venance L. 1998. Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia* 24:50–64.
- Gibson EM, Purger D, Mount CW, Goldstein AK, Lin GL, Wood LS, Inema I, Miller SE, Bieri G, Zuchero JB, Barres BA, Woo PJ, Vogel H, Monje M. 2014. Neuronal Activity Promotes Oligodendrogenesis and Adaptive Myelination in the Mammalian Brain. *Science* 344:1252304–1252304.
- Gosejacob D, Dublin P, Bedner P, Hüttmann K, Zhang J, Tress O, Willecke K, Pfrieger F, Steinhäuser C, Theis M. 2011. Role of astroglial connexin30 in hippocampal gap junction coupling. *Glia* 59:511–519.
- Grygorowicz T, Wełniak-Kamińska M, Strużyńska L. 2016. Early P2X7R-related astrogliosis in autoimmune encephalomyelitis. *Molecular and Cellular Neuroscience* 74:1–9.
- Guo W, Wang H, Watanabe M, Shimizu K, Zou S, LaGraize SC, Wei F, Dubner R, Ren K. 2007. Glial-Cytokine-Neuronal Interactions Underlying the Mechanisms of Persistent Pain. *Journal of Neuroscience* 27:6006–6018.
- Guo X, Wang X-F. 2009. Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways. *Cell Research* 19:71–88.

Références

- Guo Y, Weigand SD, Popescu BF, Lennon VA, Parisi JE, Pittock SJ, Parks NE, Clardy SL, Howe CL, Lucchinetti CF. 2017. Pathogenic implications of cerebrospinal fluid barrier pathology in neuromyelitis optica. *Acta Neuropathologica* 133:597–612.
- Haghikia A, Ladage K, Lafênetre P, Haghikia A, Hinkerohe D, Smikalla D, Haase CG, Dermietzel R, Faustmann PM. 2008. Intracellular application of TNF-alpha impairs cell to cell communication via gap junctions in glioma cells. *Journal of Neuro-Oncology* 86:143–152.
- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. 2007a. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in Molecular Medicine* 13:54–63.
- Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong J-H, Haydon PG. 2007b. Synaptic Islands Defined by the Territory of a Single Astrocyte. *Journal of Neuroscience* 27:6473–6477.
- Hamby ME, Hewett JA, Hewett SJ. 2006. TGF- β 1 potentiates astrocytic nitric oxide production by expanding the population of astrocytes that express NOS-2. *Glia* 54:566–577.
- Harris A. 2007. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 94:120–143.
- Harris AL, Locke D. 2009. Permeability of Connexin Channels. In: Harris AL, Locke D, editors. *Connexins*. Totowa, NJ: Humana Press. p 165–206. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-489-6_7
- Hartfield EM, Rinaldi F, Glover CP, Wong L-F, Caldwell MA, Uney JB. 2011. Connexin 36 Expression Regulates Neuronal Differentiation from Neural Progenitor Cells. *PLoS ONE* 6:1–10.
- Hawkins BT. 2005. The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacological Reviews* 57:173–185.
- He D, Wu Q, Chen X, Zhao D, Gong Q, Zhou H. 2011. Cognitive impairment and whole brain diffusion in patients with neuromyelitis optica after acute relapse. *Brain and Cognition* 77:80–88.
- Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience* 16:358–372.
- Hertz L, Chen Y. 2016. Importance of astrocytes for potassium ion (K⁺) homeostasis in brain and glial effects of K⁺ and its transporters on learning. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 71:484–505.
- Hewett JA. 2009. Determinants of regional and local diversity within the astroglial lineage of the normal central nervous system. *Journal of Neurochemistry* 110:1717–1736.
- Higuchi O, Nakane S, Sakai W, Maeda Y, Niino M, Takahashi T, Fukazawa T, Kikuchi S, Fujihara K, Matsuo H. 2016. Lack of KIR4.1 autoantibodies in Japanese patients with MS and NMO. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation* 3:1–6.
- Hinkerohe D, Smikalla D, Haghikia A, Heupel K, Haase CG, Dermietzel R, Faustmann PM. 2005. Effects of cytokines on microglial phenotypes and astroglial coupling in an inflammatory coculture model. *Glia* 52:85–97.

Références

- Hinson SR, Clift IC, Luo N, Kryzer TJ, Lennon VA. 2017. Autoantibody-induced internalization of CNS AQP4 water channel and EAAT2 glutamate transporter requires astrocytic Fc receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114:5491–5496.
- Hinson SR, Lennon VA, Pittock SJ. 2016. Autoimmune AQP4 channelopathies and neuromyelitis optica spectrum disorders. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Vol. 133. Elsevier. p 377–403. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444634320000219>
- Hinson SR, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Roemer SF, Fryer JP, Kryzer TJ, Lennon VA. 2007. Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica. *Neurology* 69:2221–2231.
- Hinson SR, Roemer SF, Lucchinetti CF, Fryer JP, Kryzer TJ, Chamberlain JL, Howe CL, Pittock SJ, Lennon VA. 2008. Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating EAAT2. *Journal of Experimental Medicine* 205:2473–2481.
- Hinson SR, Romero MF, Popescu BFG, Lucchinetti CF, Fryer JP, Wolburg H, Fallier-Becker P, Noell S, Lennon VA. 2012. Molecular outcomes of neuromyelitis optica (NMO)-IgG binding to aquaporin-4 in astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:1245–1250.
- Howe CL, Kaptzan T, Magaña SM, Ayers-Ringler JR, LaFrance-Corey RG, Lucchinetti CF. 2014. Neuromyelitis optica IgG stimulates an immunological response in rat astrocyte cultures: NMO IgG Stimulates Astrocyte Reactivity. *Glia* 62:692–708.
- Huber KM. 2000. Role for Rapid Dendritic Protein Synthesis in Hippocampal mGluR-Dependent Long-Term Depression. *Science* 288:1254–1256.
- Hughes EG, Appel B. 2016. The cell biology of CNS myelination. *Current Opinion in Neurobiology* 39:93–100.
- Hyun J-W, Park G, Kwak K, Jo H-J, Joung A, Kim J-H, Lee SH, Kim S, Lee J-M, Kim S-H, Kim HJ. 2017. Deep gray matter atrophy in neuromyelitis optica spectrum disorder and multiple sclerosis. *European Journal of Neurology* 24:437–445.
- Iadecola C, Nedergaard M. 2007. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nature Neuroscience* 10:1369–1376.
- Ikeshima-Kataoka H, Abe Y, Yasui M. 2015. Aquaporin 4-Dependent expression of glial fibrillary acidic protein and tenascin-C in activated astrocytes in stab wound mouse brain and in primary culture: AQP4 Dependent Expression of GFAP/TN-C. *Journal of Neuroscience Research* 93:121–129.
- Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, Nagelhus EA, Nedergaard M. 2012. A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid. *Science Translational Medicine* 4:1–22.
- Ishibashi T, Dakin KA, Stevens B, Lee PR, Kozlov SV, Stewart CL, Fields RD. 2006. Astrocytes Promote Myelination in Response to Electrical Impulses. *Neuron* 49:823–832.

Références

- Isobe N, Yonekawa T, Matsushita T, Kawano Y, Masaki K, Yoshimura S, Fichna J, Chen S, Furmaniak J, Smith BR, Kira J. 2012. Quantitative assays for anti-aquaporin-4 antibody with subclass analysis in neuromyelitis optica. *Multiple Sclerosis Journal* 18:1541–1551.
- Jankowsky JL, Patterson PH. 1999. Cytokine and Growth Factor Involvement in Long-Term Potentiation. *Molecular and Cellular Neuroscience* 14:273–286.
- Jiang JX, Gu S. 2005. Gap junction- and hemichannel-independent actions of connexins. *Biochim Biophys Acta* 1711:208–214.
- John GR, Lee SC, Brosnan CF. 2003. Cytokines: Powerful Regulators of Glial Cell Activation. *The Neuroscientist* 9:10–22.
- John Lin C-C, Yu K, Hatcher A, Huang T-W, Lee HK, Carlson J, Weston MC, Chen F, Zhang Y, Zhu W, Mohila CA, Ahmed N, Patel AJ, Arenkiel BR, Noebels JL, Creighton CJ, Deneen B. 2017. Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs. *Nature Neuroscience* 20:396–405.
- Johnson AM, Roach JP, Hu A, Stamatovic SM, Zochowski MR, Keep RF, Andjelkovic AV. 2018. Connexin 43 gap junctions contribute to brain endothelial barrier hyperpermeability in familial cerebral cavernous malformations type III by modulating tight junction structure. *The FASEB Journal*:1–15.
- Johnson RG, Reynhout JK, TenBroek EM, Quade BJ, Yasumura T, Davidson KGV, Sheridan JD, Rash JE. 2012. Gap junction assembly: roles for the formation plaque and regulation by the C-terminus of connexin43. *Molecular Biology of the Cell* 23:71–86.
- Johnstone SR, Billaud M, Lohman AW, Taddeo EP, Isakson BE. 2012. Posttranslational Modifications in Connexins and Pannexins. *The Journal of Membrane Biology* 245:319–332.
- Kabba JA, Xu Y, Christian H, Ruan W, Chenai K, Xiang Y, Zhang L, Saavedra JM, Pang T. 2018. Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. *Cellular and Molecular Neurobiology* 38:53–71.
- Kanaporis G, Mese G, Valiuniene L, White TW, Brink PR, Valiunas V. 2008. Gap Junction Channels Exhibit Connexin-specific Permeability to Cyclic Nucleotides. *The Journal of General Physiology* 131:293–305.
- Kandler K, Katz LC. 1998. Coordination of Neuronal Activity in Developing Visual Cortex by Gap Junction-Mediated Biochemical Communication. *The Journal of Neuroscience* 18:1419–1427.
- Katakowski M, Buller B, Wang X, Rogers T, Chopp M. 2010. Functional MicroRNA Is Transferred between Glioma Cells. *Cancer Research* 70:8259–8263.
- Katoozi S, Skauli N, Rahmani S, Camassa LMA, Boldt HB, Ottersen OP, Amiry-Moghaddam M. 2017. Targeted deletion of Aqp4 promotes the formation of astrocytic gap junctions. *Brain Structure and Function* 222:3959–3972.
- Kelsell DP, Di W-L, Houseman MJ. Connexin Mutations in Skin Disease and Hearing Loss. *The American Journal of Human Genetics* 2001; 68: 559–568.

Références

- Khairova RA, Machado-Vieira R, Du J, Manji HK. 2009. A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 12:561.
- Khakh BS, Sofroniew MV. 2015. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nature Neuroscience* 18:942–952.
- Kidder GM, Winterhager E. 2015. Physiological roles of connexins in labour and lactation. *REPRODUCTION* 150:R129–R136.
- Kim KJ, Iddings JA, Stern JE, Blanco VM, Croom D, Kirov SA, Filosa JA. 2015. Astrocyte Contributions to Flow/Pressure-Evoked Parenchymal Arteriole Vasoconstriction. *Journal of Neuroscience* 35:8245–8257.
- Kim M-O, Suh H-S, Brosnan CF, Lee SC. 2004. Regulation of RANTES/CCL5 expression in human astrocytes by interleukin-1 and interferon-beta. *Journal of Neurochemistry* 90:297–308.
- Kim S-H, Kwak K, Jeong IH, Hyun J-W, Jo H-J, Joung A, Yu E-S, Kim J-H, Lee SH, Yun S, Joo J, Lee D, Lee J-M, Kim HJ. 2016. Cognitive impairment differs between neuromyelitis optica spectrum disorder and multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 22:1850–1858.
- Kim S-M, Kim S-J, Lee HJ, Kuroda H, Palace J, Fujihara K. 2017. Differential diagnosis of neuromyelitis optica spectrum disorders. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 10:265–289.
- Kimelberg HK. 2004. The problem of astrocyte identity. *Neurochemistry International* 45:191–202.
- Kimelberg HK. 2010. Functions of Mature Mammalian Astrocytes: A Current View. *The Neuroscientist* 16:79–106.
- Kira J. 2011. Autoimmunity in neuromyelitis optica and opticospinal multiple sclerosis: Astrocytopathy as a common denominator in demyelinating disorders. *Journal of the Neurological Sciences* 311:69–77.
- Kirkley KS, Popichak KA, Afzali MF, Legare ME, Tjalkens RB. 2017. Microglia amplify inflammatory activation of astrocytes in manganese neurotoxicity. *Journal of Neuroinflammation* 14:1–17.
- Kiray H, Lindsay SL, Hosseinzadeh S, Barnett SC. 2016. The multifaceted role of astrocytes in regulating myelination. *Experimental Neurology* 283:541–549.
- Kjenseth A, Fykerud TA, Sirnes S, Bruun J, Yohannes Z, Kolberg M, Omori Y, Rivedal E, Leithe E. 2012. The Gap Junction Channel Protein Connexin 43 Is Covalently Modified and Regulated by SUMOylation. *Journal of Biological Chemistry* 287:15851–15861.
- Klingseisen A, Lyons DA. 2018. Axonal Regulation of Central Nervous System Myelination: Structure and Function. *The Neuroscientist* 24:7–21.
- Koeglsperger T, Li S, Brenneis C, Saulnier JL, Mayo L, Carrier Y, Selkoe DJ, Weiner HL. 2013. Impaired glutamate recycling and GluN2B-mediated neuronal calcium overload in mice lacking TGF- β 1 in the CNS: Tgf- β 1 and hippocampal glutamate homeostasis. *Glia* 61:985–1002.

Références

- Koehler RC, Roman RJ, Harder DR. 2009. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends in Neurosciences* 32:160–169.
- Kofuji P, Newman EA. 2004. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129:1045–1056.
- Koulakoff A, Ezan P, Giaume C. 2008. Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes. *Glia* 56:1299–1311.
- Koval M. 2006. Pathways and control of connexin oligomerization. *Trends in Cell Biology* 16:159–166.
- Kristian Enkvist MO, McCarthy KD. 1994. Astroglial Gap Junction Communication Is Increased by Treatment with Either Glutamate or High K⁺ Concentration. *Journal of Neurochemistry* 62:489–495.
- Lambiase PD, Tinker A. 2015. Connexins in the heart. *Cell and Tissue Research* 360:675–684.
- Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG, Lau AF. 2000. Phosphorylation of Connexin43 on Serine368 by Protein Kinase C Regulates Gap Junctional Communication. *The Journal of Cell Biology* 149:1503–1512.
- Lancaster E. 2016. The Diagnosis and Treatment of Autoimmune Encephalitis. *Journal of Clinical Neurology* 12:1.
- Lapato AS, Tiwari-Woodruff SK. 2018. Connexins and pannexins: At the junction of neuro-glial homeostasis & disease. *Journal of Neuroscience Research* 96:31–44.
- Lapteva L, Nowak M, Yarboro CH, Takada K, Roebuck-Spencer T, Weickert T, Bleiberg J, Rosenstein D, Pao M, Patronas N, Steele S, Manzano M, van der Veen JWC, Lipsky PE, Marenco S, Wesley R, Volpe B, Diamond B, Illei GG. 2006. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor antibodies, cognitive dysfunction, and depression in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 54:2505–2514.
- Lassmann H. 2005. Mechanisms of multiple sclerosis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2:447–452.
- Lauf U, Giepmans BNG, Lopez P, Braconnot S, Chen S-C, Falk MM. 2002. Dynamic Trafficking and Delivery of Connexons to the Plasma Membrane and Accretion to Gap Junctions in Living Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:10446–10451.
- Lee S, Leach MK, Redmond SA, Chong SYC, Mellon SH, Tuck SJ, Feng Z-Q, Corey JM, Chan JR. 2012a. A culture system to study oligodendrocyte myelination processes using engineered nanofibers. *Nature Methods* 9:917–922.
- Lee S-W, Kim WJ, Choi YK, Song HS, Son MJ, Gelman IH, Kim Y-J, Kim K-W. 2003. SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nature Medicine* 9:900–906.
- Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang P-W, Pellerin L, Magistretti PJ, Rothstein JD. 2012b. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487:443–448.

Références

- Lennon VA. 2005. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *Journal of Experimental Medicine* 202:473–477.
- Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, Nakashima I, Weinshenker BG. 2004. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *The Lancet* 364:2106–2112.
- Leung DSY, Unsicker K, Reuss B. 2002. Expression and developmental regulation of gap junction connexins cx26, cx32, cx43 and cx45 in the rat midbrain-floor. *International Journal of Developmental Neuroscience* 20:63–75.
- Leybaert L. 2005. Neurobarrier Coupling in the Brain: A Partner of Neurovascular and Neurometabolic Coupling? *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 25:2–16.
- Li T, Giaume C, Xiao L. 2014. Connexins-Mediated Glia Networking Impacts Myelination and Remyelination in the Central Nervous System. *Molecular Neurobiology* 49:1460–1471.
- Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung W-S, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA. 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541:481–487.
- Liebmann M, Stahr A, Guenther M, Witte OW, Frahm C. 2013. Astrocytic Cx43 and Cx30 differentially modulate adult neurogenesis in mice. *Neuroscience Letters* 545:40–45.
- Lindner M, Thümmel K, Arthur A, Brunner S, Elliott C, McElroy D, Mohan H, Williams A, Edgar JM, Schuh C, Stadelmann C, Barnett SC, Lassmann H, Mücklich S, Mudaliar M, Schaeren-Wiemers N, Meinl E, Linington C. 2015. Fibroblast growth factor signalling in multiple sclerosis: inhibition of myelination and induction of pro-inflammatory environment by FGF9. *Brain* 138:1875–1893.
- Liu Y, Jiang X, Butzkueven H, Duan Y, Huang J, Ren Z, Dong H, Shi F-D, Barkhof F, Li K, Wang J. 2018. Multimodal characterization of gray matter alterations in neuromyelitis optica. *Multiple Sclerosis Journal* 24:1308–1316.
- Lleo A, Invernizzi P, Gao B, Podda M, Gershwin ME. 2010. Definition of human autoimmunity — autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews* 9:A259–A266.
- López-Corcuera B, Benito-Muñoz C, Aragón C. 2017. Glycine Transporters in Glia Cells: Structural Studies. In: Ortega A, Schousboe A, editors. *Glial Amino Acid Transporters*. Vol. 16. Cham: Springer International Publishing. p 13–32. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-55769-4_2
- Lowther DE, Hafler DA. 2012. Regulatory T cells in the central nervous system: Regulatory T cells in the brain. *Immunological Reviews* 248:156–169.
- Lubetzki C, Demerens C, Anglade P, Villarroya H, Frankfurter A, Lee VM, Zalc B. 1993. Even in culture, oligodendrocytes myelinate solely axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:6820–6824.

Références

- Lucchinetti CF. 2002. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* 125:1450–1461.
- Lucchinetti CF, Guo Y, Popescu BFGh, Fujihara K, Itoyama Y, Misu T. 2014. The Pathology of an Autoimmune Astrocytopathy: Lessons Learned from Neuromyelitis Optica: Autoimmune Astrocytopathy. *Brain Pathology* 24:83–97.
- Lundgaard I, Osório MJ, Kress BT, Sanggaard S, Nedergaard M. 2014. White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience* 276:161–173.
- Lüscher C, Huber KM. 2010. Group 1 mGluR-Dependent Synaptic Long-Term Depression: Mechanisms and Implications for Circuitry and Disease. *Neuron* 65:445–459.
- Lutz SE, Zhao Y, Gulinello M, Lee SC, Raine CS, Brosnan CF. 2009. Deletion of Astrocyte Connexins 43 and 30 Leads to a Dysmyelinating Phenotype and Hippocampal CA1 Vacuolation. *Journal of Neuroscience* 29:7743–7752.
- Mader S, Brimberg L, Diamond B. 2017. The Role of Brain-Reactive Autoantibodies in Brain Pathology and Cognitive Impairment. *Frontiers in Immunology* 8:1–10.
- Maeda S, Tsukihara T. 2011. Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68:1115–1129.
- Maglione M, Tress O, Haas B, Karram K, Trotter J, Willecke K, Kettenmann H. 2010. Oligodendrocytes in mouse corpus callosum are coupled via gap junction channels formed by connexin47 and connexin32. *Glia* 58:1104–1117.
- Magnotti LM, Goodenough DA, Paul DL. 2011. Deletion of oligodendrocyte Cx32 and astrocyte Cx43 causes white matter vacuolation, astrocyte loss and early mortality. *Glia* 59:1064–1074.
- Marignier R, Nicolle A, Watrin C, Touret M, Cavagna S, Varrin-Doyer M, Cavillon G, Rogemond V, Confavreux C, Honnorat J, Giraudon P. 2010. Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury. *Brain* 133:2578–2591.
- Marignier R, Ruiz A, Cavagna S, Nicole A, Watrin C, Touret M, Parrot S, Malleret G, Peyron C, Benetollo C, Auvergnon N, Vukusic S, Giraudon P. 2016. Neuromyelitis optica study model based on chronic infusion of autoantibodies in rat cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroinflammation* 13:1–15.
- Markoullis K, Sargiannidou I, Schiza N, Roncaroli F, Reynolds R, Kleopa KA. 2014. Oligodendrocyte Gap Junction Loss and Disconnection From Reactive Astrocytes in Multiple Sclerosis Gray Matter. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 73:865–879.
- Márquez-Rosado L, Solan JL, Dunn CA, Norris RP, Lampe PD. 2012. Connexin43 phosphorylation in brain, cardiac, endothelial and epithelial tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1818:1985–1992.
- Masaki K, Suzuki SO, Matsushita T, Matsuoka T, Imamura S, Yamasaki R, Suzuki M, Suenaga T, Iwaki T, Kira J-I. 2013. Connexin 43 Astrocytopathy Linked to Rapidly Progressive Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica. *PLoS ONE* 8:1–21.

Références

- Matiello M, Lennon VA, Jacob A, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Wingerchuk DM, Weinshenker BG. 2008. NMO-IgG predicts the outcome of recurrent optic neuritis. *Neurology* 70:2197–2200.
- Matsushita T, Isobe N, Matsuoka T, Ishizu T, Kawano Y, Yoshiura T, Ohyagi Y, Kira J. 2009. Extensive vasogenic edema of anti-aquaporin-4 antibody-related brain lesions. *Multiple Sclerosis Journal* 15:1113–1117.
- Matute C. 2011. Glutamate and ATP signalling in white matter pathology: White matter injury by neurotransmitters. *Journal of Anatomy* 219:53–64.
- Mayorquin LC, Rodriguez AV, Sutachan J-J, Albarracín SL. 2018. Connexin-Mediated Functional and Metabolic Coupling Between Astrocytes and Neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11:1–10.
- McKenzie IA, Ohayon D, Li H, Paes de Faria J, Emery B, Tohyama K, Richardson WD. 2014. Motor skill learning requires active central myelination. *Science* 346:318–322.
- McKinnon RL, Bolon ML, Wang H-X, Swarbreck S, Kidder GM, Simon AM, Tysl K. 2009. Reduction of electrical coupling between microvascular endothelial cells by NO depends on connexin37. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 297:H93–H101.
- Mei X, Ezan P, Giaume C, Koulakoff A. 2010. Astroglial connexin immunoreactivity is specifically altered at β -amyloid plaques in β -amyloid precursor protein/presenilin1 mice. *Neuroscience* 171:92–105.
- Même W, Calvo C-F, Froger N, Ezan P, Amigou E, Koulakoff A, Giaume C. 2006. Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by β -amyloid. *The FASEB Journal* 20:494–496.
- Même W, Ezan P, Venance L, Glowinski J, Giaume C. 2004. ATP-induced inhibition of gap junctional communication is enhanced by interleukin-1 β treatment in cultured astrocytes. *Neuroscience* 126:95–104.
- Meng H, Xu J, Pan C, Cheng J, Hu Y, Hong Y, Shen Y, Dai H. 2017. Cognitive dysfunction in adult patients with neuromyelitis optica: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology* 264:1549–1558.
- Menichella DM, Goodenough DA, Sirkowski E, Scherer SS, Paul DL. 2003. Connexins are critical for normal myelination in the CNS. *The Journal of neuroscience* 23:5963–5973.
- Menichella DM, Majdan M, Awatramani R, Goodenough DA, Sirkowski E, Scherer SS, Paul DL. 2006. Genetic and Physiological Evidence That Oligodendrocyte Gap Junctions Contribute to Spatial Buffering of Potassium Released during Neuronal Activity. *Journal of Neuroscience* 26:10984–10991.
- Meunier C, Wang N, Yi C, Dallerac G, Ezan P, Koulakoff A, Leybaert L, Giaume C. 2017. Contribution of Astroglial Cx43 Hemichannels to the Modulation of Glutamatergic Currents by D-Serine in the Mouse Prefrontal Cortex. *The Journal of Neuroscience* 37:9064–9075.
- Miron VE. 2017. Beyond immunomodulation: The regenerative role for regulatory T cells in central nervous system remyelination. *Journal of Cell Communication and Signaling* 11:191–192.

Références

- Misu T, Höftberger R, Fujihara K, Wimmer I, Takai Y, Nishiyama S, Nakashima I, Konno H, Bradl M, Garzuly F, Itoyama Y, Aoki M, Lassmann H. 2013. Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica. *Acta Neuropathologica* 125:815–827.
- Misu T, Takano R, Fujihara K, Takahashi T, Sato S, Itoyama Y. 2009. Marked increase in cerebrospinal fluid glial fibrillar acidic protein in neuromyelitis optica: an astrocytic damage marker. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 80:575–577.
- Moore CS, Abdullah SL, Brown A, Arulpragasam A, Crocker SJ. 2011. How factors secreted from astrocytes impact myelin repair. *Journal of Neuroscience Research* 89:13–21.
- Morgello S, Uson RR, Schwartz EJ, Haber RS. 1995. The human blood-brain barrier glucose transporter (GLUT1) is a glucose transporter of gray matter astrocytes. *Glia* 14:43–54.
- Mori M, Kuwabara S, Paul F. 2018. Worldwide prevalence of neuromyelitis optica spectrum disorders. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 89:555–556.
- Morita M, Saruta C, Kozuka N, Okubo Y, Itakura M, Takahashi M, Kudo Y. 2007. Dual regulation of astrocyte gap junction hemichannels by growth factors and a pro-inflammatory cytokine via the mitogen-activated protein kinase cascade. *Glia* 55:508–515.
- Murphy-Royal C, Dupuis JP, Varela JA, Panatier A, Pinson B, Baufreton J, Groc L, Oliet SHR. 2015. Surface diffusion of astrocytic glutamate transporters shapes synaptic transmission. *Nature Neuroscience* 18:219–226.
- Murugan M, Ling E-A, Kaur C. 2013. Dysregulated glutamate uptake by astrocytes causes oligodendroglia death in hypoxic periventricular white matter damage. *Molecular and Cellular Neuroscience* 56:342–354.
- Musil LS. 2000. Regulation of Connexin Degradation As a Mechanism to Increase Gap Junction Assembly and Function. *Journal of Biological Chemistry* 275:25207–25215.
- Nadarajah B, Jones AM, Evans WH, Parnavelas JG. 1997. Differential Expression of Connexins during Neocortical Development and Neuronal Circuit Formation. *The Journal of Neuroscience* 17:3096–3111.
- Nagasawa K, Chiba H, Fujita H, Kojima T, Saito T, Endo T, Sawada N. 2006. Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology* 208:123–132.
- Nagelhus EA, Ottersen OP. 2013a. Physiological Roles of Aquaporin-4 in Brain. *Physiological Reviews* 93:1543–1562.
- Nagelhus EA, Ottersen OP. 2013b. Physiological Roles of Aquaporin-4 in Brain. *Physiological Reviews* 93:1543–1562.
- Nagy JI, Dudek FE, Rash JE. 2004. Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Research Reviews* 47:191–215.

Références

- Nagy JI, Li W, Hertzberg EL, Marotta CA. 1996. Elevated connexin43 immunoreactivity at sites of amyloid plaques in alzheimer's disease. *Brain Research* 717:173–178.
- Namihira M, Nakashima K. 2013. Mechanisms of astrocytogenesis in the mammalian brain. *Current Opinion in Neurobiology* 23:921–927.
- Nash B, Ioannidou K, Barnett SC. 2011. Astrocyte phenotypes and their relationship to myelination: Astrocyte phenotypes and myelination. *Journal of Anatomy* 219:44–52.
- Navas-Madroñal M, Valero-Mut A, Martínez-Zapata MJ, Simón-Talero MJ, Figueroa S, Vidal-Fernández N, López-Góngora M, Escartín A, Querol L. 2017. Absence of antibodies against KIR4.1 in multiple sclerosis: A three-technique approach and systematic review. *PLOS ONE* 12:1–13.
- Nave K-A. 2010. Myelination and the trophic support of long axons. *Nature Reviews Neuroscience* 11:275–283.
- Neary JT, Kang Y, Willoughby KA, Ellis EF. 2003. Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase by Stretch-Induced Injury in Astrocytes Involves Extracellular ATP and P2 Purinergic Receptors. *The Journal of Neuroscience* 23:2348–2356.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. 2003. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences* 26:523–530.
- Negi N, Das BK. 2018. CNS: Not an immunoprivileged site anymore but a virtual secondary lymphoid organ. *International Reviews of Immunology* 37:57–68.
- Nelles E, Butzler C, Jung D, Temme A, Gabriel HD, Dahl U, Traub O, Stumpel F, Jungermann K, Zielasek J, Toyka KV, Dermietzel R, Willecke K. 1996. Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:9565–9570.
- Nerrant E, Salsac C, Charif M, Ayrignac X, Carra-Dalliere C, Castelnovo G, Goulabchand R, Tisseyre J, Raoul C, Eliaou J-F, Labauge P, Vincent T. 2014. Lack of confirmation of anti-inward rectifying potassium channel 4.1 antibodies as reliable markers of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 20:1699–1703.
- Neusch C, Rozengurt N, Jacobs RE, Lester HA, Kofuji P. 2001. Kir4.1 Potassium Channel Subunit Is Crucial for Oligodendrocyte Development and *In Vivo* Myelination. *The Journal of Neuroscience* 21:5429–5438.
- Nicchia GP, Srinivas M, Li W, Brosnan CF, Frigeri A, Spray DC. 2005. New possible roles for aquaporin-4 in astrocytes: cell cytoskeleton and functional relationship with connexin43. *The FASEB Journal* 19:1674–1676.
- Nicholson BJ, Weber PA, Cao F, Chang H-C, Lampe P, Goldberg G. 2000. The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33:369–378.

Références

- Nielsen MS, Nygaard Axelsen L, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou N-H. 2012. Gap Junctions. In: Terjung R, editor. *Comprehensive Physiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c110051>
- Nijland PG, Michailidou I, Witte ME, Mizee MR, van der Pol SMA, van het Hof B, Reijkerk A, Pellerin L, van der Valk P, de Vries HE, van Horssen J. 2014. Cellular distribution of glucose and monocarboxylate transporters in human brain white matter and multiple sclerosis lesions: Nutrient Transporters in Multiple Sclerosis. *Glia* 62:1125–1141.
- Niu J, Li T, Yi C, Huang N, Koulakoff A, Weng C, Li C, Zhao C-J, Giaume C, Xiao L. 2016. Connexin-based channels contribute to metabolic pathways in the oligodendroglial lineage. *Journal of Cell Science* 129:1902–1914.
- Norden DM, Trojanowski PJ, Villanueva E, Navarro E, Godbout JP. 2016. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge: Iba1 and GFAP Are Unreliable Activation Markers. *Glia* 64:300–316.
- Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. 1979. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Research* 161:303–310.
- Obara M, Szeliga M, Albrecht J. 2008. Regulation of pH in the mammalian central nervous system under normal and pathological conditions: Facts and hypotheses. *Neurochemistry International* 52:905–919.
- Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M. 2012. Heterogeneity of Astrocytic Form and Function. In: Milner R, editor. *Astrocytes*. Vol. 814. Totowa, NJ: Humana Press. p 23–45. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-452-0_3
- Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JHC, Wang F, Xu Q, Wyatt JD, Pilcher W, Ojemann JG, Ransom BR, Goldman SA, Nedergaard M. 2009. Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes. *Journal of Neuroscience* 29:3276–3287.
- Oliet SHR, Malenka RC, Nicoll RA. 1997. Two Distinct Forms of Long-Term Depression Coexist in CA1 Hippocampal Pyramidal Cells. *Neuron* 18:969–982.
- Orellana JA, Froger N, Ezan P, Jiang JX, Bennett MVL, Naus CC, Giaume C, Sáez JC. 2011. ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels: Astroglial hemichannels induce neuronal death. *Journal of Neurochemistry* 118:826–840.
- Orellana JA, Martinez AD, Retamal MA. 2013. Gap junction channels and hemichannels in the CNS: Regulation by signaling molecules. *Neuropharmacology* 75:567–582.
- Orthmann-Murphy JL, Enriquez AD, Abrams CK. 2007. Loss-of-function connexin47 mutations cause Pelizaeus- Merzbacher-like disease. *Molecular and Cellular Neuroscience* 34:629–641.
- Oyamada M, Oyamada Y, Takamatsu T. 2005. Regulation of connexin expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1719:6–23.

Références

- Ozog MA, Bernier SM, Bates DC, Chatterjee B, Lo CW, Naus CCG. 2004. The Complex of Ciliary Neurotrophic Factor-Ciliary Neurotrophic Factor Receptor \square Up-Regulates Connexin43 and Intercellular Coupling in Astrocytes via the Janus Tyrosine Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Pathway \square D. *Molecular Biology of the Cell* 15:4761–4774.
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet J-P, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SHR. 2006. Glia-Derived d-Serine Controls NMDA Receptor Activity and Synaptic Memory. *Cell* 125:775–784.
- Panatier A, Vallée J, Haber M, Murai KK, Lacaille J-C, Robitaille R. 2011. Astrocytes Are Endogenous Regulators of Basal Transmission at Central Synapses. *Cell* 146:785–798.
- Pannasch U, Freche D, Dallérac G, Ghézali G, Escartin C, Ezan P, Cohen-Salmon M, Benchenane K, Abudara V, Dufour A, Lübke JHR, Déglon N, Knott G, Holcman D, Rouach N. 2014. Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. *Nature Neuroscience* 17:549–558.
- Pannasch U, Vargova L, Reingruber J, Ezan P, Holcman D, Giaume C, Sykova E, Rouach N. 2011. Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:8467–8472.
- Papadopoulos MC, Verkman A. 2012. Aquaporin 4 and neuromyelitis optica. *The Lancet Neurology* 11:535–544.
- Park W-M, Wang Y, Park S, Denisova JV, Fontes JD, Belousov AB. 2011. Interplay of Chemical Neurotransmitters Regulates Developmental Increase in Electrical Synapses. *Journal of Neuroscience* 31:5909–5920.
- Pascual O. 2005. Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks. *Science* 310:113–116.
- Pekny M, Pekna M. 2014. Astrocyte Reactivity and Reactive Astroglia: Costs and Benefits. *Physiological Reviews* 94:1077–1098.
- Perea G, Navarrete M, Araque A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences* 32:421–431.
- Piccolino M, Neyton J, Gerschenfelds M. 1984. horizontal cells of the turtle retina. *The Journal of Neuroscience* 4:1–12.
- Pot C, Apetoh L, Kuchroo VK. 2011. Type 1 regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity. *Seminars in Immunology* 23:202–208.
- Qi G-J, Chen Q, Chen L-J, Shu Y, Bu L-L, Shao X-Y, Zhang P, Jiao F-J, Shi J, Tian B. 2016. Phosphorylation of Connexin 43 by Cdk5 Modulates Neuronal Migration During Embryonic Brain Development. *Molecular Neurobiology* 53:2969–2982.
- Ramanathan S, Mohammad S, Tantsis E, Nguyen TK, Merheb V, Fung VSC, White OB, Broadley S, Lechner-Scott J, Vucic S, Henderson APD, Barnett MH, Reddel SW, Brilot F, Dale RC. 2018. Clinical course, therapeutic responses and outcomes in relapsing MOG antibody-associated demyelination. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 89:127–137.

Références

- Raponi E, Agenes F, Delphin C, Assard N, Baudier J, Legraverend C, Deloulme J-C. 2007. S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia* 55:165–177.
- Rash JE. 2010. Molecular disruptions of the panglial syncytium block potassium siphoning and axonal saltatory conduction: pertinence to neuromyelitis optica and other demyelinating diseases of the central nervous system. *Neuroscience* 168:982–1008.
- Rash JE, Yasumura T, Davidson KGV, Furman CS, Dudek FE, Nagy JI. 2001. Identification of Cells Expressing Cx43, Cx30, Cx26, Cx32 and Cx36 in Gap Junctions of Rat Brain and Spinal Cord. *Cell Communication & Adhesion* 8:315–320.
- Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B, Sallusto F. 2009. C-C chemokine receptor 6–regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nature Immunology* 10:514–523.
- Retamal MA, Cortes CJ, Reuss L, Bennett MVL, Saez JC. 2006. S-nitrosylation and permeation through connexin 43 hemichannels in astrocytes: Induction by oxidant stress and reversal by reducing agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:4475–4480.
- Retamal MA, Froger N, Palacios-Prado N, Ezan P, Saez PJ, Saez JC, Giaume C. 2007a. Cx43 Hemichannels and Gap Junction Channels in Astrocytes Are Regulated Oppositely by Proinflammatory Cytokines Released from Activated Microglia. *Journal of Neuroscience* 27:13781–13792.
- Retamal MA, Schalper KA, Shoji KF, Bennett MVL, Saez JC. 2007b. Opening of connexin 43 hemichannels is increased by lowering intracellular redox potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:8322–8327.
- Reuss B, Leung DSY, Ohlemeyer C, Kettenmann H, Unsicker K. 2000. Regionally Distinct Regulation of Astroglial Neurotransmitter Receptors by Fibroblast Growth Factor-2. *Molecular and Cellular Neuroscience* 16:42–58.
- Reuss B, Unsicker K. 1998. Regulation of gap junction communication by growth factors from non-neural cells to astroglia: A brief review. *Glia* 24:32–38.
- Rizzo FR, Musella A, De Vito F, Fresegna D, Bullitta S, Vanni V, Guadalupi L, Stampanoni Bassi M, Buttari F, Mandolesi G, Centonze D, Gentile A. 2018. Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 β Modulate Synaptic Plasticity during Neuroinflammation. *Neural Plasticity* 2018:1–12.
- Robe PA, Rogister B, Merville M-P, Bours V. 2000. Growth regulation of astrocytes and C6 cells by TGF- β 1 : correlation with gap junctions. *NeuroReport* 11:2837–2841.
- Roemer SF, Parisi JE, Lennon VA, Benarroch EE, Lassmann H, Bruck W, Mandler RN, Weinshenker BG, Pittock SJ, Wingerchuk DM, Lucchinetti CF. 2007. Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Brain* 130:1194–1205.
- Rose CF, Verkhratsky A, Parpura V. 2013. Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease. *Biochemical Society Transactions* 41:1518–1524.

Références

- Rothhammer V, Quintana FJ. 2015. Control of autoimmune CNS inflammation by astrocytes. *Seminars in Immunopathology* 37:625–638.
- Rouach N, Calvo C-F, Duquennoy H, Glowinski J, Giaume C. 2004. Hydrogen peroxide increases gap junctional communication and induces astrocyte toxicity: Regulation by brain macrophages. *Glia* 45:28–38.
- Rouach N, Glowinski J, Giaume C. 2000. Activity-Dependent Neuronal Control of Gap-Junctional Communication in Astrocytes. *The Journal of Cell Biology* 149:1513–1526.
- Roux L, Benchenane K, Rothstein JD, Bonvento G, Giaume C. 2011. Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:18442–18446.
- Rowley M, Whittingham S. 2015. The Role of Pathogenic Autoantibodies in Autoimmunity. *Antibodies* 4:314–353.
- Rukstalis JM. 2003. Exocrine specific expression of Connexin32 is dependent on the basic helix-loop-helix transcription factor Mist1. *Journal of Cell Science* 116:3315–3325.
- Saadoun S, Waters P, Bell BA, Vincent A, Verkman AS, Papadopoulos MC. 2010. Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice. *Brain* 133:349–361.
- Sahraian MA, Radue E-W, Minagar A. 2013. Neuromyelitis Optica. *Neurologic Clinics* 31:139–152.
- Sargiannidou I, Vavlitou N, Aristodemou S, Hadjisavvas A, Kyriacou K, Scherer SS, Kleopa KA. 2009. Connexin32 Mutations Cause Loss of Function in Schwann Cells and Oligodendrocytes Leading to PNS and CNS Myelination Defects. *Journal of Neuroscience* 29:4736–4749.
- Sattler R, Rothstein JD. 2006. Regulation and Dysregulation of Glutamate Transporters. In: Sitte HH, Freissmuth M, editors. *Neurotransmitter Transporters*. Vol. 175. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. p 277–303. Available from: http://link.springer.com/10.1007/3-540-29784-7_14
- Scemes E, Giaume C. 2006. Astrocyte calcium waves: What they are and what they do. *Glia* 54:716–725.
- Schafer DP, Stevens B. 2013. Phagocytic glial cells: sculpting synaptic circuits in the developing nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 23:1034–1040.
- Scharfman HE, Binder DK. 2013. Aquaporin-4 water channels and synaptic plasticity in the hippocampus. *Neurochemistry International* 63:702–711.
- Schirmer L, Srivastava R, Kalluri SR, Böttinger S, Herwerth M, Carassiti D, Srivastava B, Gempt J, Schlegel J, Kuhlmann T, Korn T, Reynolds R, Hemmer B. 2014. Differential loss of KIR4.1 immunoreactivity in multiple sclerosis lesions: KIR4.1 Immunoreactivity in MS. *Annals of Neurology* 75:810–828.
- Schiza N, Sargiannidou I, Kagiava A, Karaiskos C, Nearchou M, Kleopa KA. 2015. Transgenic replacement of Cx32 in gap junction-deficient oligodendrocytes rescues the phenotype of a hypomyelinating leukodystrophy model. *Human Molecular Genetics* 24:2049–2064.

Références

- Schwartz JH. 2001. Protein Synthesis and Long-term Synaptic Plasticity. In: John Wiley & Sons, Ltd, editor. *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/npg.els.0000051>
- Schwartz M, Deczkowska A. 2016. Neurological Disease as a Failure of Brain–Immune Crosstalk: The Multiple Faces of Neuroinflammation. *Trends in Immunology* 37:668–679.
- Seifert G, Henneberger C, Steinhäuser C. 2018. Diversity of astrocyte potassium channels: An update. *Brain Research Bulletin* 136:26–36.
- Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C. 2006. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nature Reviews Neuroscience* 7:194–206.
- Serwanski DR, Jukkola P, Nishiyama A. 2017. Heterogeneity of astrocyte and NG2 cell insertion at the node of ranvier: Frequency of glial insertion at the node. *Journal of Comparative Neurology* 525:535–552.
- de Seze J, Arndt C, Jeanjean L, Zephir H, Blanc F, Labauge P, Bouyon M, Ballonzoli L, Fleury M, Vermersch P, Speeg C. 2008. relapsing inflammatory optic neuritis: is it neuromyelitis optica? *Neurology* 70:2075–2076.
- Sharma R, Fischer M-T, Bauer J, Felts PA, Smith KJ, Misu T, Fujihara K, Bradl M, Lassmann H. 2010. Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination. *Acta Neuropathologica* 120:223–236.
- Shimizu F, Sano Y, Takahashi T, Haruki H, Saito K, Koga M, Kanda T. 2012. Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood–brain barrier. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 83:288–297.
- Shivers RR, McVicar LK. 1995. Gap junctions revealed by freeze-fracture electron microscopy. *Microscopy Research and Technique* 31:437–445.
- Siddoway B, Hou H, Xia H. 2011. Glutamatergic Synapses: Molecular Organisation. In: John Wiley & Sons, Ltd, editor. *eLS*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470015902.a0000235.pub2>
- Silver J, Miller JH. 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nature Reviews Neuroscience* 5:146–156.
- Simard M, Nedergaard M. 2004. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129:877–896.
- Simon AM, Goodenough DA. 1998. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends in Cell Biology* 8:477–483.
- Simons M, Nave K-A. 2016. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8:1–15.
- Simons M, Trajkovic K. 2006. Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *Journal of Cell Science* 119:4381–4389.

Références

- Skucas VA, Mathews IB, Yang J, Cheng Q, Treister A, Duffy AM, Verkman AS, Hempstead BL, Wood MA, Binder DK, Scharfman HE. 2011. Impairment of Select Forms of Spatial Memory and Neurotrophin-Dependent Synaptic Plasticity by Deletion of Glial Aquaporin-4. *Journal of Neuroscience* 31:6392–6397.
- Sofroniew MV. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences* 32:638–647.
- Sofroniew MV, Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica* 119:7–35.
- Sohl G. 2004. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research* 62:228–232.
- Solan JL, Lampe PD. 2005. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1711:154–163.
- Solan JL, Lampe PD. 2009. Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochemical Journal* 419:261–272.
- Sorensen A, Moffat K, Thomson C, Barnett SC. 2008. Astrocytes, but not olfactory ensheathing cells or Schwann cells, promote myelination of CNS axons in vitro. *Glia* 56:750–763.
- Stehberg J, Moraga-Amaro R, Salazar C, Becerra A, Echeverría C, Orellana JA, Bultynck G, Ponsaerts R, Leybaert L, Simon F, Sáez JC, Retamal MA. 2012. Release of gliotransmitters through astroglial connexin 43 hemichannels is necessary for fear memory consolidation in the basolateral amygdala. *The FASEB Journal* 26:3649–3657.
- Stellwagen D, Malenka RC. 2006. Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature* 440:1054–1059.
- Stevens B, Porta S, Haak LL, Gallo V, Fields RD. 2002. Adenosine: a neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron* 36:855–868.
- Storoni M, Petzold A, Plant GT. 2011. The Use of Serum Glial Fibrillary Acidic Protein Measurements in the Diagnosis of Neuromyelitis Optica Spectrum Optic Neuritis. *PLoS ONE* 6:1–6.
- Straub AC, Billaud M, Johnstone SR, Best AK, Yemen S, Dwyer ST, Looft-Wilson R, Lysiak JJ, Gaston B, Palmer L, Isakson BE. 2011. Compartmentalized Connexin 43 S-Nitrosylation/Denitrosylation Regulates Heterocellular Communication in the Vessel Wall. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31:399–407.
- Su P, Zhang J, Wang D, Zhao F, Cao Z, Aschner M, Luo W. 2016. The role of autophagy in modulation of neuroinflammation in microglia. *Neuroscience* 319:155–167.
- Su V, Lau AF. 2014. Connexins: Mechanisms regulating protein levels and intercellular communication. *FEBS Letters* 588:1212–1220.
- Swayne LA, Bennett SAL. 2016. Connexins and pannexins in neuronal development and adult neurogenesis. *BMC Cell Biology* 17(Suppl1):1–11.
- Takahashi DK, Vargas JR, Wilcox KS. 2010. Increased coupling and altered glutamate transport currents in astrocytes following kainic-acid-induced status epilepticus. *Neurobiology of Disease* 40:573–585.

Références

- Tang Y, Le W. 2016. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology* 53:1181–1194.
- Theis M, Jauch R, Zhuo L, Speidel D, Wallraff A, Döring B, Frisch C, Söhl G, Teubner B, Euwens C, Huston J, Steinhäuser C, Messing A, Heinemann U, Willecke K. 2003. Accelerated Hippocampal Spreading Depression and Enhanced Locomotory Activity in Mice with Astrocyte-Directed Inactivation of Connexin43. *The Journal of Neuroscience* 23:766–776.
- Tohidpour A, Morgun AV, Boitsova EB, Malinovskaya NA, Martynova GP, Khilazheva ED, Kopylevich NV, Gertsog GE, Salmina AB. 2017. Neuroinflammation and Infection: Molecular Mechanisms Associated with Dysfunction of Neurovascular Unit. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7:1–17.
- Tomizawa Y, Yokoyama K, Saiki S, Takahashi T, Matsuoka J, Hattori N. 2012. Blood–Brain Barrier Disruption is More Severe in Neuromyelitis Optica than in Multiple Sclerosis and Correlates with Clinical Disability. *Journal of International Medical Research* 40:1483–1491.
- Torres A, Wang F, Xu Q, Fujita T, Dobrowolski R, Willecke K, Takano T, Nedergaard M. 2012. Extracellular Ca²⁺ Acts as a Mediator of Communication from Neurons to Glia. *Science Signaling* 5:1–23.
- Tourdias T, Dragonu I, Fushimi Y, Deloire MSA, Boiziau C, Brochet B, Moonen C, Petry KG, Dousset V. 2009. Aquaporin 4 correlates with apparent diffusion coefficient and hydrocephalus severity in the rat brain: A combined MRI–histological study. *NeuroImage* 47:659–666.
- Tourdias T, Mori N, Dragonu I, Cassagno N, Boiziau C, Aussudre J, Brochet B, Moonen C, Petry KG, Dousset V. 2011. Differential aquaporin 4 expression during edema build-up and resolution phases of brain inflammation. *Journal of Neuroinflammation* 8:143.
- Traiffort E, Zakaria M, Laouarem Y, Ferent J. 2016. Hedgehog: A Key Signaling in the Development of the Oligodendrocyte Lineage. *Journal of Developmental Biology* 4:28.
- Tress O, Maglione M, May D, Pivneva T, Richter N, Seyfarth J, Binder S, Zlomuzica A, Seifert G, Theis M, Dere E, Kettenmann H, Willecke K. 2012. Panglial Gap Junctional Communication is Essential for Maintenance of Myelin in the CNS. *Journal of Neuroscience* 32:7499–7518.
- Van Bockstaele EJ, Garcia-Hernandez F, Fox K, Alvarez VA, Williams JT. 2004. Expression of connexins during development and following manipulation of afferent input in the rat locus coeruleus. *Neurochemistry International* 45:421–428.
- Varley J, Taylor J, Irani SR. 2018. Autoantibody-mediated diseases of the CNS: Structure, dysfunction and therapy. *Neuropharmacology* 132:71–82.
- Verkhatsky A, Nedergaard M. 2018. Physiology of Astroglia. *Physiological Reviews* 98:239–389.
- Verkhatsky A, Steardo L, Parpura V, Montana V. 2016. Translational potential of astrocytes in brain disorders. *Progress in Neurobiology* 144:188–205.
- Verkman AS, Ratelade J, Rossi A, Zhang H, Tradtrantip L. 2011. Aquaporin-4: orthogonal array assembly, CNS functions and role in neuromyelitis optica. *Acta Pharmacologica Sinica* 32:702–710.

Références

- Vicario N, Zappalà A, Calabrese G, Gulino R, Parenti C, Gulisano M, Parenti R. 2017. Connexins in the Central Nervous System: Physiological Traits and Neuroprotective Targets. *Frontiers in Physiology* 8:1–7.
- Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. 2014. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology* 5:1–17.
- Vincent A. 2013. Developments in autoimmune channelopathies. *Autoimmunity Reviews* 12:678–681.
- Vincent T, Saikali P, Cayrol R, Roth AD, Bar-Or A, Prat A, Antel JP. 2008. Functional Consequences of Neuromyelitis Optica-IgG Astrocyte Interactions on Blood-Brain Barrier Permeability and Granulocyte Recruitment. *The Journal of Immunology* 181:5730–5737.
- Vodovar D, Duchêne A, Wimberley C, Leroy C, Pottier G, Dauvilliers Y, Giaume C, Lin J-S, Mouthon F, Tournier N, Charvériat M. 2018. Cortico-Amygdala-Striatal Activation by Modafinil/Flecainide Combination. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 21:687–696.
- Wallraff A. 2006. The Impact of Astrocytic Gap Junctional Coupling on Potassium Buffering in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience* 26:5438–5447.
- Walrave L, Vinken M, Albertini G, De Bundel D, Leybaert L, Smolders IJ. 2016. Inhibition of Connexin43 Hemichannels Impairs Spatial Short-Term Memory without Affecting Spatial Working Memory. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 10:1–10.
- Wan CK, O’Carroll SJ, Kim S-L, Green CR, Nicholson LFB. 2013. Spatiotemporal changes in Cx30 and Cx43 expression during neuronal differentiation of P19 EC and NT2/D1 cells: Cx30 and Cx43 during neuronal differentiation. *Cell Biology International Reports* 20:13–23.
- Wang Y, Cheng X, He Q, Zheng Y, Kim DH, Whittemore SR, Cao QL. 2011. Astrocytes from the Contused Spinal Cord Inhibit Oligodendrocyte Differentiation of Adult Oligodendrocyte Precursor Cells by Increasing the Expression of Bone Morphogenetic Proteins. *Journal of Neuroscience* 31:6053–6058.
- Wang Y, Mehta PP, Rose Birgit. 1995. Inhibition of Glycosylation Induces Formation of Open Connexin-43 Cell-to-Cell Channels and Phosphorylation and Triton X-100 Insolubility of Connexin-43. *Journal of Biological Chemistry* 270:26581–26585.
- Wang Y, Rose B. 1995. Clustering of Cx43 cell-to-cell channels into gap junction plaques: regulation by cAMP and microfilaments. *J Cell Sci* 108:3501–3508.
- Wang Y, Wu Z, Liu X, Fu Q. 2013. Gastrodin ameliorates Parkinson’s disease by downregulating connexin 43. *Molecular Medicine Reports* 8:585–590.
- Wang Y, Zhang B, Dai Y, Yang Y, Lu Z. 2017. Cognitive dysfunction and behavioral abnormalities in neuromyelitis optica spectrum disorder: report of a case with cortical gray matter involvement and frontotemporal atrophy. *Acta Neurologica Belgica* 117:409–411.
- Waxman SG. 1986. The astrocyte as a component of the node of Ranvier. *Trends in Neurosciences* 9:250–253.

Références

- Weber MS, Derfuss T, Metz I, Brück W. 2018. Defining distinct features of anti-MOG antibody associated central nervous system demyelination. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 11:1–15.
- Webster H de F, Shii H, Lassmann H. 1985. Immunocytochemical study of myelin-associated glycoprotein (MAG), basic protein (BP), and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis (EAE). *Acta Neuropathologica* 65:177–189.
- Weinshenker BG, Wingerchuk DM, Vukusic S, Linbo L, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Lennon VA. 2006. Neuromyelitis optica IgG predicts relapse after longitudinally extensive transverse myelitis. *Annals of Neurology* 59:566–569.
- Weiss A, Attisano L. 2013. The TGFbeta Superfamily Signaling Pathway: TGFbeta Superfamily Signaling Pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 2:47–63.
- Weissman TA, Riquelme PA, Ivic L, Flint AC, Kriegstein AR. 2004. Calcium Waves Propagate through Radial Glial Cells and Modulate Proliferation in the Developing Neocortex. *Neuron* 43:647–661.
- Wilhelmsson U. 2004. Absence of Glial Fibrillary Acidic Protein and Vimentin Prevents Hypertrophy of Astrocytic Processes and Improves Post-Traumatic Regeneration. *Journal of Neuroscience* 24:5016–5021.
- Wilkins A, Chandran S, Compston A. 2001. A role for oligodendrocyte-derived IGF-1 in trophic support of cortical neurons. *Glia* 36:48–57.
- Williams SM, Sullivan RKP, Scott HL, Finkelstein DI, Colditz PB, Lingwood BE, Dodd PR, Pow DV. 2005. Glial glutamate transporter expression patterns in brains from multiple mammalian species. *Glia* 49:520–541.
- Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, de Seze J, Fujihara K, Greenberg B, Jacob A, Jarius S, Lana-Peixoto M, Levy M, Simon JH, Tenenbaum S, Traboulsee AL, Waters P, Wellik KE, Weinshenker BG. 2015. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* 85:177–189.
- Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. 2006. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 66:1485–1489.
- Xin W, Bonci A. 2018. Functional Astrocyte Heterogeneity and Implications for Their Role in Shaping Neurotransmission. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12:1–7.
- Xing L, Yang T, Cui S, Chen G. 2019. Connexin Hemichannels in Astrocytes: Role in CNS Disorders. *Front Mol Neurosci* 12:1–10.
- Yang X, Xu H, Ding M, Huang Q, Chen B, Yang H, Liu T, Long Y, Gao C. 2018. Overlapping Autoimmune Syndromes in Patients With Glial Fibrillary Acidic Protein Antibodies. *Frontiers in Neurology* 9:251.
- Yang Y, Higashimori H, Morel L. 2013. Developmental maturation of astrocytes and pathogenesis of neurodevelopmental disorders. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 5:1–8.

Références

- Yi C, Ezan P, Fernández P, Schmitt J, Sáez JC, Giaume C, Koulakoff A. 2017. Inhibition of glial hemichannels by boldine treatment reduces neuronal suffering in a murine model of Alzheimer's disease: Yi et al. *Glia* 65:1607–1625.
- Yuste R, Nelson DA, Rubin WW, Katz LC. 1995. Neuronal domains in developing neocortex: Mechanisms of coactivation. *Neuron* 14:7–17.
- Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA. 2012. Genomic Analysis of Reactive Astroglia. *Journal of Neuroscience* 32:6391–6410.
- Zhang H, Li P, Wu D, Xu D, Hou Y, Wang Q, Li M, Li Y, Zeng X, Zhang F, Shi Q. 2015. Serum IgG Subclasses in Autoimmune Diseases: *Medicine* 94:1–6.
- Zhao Y, Xin Y, He Z, Hu W. 2018. Function of Connexins in the Interaction between Glial and Vascular Cells in the Central Nervous System and Related Neurological Diseases. *Neural Plasticity* 2018:1–13.
- Zhong R, Liang J, Tao A, Wu L, Yang X, Xu H, Huang Q, Zhuang S, Long Y, Gao C. 2016. Anti-KIR4.1 Antibodies in Chinese Patients with Central Nervous System Inflammatory Demyelinating Disorders. *Neuroimmunomodulation* 23:295–300.
- Zhou JZ, Jiang JX. 2014. Gap junction and hemichannel-independent actions of connexins on cell and tissue functions - An update. *FEBS Letters* 588:1186–1192.
- Zhu X, Wei D, Chen O, Zhang Z, Xue J, Huang S, Zhu W, Wang Y. 2016. Upregulation of CCL3/MIP-1alpha regulated by MAPKs and NF-kappaB mediates microglial inflammatory response in LPS-induced brain injury. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 76:304–317.
- Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M. 2006. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nature Neuroscience* 9:268–275.

Résumé

La Neuromyéélite Optique (NMO) est une maladie auto-immune démyélinisante, rare et grave, du système nerveux central (SNC). Elle est caractérisée par une démyélinisation et une perte axonale ciblant principalement le nerf optique et la moelle épinière. La découverte d'un auto-anticorps (IgG-NMO) dirigé contre l'aquaporine-4 (AQP4), un canal hydrique exprimé par l'astrocyte, a été une étape clé dans la compréhension de la physiopathologie de la NMO, actuellement définie comme une astrocytopathie. La pathogénicité de l'IgG-NMO a été démontrée : il induit une internalisation d'AQP4 et des transporteurs au glutamate, provoquant une altération de la fonction astrocytaire. Cependant les mécanismes permettant de lier la dysfonction astrocytaire aux altérations caractéristiques de la NMO, notamment la démyélinisation, restent méconnus.

Les astrocytes sont des cellules gliales essentielles à l'établissement et au maintien de l'homéostasie du SNC. Ils permettent la régulation des flux hydriques et ioniques, le contrôle extracellulaire des neuromédiateurs ainsi que l'apport de métabolites énergétiques aux neurones et aux oligodendrocytes. Ils sont aussi caractérisés par une très forte expression de connexines (Cx), des molécules transmembranaires s'assemblant sous une forme hexamérique : le connexon. Les connexines forment soit des hémicanaux, permettant l'échange de petites molécules entre les milieux intra- et extra-cellulaires, soit des jonctions communicantes par la juxtaposition de connexons appartenant à deux cellules, assurant le couplage intercellulaire avec le passage de petites molécules et d'ions (ATP, glutamate, lactate, calcium). Les fonctions *hémicanal* et *jonction communicante* sont fortement régulées en condition physiologique et altérées en condition pathologique, notamment en contexte neuroinflammatoire.

Nous émettons l'hypothèse que les IgG-NMO altèrent l'expression et la fonction des connexines, et conduisent ainsi à la production d'un environnement toxique pour les oligodendrocytes et la myéline, et délétère pour le fonctionnement neuronal.

Mon projet de thèse avait trois objectifs : i) la caractérisation du phénotype astrocytaire induit par les IgG-NMO ; ii) l'identification d'altérations des connexines et leur implication dans la pathologie ; iii) la mise en évidence d'altérations de la transmission synaptique induites par les IgG-NMO et l'implication de connexines dans cet effet.

Des modèles de cultures primaires gliales traitées par des IgG-NMO issue d'une cohorte de patients m'ont permis de caractériser le phénotype acquis par les astrocytes, et de proposer le concept d'un astrocyte réactif spécifique de pathologie. Les astrocytes réactifs spécifiques de la NMO induisent un milieu inflammatoire spécifique et toxique, provoquant une démyélinisation. Grâce au développement d'une co-culture gliale et neuronale produisant des neurones myélinisés, et à l'utilisation de peptides inhibiteurs des Cx, j'ai pu montrer que les NMO-IgG ont un effet démyélinisant et que celui-ci implique les Cx. La démyélinisation est en effet associée à des modifications structurales et fonctionnelles des Cx astrocytaires, observées à la fois *in vitro* et dans notre modèle *in vivo*, le rat-NMO. Enfin, la mise en place d'une étude électrophysiologique en potentiel de champs local sur des tranches d'hippocampe de rats m'a permis d'étudier l'effet des IgG-NMO sur la transmission glutamatergique basale. J'ai pu mettre en évidence un effet dépresseur des IgG-NMO, partiellement bloqué par un inhibiteur de connexines, la carbenoxolone.

Comme il a déjà été démontré par des études cliniques dans des pathologies neurodégénératives, l'utilisation de modulateurs de Cx semble être une voie thérapeutique prometteuse afin de prévenir la démyélinisation et les altérations du fonctionnement neuronal de la NMO.