



HAL
open science

Effet de la stimulation magnétique répétitive trans-spinale comme thérapie non invasive dans le cadre des lésions médullaires.

Chaima Chalfouh

► **To cite this version:**

Chaima Chalfouh. Effet de la stimulation magnétique répétitive trans-spinale comme thérapie non invasive dans le cadre des lésions médullaires.. Sciences agricoles. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMR099 . tel-03194497

HAL Id: tel-03194497

<https://theses.hal.science/tel-03194497>

Submitted on 9 Apr 2021

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

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



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'université de Rouen Normandie

Effet de la stimulation magnétique répétitive trans-spinale comme thérapie non invasive dans le cadre des lésions médullaires

**Présentée et soutenue par
Chaima CHALFOUH**

**Thèse soutenue publiquement le 15/12/2020
devant le jury composé de**

Mr Olivier RAINETEAU	DR, Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur
Mme Geneviève ROUGON	DR, Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
Mr Jean Philippe HUGNOT	PR, Université Montpellier 2	Examineur
Mme Catalina ABAD-RABAT	IR, HDR, Université de Rouen Normandie	Examineur
Mr Nicolas GUEROUT	MCF, HDR, Université de Rouen Normandie	Examineur, Directeur de thèse
Mr Jean-Paul MARIE	PU-PH, Université de Rouen Normandie	Examineur, Codirecteur de thèse

Thèse dirigée par le Dr Nicolas GUEROUT et co-dirigée par le Pr Jean-Paul MARIE, EA3830, GRHV



A mon bébé Jad

Maman, Papa, Yassine

Anes et Nouha

« Persévérance, secret de tous les triomphes »

Victor Hugo

Remerciement du jury de thèse

Je voudrais tout d'abord remercier mes directeurs de thèse, Messieurs Jean-Paul Marie et Nicolas GUEROUT, pour toute leur aide. Je suis ravi d'avoir travaillé en leur compagnie car outre leurs appuis scientifiques, ils ont toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse.

Je tiens à remercier Madame Geneviève ROUGON et Monsieur Olivier RAINETEAU, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi que ma gratitude à Madame Catalina ABAD-RABAT et Monsieur Jean Philippe HUGNOT, qui ont bien voulu être examinateurs.

Table des matières

Table des figures	5
Table des abréviations	9
Avant-Propos	15
Introduction	19
1 Organisation générale de la moelle spinale	21
1.1 Morphogenèse spinale	22
1.2 Anatomie spinale	26
1.2.1 Morphologie externe	26
1.2.2 Morphologie interne	30
1.2.2.1 La substance grise	30
1.2.2.2 La substance blanche	30
1.2.2.3 Le canal central	32
1.2.3 Vascularisation médullaire	33
1.2.3.1 La vascularisation artérielle	33
1.2.3.2 La vascularisation intraspinale	33
2 Cartographie cellulaire de la moelle spinale	37
2.1 Cytogenèse de la moelle spinale	38
2.1.1 La neurogenèse au cours du développement spinal	38
2.1.2 Le neurone	39
2.1.2.1 Classification structurale	40
2.1.2.2 Classification fonctionnelle	41
2.1.3 Les cellules gliales	41

2.1.3.1	Les Oligodendrocytes	42
2.1.3.2	Les astrocytes	45
2.1.3.3	Les cellules épendymaires	46
3	Les traumatismes médullaires : une physiopathologie complexe et évolutive	55
3.1	La Lésion médullaire	56
3.1.1	Complication	57
3.1.2	Évaluation clinique initiale	58
3.1.3	La prise en charge	59
3.2	La physiopathologie de la lésion médullaire traumatique	60
3.2.1	La phase primaire	60
3.2.2	La phase secondaire	61
3.2.2.1	La phase immédiate ($\leq 2h$)	61
3.2.2.2	La phase aigüe (2h - 2 semaines)	62
3.2.2.3	La Phase Intermédiaire (2 semaines - 6 mois)	64
3.2.2.4	La phase chronique (≥ 6 mois)	65
4	La réactivité cellulaire en réponse à un traumatisme médullaire	67
4.1	La cicatrice médullaire	68
4.2	La composition cellulaire de la cicatrice médullaire	70
4.2.1	La cicatrice fibrotique : le cœur de la lésion	70
4.2.2	La cicatrice gliale	71
4.2.2.1	L'astrogliose	71
4.2.2.2	Les précurseurs oligodendrocytaires : OPC -NG2	73
4.2.3	La zone neurale réactive : le tissu sain	75
4.3	Le double rôle de la cicatrice médullaire	76
4.3.1	Le rôle inhibiteur	76
4.3.1.1	La cicatrice médullaire : une barrière physique à la repousse axonale	76
4.3.1.2	La cicatrice gliale, principal producteur des protéoglycanes	76
4.3.1.3	Le caractère neurotoxique des populations astrocytaires formant la cicatrice	77
4.3.2	Le rôle permissif	78
4.3.2.1	Le rôle immunomodulateur de la cicatrice gliale	78
4.3.2.2	Blocage de la propagation de la zone fibrotique	78
4.4	La cicatrice médullaire : potentielle cible thérapeutique	79

4.5	La réactivité des cellules souches endogènes à la suite de la lésion	80
5	Les stratégies thérapeutiques et leurs cibles	85
5.1	Approche neuroprotectrice	86
5.2	Approches neurorégénératives	87
5.2.1	Approche pharmacologique	87
5.2.2	La thérapie cellulaire	88
5.2.2.1	Les cellules gliales olfactives (CGO)	89
5.2.3	La neurostimulation	90
5.2.3.1	Les techniques de stimulation à caractère invasif	91
5.2.3.2	Les techniques de stimulation à caractère non invasif	94
6	Les mécanismes neurobiologiques sous-tendants à l'effet thérapeutique de la stimulation électromagnétique	99
6.1	Les effets neurobiologiques de la stimulation électromagnétique	100
6.1.1	L'effet neurotrophique de la SEM	101
6.1.1.1	L'effet de la stimulation sur les cellules souches neurales	101
6.1.2	L'effet neuroprotecteur de la SEM	103
6.1.2.1	L'effet de la SEM sur la survie et la maturation des oligodendrocytes :	103
6.1.2.2	L'effet anti-apoptotique de la stimulation électromagnétique	104
6.1.2.3	L'effet immunomodulateur de la SEM sur le stress oxydatif et la neuroinflammation	105
6.1.3	L'effet neurorégénératif de la SEM au niveau médullaire	106
	Objectifs de Thèse	109
	Article de thèse	113
	Publications et discussions	115
6.2	Préambule	116
6.3	Article I	117
6.4	Article II	121
6.5	Projet III	125
	Discussion de thèse	129
	Conclusion et perspectives	139

Table des figures

1.1	Le système nerveux	23
1.2	Développement embryonnaire du SNC humain	23
1.3	La neurulation	25
1.4	Le développement des couches du tube neural de la moelle spinale	25
1.5	Le Développement segmentaire de la moelle spinale	25
1.6	Illustrations descriptives de la colonne vertébrale humaine et souris adulte . . .	27
1.7	La croissance différentielle de la moelle spinale et de la colonne vertébrale durant le développement	27
1.8	Illustration descriptive des différentes méninges spinales présentes au sein de la moelle spinale	29
1.9	Représentation schématique des différents segments spinaux de la moelle spinale	29
1.10	Illustration descriptive des racines spinales	31
1.11	Organisation de la substance grise de la moelle spinale	31
1.12	Représentation schématique de la morphologie interne d'une coupe transversale d'une moelle spinale	31
1.13	Représentation schématique du canal central de la moelle spinale	32
1.14	Organisation générale de la vascularisation artérielle de la moelle spinale	34
1.15	Organisation générale de la vascularisation intra spinale	35
2.1	Représentation schématique des zones d'émergence des neurones durant le développement	39
2.2	Structure d'un neurone	40
2.3	Les différents types de neurones selon leurs structures dans la moelle spinale .	41
2.4	Représentation schématique du développement des oligodendrocytes (OL) et des différents stades de maturation	43

2.5	Représentation schématique des zones d'émergence des cellules précurseurs des oligodendrocytes durant le développement	43
2.6	Représentation schématique des différentes étapes de maturation des oligodendrocytes	44
2.7	Localisation des astrocytes fibreux et protoplasmiques au niveau de la moelle spinale	45
2.8	Représentation schématique des zones d'émergence des astrocytes durant le développement	46
2.9	Représentation schématique des zones d'émergence des cellules épendymaires du canal central de la moelle spinale	47
2.10	Composition cellulaire du canal central de la moelle spinale : On distingue quatre types de cellules au niveau du canal central	48
2.11	Identité moléculaire des cellules du canal central de la moelle spinale	48
2.12	Représentation schématique de la distribution de l'expression de FoxJ1 selon l'axe dorso-ventral de la moelle spinale durant le développement de E10.5 à P2	50
2.13	La mise en évidence du potentiel souche de la moelle spinale in vitro	52
2.14	Illustration comparative des deux niches du système nerveux central	54
3.1	Classification des paralysies en fonction du niveau de la lésion de la moelle spinale	56
3.2	Classification de l'ASIA évaluant la motricité et la sensibilité des patients médullo-lésés.	60
3.3	La physiopathologie de la lésion médullaire traumatique (LMT)	61
3.4	Illustration chronologique résumant les différents évènements physiopathologiques	65
4.1	La cicatrice médullaire	68
4.2	La composition cellulaire de la cicatrice médullaire	69
4.3	Activation microgliale et sa mise en place au niveau de la cicatrice médullaire suite à la lésion de la moelle spinale	70
4.4	Représentation schématique illustrant la mise en place de la cicatrice fibrotique durant les 14 jours après la lésion provenant des péricytes A	71
4.5	Origine et distribution cellulaire de la cicatrice gliale de la moelle spinale	72
4.6	La réponse oligodendrocytaire et sa contribution dans la cicatrice médullaire suite à la lésion médullaire traumatique	74
4.7	Le rôle des cellules de Schwann-like dans la récupération fonctionnelle deux semaines après la lésion médullaire	75

4.8	Représentation schématique résumant les différents rôles de la cicatrice médullaire et leurs dualités entre l'inhibition et la permissivité	79
4.9	Réactivité des cellules médullaires	81
4.10	Les différents facteurs déclenchant l'activation de ces cellules souches endogènes de la moelle spinale	83
5.1	Les différentes cibles thérapeutiques des stratégies neuroprotectrices et neurorégénératives liées à la physiopathologie de la lésion de la moelle spinale	87
5.2	Les différentes approches neurorégénératives	88
5.3	La stimulation électrique épidurale (EES)	91
5.4	Illustration schématique d'une étude clinique de la stimulation électrique épidurale (EES)	92
5.5	Illustration schématique des résultats observés d'après l'étude	93
5.6	La stimulation trans-spinale à courant continu (TsDCS)	94
5.7	Le mécanisme d'action de la TMS	95
5.8	Les différents équipements de la stimulation magnétique transcrânienne	96
6.1	Représentation schématique résumant les différents effets du champ électromagnétique au niveau du système nerveux central	101
6.2	Les différents mécanismes cellulaires et moléculaires induits par le champ électromagnétique sous-tendant à l'effet neurotrophique	102
6.3	Les différents mécanismes cellulaires et moléculaires induits par le champ électromagnétique sous-tendant à l'effet anti-apoptotique	105
6.4	Les différents mécanismes cellulaires et moléculaires induits par le champ électromagnétique sous-tendant à l'effet anti-inflammatoire	106

Table des abréviations

α SMA α -Smooth muscle actin

5-HT2C 5-hydroxytryptamine receptor 2C

ADAMTS-4 A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4

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

AR Acide Rétinoïque

APC anti Adenomatous Polyposis Coli

ASIA American Spinal Injury Association

AVC Accident vasculaire cérébral

Accs Central canal contacting astrocytes

Ascl1 Achaete-scute homolog 1

BDNF Brain-Derived Neurotrophic Factor

BLBP Brain lipid-binding protein

BMP Myelin Basic Protein

Bax Bcl2-associated protein X

Bcl2 B-cell lymphoma 2

BrdU Bromodésoxyuridine

C1q Complement component 1q

C3 Complement component 3

CC1 = APC Anti-adenomatous polyposis coli

CCL2 Monocyte chemoattractant protein-1

CGO Cellules gliales olfactives

CNPase 2',3'-nucléotide cyclique 3'-phosphodiesterase

COX-2	Cyclooxygénase 2
CSF-N	Cerebrospinal fluid-contacting neurons
CSPG	Chondroitin sulfate proteoglycan
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
CaV1.2	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit
CaV1.3	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern
DCX	Doublecortin
Dbx1	Developing brain homeobox protein 1
DiL	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate
EDU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EES	Electrical epidural stimulation
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast growth factor
FOXA2	Forkhead box protein A2
FoxJ1	Forkhead box protein J1
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GAP43	Growth Associated Protein 43
GCV	Ganciclovir
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Green Fluorescent Protein
Glast	L-Glutamate/L-Aspartate Transporter
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF1α	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HSV-TK/GCV S	Herpes simplex virus thymidine kinase /phosphorylates ganciclovir

IGF1	Insulin-like growth factor 1
IL	InterLeukine
IPSC	Induced pluripotent stem cells Iba1
Irx3	Iroquois-class homeodomain protein
iTBS	Intermittent theta burst stimulation
KO	Knockout
LCS	Liquide cérebrospinal
LMT	Lésion médullaire traumatique
MAG	Myelin-associated glycoprotein
MAP2	Microtubule-associated protein 2
MAP3K13	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 13
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MAPT	Microtubule associated protein tau
MBP	Myelin basic protein
MEC	Matrice extracellulaire
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MOG	Myelin-Oligodendrocyte glycoprotein
MSC	Mesenchymal stem cells
Myrf	Myelin regulatory factor
NCDN	Neurochondrin
NEFM	Neurofilament medium polypeptid
NF-$\kappa$$\beta$	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NG2	Neural/glial antigen 2 NGF
NGF	Nerve growth factor
NMDA	N-Methyl-D-aspartic acid
NOS	Nitric Oxide Synthase
NSC	Neural stem cells
NT3	Neurotrophin-3
NKx2.2	NK2homeobox2

NKx6.1	NK6homeobox1
Nogo	Neurite outgrowth inhibitor
OL	Oligodencrocyte
OPC	Oligodendrocyte Progenitor Cell
Olig1	Oligodendrocyte Transcription Factor 1
Olig2	Oligodendrocyte Transcription Factor 2
P0	la protéine de la myéline périphérique
P75NTR	Low-affinity nerve growth factor receptor
PAFAH1B1	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFα	platelet-derived growth factor alpha
PDGFRα	platelet-derived growth factor receptor alpha
PEM	Potentiels évoqués moteurs
PKD1L2	Polycystic kidney disease protein 1-like 2
PKD2L1	Polycystic kidney disease protein 2-like 1
PLP	Porteolipid Protein of Myelin
PTPσ	Tyrosine-Protein Phosphatase σ
pMN	Motor Neurone progenitor domain
PRDX	Peroxiredoxin 1
PSA-NCAM	Polysialylated neuronal cell adhesion molecule
Pax2	Paired box gene 2
Pax6	Paired box gene 6
RHOG	Ras homology Growth-related
ROCK	Rho Kinase
rTMS	repetitive Transcranial Magnetic Stimulation
rTSMS	repetitive TranSpinal Magnetic Stimulation
SEM	Stimulation électromagnétique
SM	Stimulation magnétique

SN	Système nerveux
SNC	Système nerveux central
SNCA	Synuclein
SNP	Système nerveux périphérique
SOD	Superoxide dismutase 1
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SVZ	Zone sous ventriculaire
SYN1	Synapsin I
Shh	Sonic hedgehog
Slit1	slit guidance ligand 1
Sox2	SRY-Box Transcription Factor 2
Sox9	SRY-Box Transcription Factor 9
Sox10	SRY-Box Transcription Factor 10
TGFβ	Transforming growth factor
TK	Thymidine kinase
Tmem119	Transmembrane Protein 119
TMS	Transcranial Magnetic Stimulation
TNF	Tumor Necrosis Factors
TsDCS	Trans spinal Direct Current Stimulation
TsESS	Transcutaneous Electric Stimulation
Tuj	Neuron-specific class III beta-tubulin)
VEGF	Vascular endothelial growth factor
YFP	Yellow Fluorescent Protein

Avant-Propos

Les lésions de la moelle spinale constituent un problème de santé public d'une ampleur grandissante. Selon l'organisation mondiale de la santé, on estime entre 250 et 500 milles nouveaux cas de la lésions médullaires par an dans le monde. La distribution des personnes atteintes par ces lésions est bimodale, avec un premier pic entre 16 et 30 ans et un deuxième touchant une population âgée de plus de 60 ans. Dans leur majorité, ces lésions sont dues à des causes évitables, comme les accidents de la circulation, les chutes, ou plus rarement, une lésion balistique ou par arme blanche. Bien que l'espérance de vie ait été améliorée, les patients médullo-lésés souffrent de certains handicaps qui dépendent de la gravité de la lésion et de sa localisation sur la moelle spinale et entraînant une perte partielle ou complète des fonctions sensorielles et/ou motrices. Il faut également noter que ces déficiences liées à la lésion elle-même, en termes d'immobilisation, de détérioration de la qualité de vie et de prise en charge de ces patients, entraînent des coûts importants tant au niveau individuel que sociétal.

Chronologiquement, la lésion médullaire se divise en deux grandes phases : la phase primaire qui se caractérise par la destruction tissulaire induite par le traumatisme mécanique, suivie d'une destruction cellulaire. Alors que la phase secondaire est la conséquence moléculaire et cellulaire de la phase primaire. Ceci se traduit par différents évènements conduisant à l'amplification des dégâts initiaux. La moelle spinale lésée entreprend aussitôt une réponse à cette lésion. L'ensemble de ces réactions aboutit à la formation d'une cicatrice médullaire, un processus multifactoriel engageant des astrocytes réactifs, des progéniteurs gliaux, des cellules microgliales et des fibroblastes. De nombreuses études se sont intéressées à la caractérisation des populations cellulaires endogènes de la moelle, ainsi qu'à leurs réponses à la suite de la lésion. En particulier, la mise en évidence de l'existence d'une population souche neurale endogène de la moelle a récemment été faite. Il a ainsi pu être décrit que ce potentiel souche endogène est confiné aux cellules épendymaires qui bordent le canal central et qu'après une lésion médullaire, ces cellules peuvent proliférer, migrer vers le site lésionnel et se différencier

en astrocytes (très majoritairement) et en oligodendrocytes (minoritairement) afin de contribuer à la mise en place de la cicatrice médullaire. Ces capacités font des cellules épendymaires une nouvelle cible thérapeutique prometteuse. Cependant, on ignore toujours comment moduler cette réactivité.

Durant plusieurs années, différentes stratégies thérapeutiques ont été proposées. Actuellement, seul l'axe de la neuroprotection via la décompression chirurgicale permet de minimiser les effets délétères de la lésion primaire. La seconde stratégie consiste à limiter la lésion secondaire via une variété de traitements, en cours de développement, et dont on peut citer notamment la thérapie cellulaire. Malheureusement, du fait de la complexité de la physiopathologie de la lésion médullaire traumatique, aucun traitement n'a permis une récupération complète des fonctions neurologiques perdues. L'ensemble de ces thérapies cellulaires ont été utilisées et validées chez l'animal, tout en restant inefficaces chez l'homme du fait de leur caractère invasif et quant au niveau des risques encourus tels que le rejet de la transplantation ou le potentiel tumorigène associé. De ce fait, nous émettons l'hypothèse que les réponses cellulaires de la moelle spinale peuvent être modulées après lésion et seraient différentielles en fonction du traitement utilisé. C'est pourquoi nous proposons de tester notre hypothèse par le biais d'une méthode non invasive; la stimulation magnétique répétitive Trans-spinale, la rTSMS. Cette thérapie est, en effet, déjà utilisée dans le traitement de certaines pathologies neurologiques et a prouvé de manière indirecte son efficacité tant au niveau fonctionnel que cellulaire via ses effets neuroprotecteur, anti-apoptotique et neurotrophique.

Ce manuscrit débute avec une introduction composée de trois volets. Dans le premier (chapitres 1 et 2), nous revenons sur l'organisation générale de la moelle spinale, sa morphogenèse, son anatomie interne et externe, suivie par une cartographie des différentes populations cellulaires et leurs mises en place au sein de la moelle spinale en conditions physiologiques. Le second volet (chapitres 3 et 4) est dédiée à la description des lésions médullaires traumatiques (LMT), aux différents mécanismes physiopathologiques qui les caractérisent, ainsi qu'aux réponses cellulaires déclenchées suite à cette lésion. Dans le dernier volet de cette introduction (chapitres 5 et 6), les différentes stratégies thérapeutiques actuelles pour le traitement des LMT sont présentées et dont un éclairage particulier est apporté sur une méthode non invasive; la stimulation électromagnétique (SEM), où y sont notamment décrits; les effets neurobiologiques prometteurs de la SEM pour une application après traumatisme spinal.

Dans la deuxième partie de ce manuscrit, je présente les différentes publications et projets réalisés durant ma thèse, ainsi qu'une discussion générale sur mon projet de recherche ; l'effet de la stimulation magnétique répétitive trans-spinale comme thérapie non invasive dans le cadre des lésions médullaires.

Suite à la présentation de ces travaux et la discussion, des perspectives sont également proposées.

Introduction

Chapitre 1

Organisation générale de la moelle spinale

Le système nerveux est composé, sur le plan anatomique, de deux parties [fig. 1.1] :

- Le **système nerveux central (SNC)** formé par l'encéphale (le cerveau, le diencephale, le tronc cérébral et le cervelet) et la moelle spinale.
- **Le système nerveux périphérique (SNP)** formé de nerfs constituant les voies de communication entre le SNC et l'ensemble de l'organisme (les nerfs crâniens et les nerfs spinaux)

Vers la fin de la 4^{ème} semaine de développement, la régionalisation antéro-postérieure du tube neural a lieu [1]. La partie antérieure du tube neural se dilate et constitue des renflements qui sont à l'origine des trois vésicules cérébrales primitives :

- Le prosencéphale ou cerveau antérieur
- Le mésencéphale ou cerveau moyen
- Le rhombencéphale ou cerveau postérieur

Vers le 32^{ème} jour, les vésicules cérébrales primitives se différencient en cinq vésicules cérébrales secondaires formant l'origine des différentes structures cérébrales et spinales [fig. 1.2] :

- **Le prosencéphale** qui se subdivise en télencéphale (les deux hémisphères cérébraux) et en diencephale (vésicules optiques, thalamus, hypothalamus, neurohypophyse)
- **Le mésencéphale** qui est à l'origine des tubercules quadrijumeaux antérieur et postérieur
- **Le rhombencéphale** qui se subdivise en métencéphale (cervelet) et en myélencéphale (bulbe rachidien, moelle spinale)

1.1 Morphogenèse spinale

Après avoir vu les différentes structures issues du tube neural, il y aura la régionalisation de ce dernier selon un axe dorso-ventral mettant en place la moelle spinale qui sera issue de la partie caudale du tube. La paroi du tube neural est initialement revêtue de cellules neuroépithéliales, cette paroi s'épaissit progressivement, induisant ainsi une diminution de la lumière du tube et donnant place au futur canal central de la moelle spinale [fig. 1.3] [2].

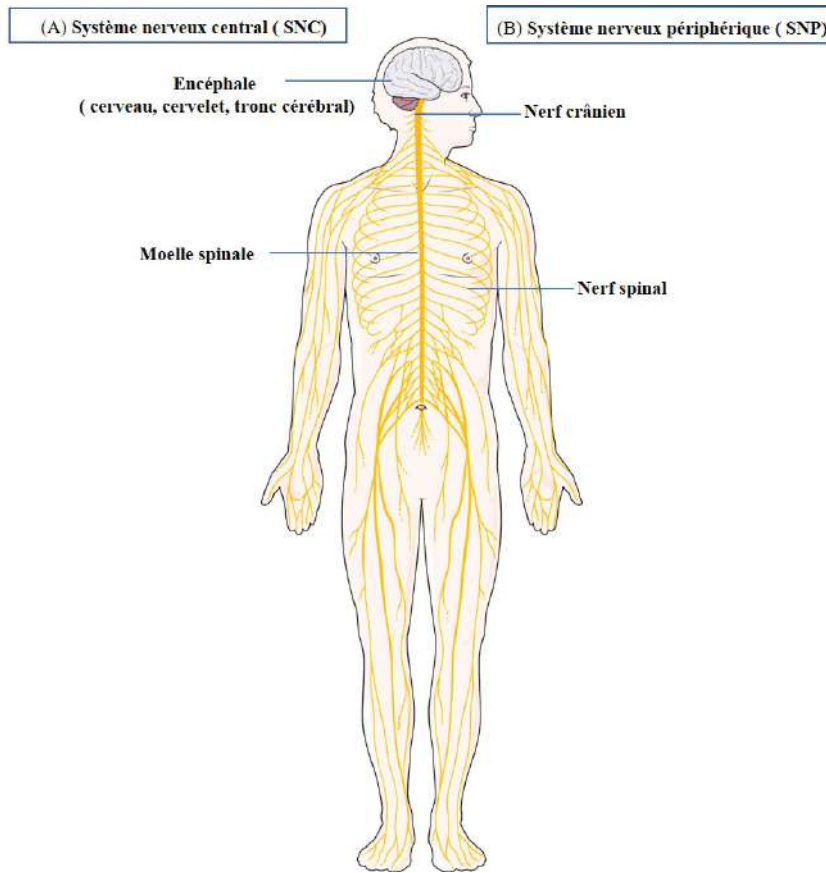


FIGURE 1.1 Le système nerveux. Divisé en deux structures le SNC (A) est composé de l'encéphale et la moelle spinale et le SNP en jaune (B) comporte les nerfs spinaux et les nerfs crâniens

Tube neural primitif	Stade 3 vésicules cérébrales primitives	Stade 5 vésicules cérébrales secondaires et structures dérivées	Structure de l'encéphale adulte
Extrémité rostrale encéphalique	<p>Prosencéphale Cerveau antérieur</p> <p>Mésencéphale Cerveau moyen</p> <p>Rhombencéphale Cerveau postérieur</p>	Télocéphale Nerf olfactif I	Cerveau : hémisphères cérébraux
		Diencephale Nerf optique II	vésicules optiques, thalamus, hypothalamus, neurohypophyse
		Mésencéphale Nerfs crâniens III et IV	Tubercules quadrijumeaux antérieur et postérieur
		Métencéphale Nerfs crâniens V à VIII	
		Myélocéphale Nerfs crâniens IX à XII (Nerf XI racine crânienne)	cervelet
Extrémité caudale		Moelle épinière (Nerf XI racine spinale)	Bulbe rachidien, moelle spinale

FIGURE 1.2 Développement embryonnaire du SNC humain. Dès la quatrième semaine de développement, le tube neural primitif se subdivise en 3 vésicules cérébrales primitives qui formeront les cinq vésicules cérébrales secondaires donnant naissance aux différentes structures cérébrales adultes. D'après [3]

Après un certain nombre de divisions cellulaires, ces cellules neuroepithéliales donnent une vague cellulaire de neuroblastes qui vont proliférer et se différencier afin de mettre en place les trois zones cellulaires du tube neural [2] comme suit [fig. 1.4] :

- **La zone épendymaire** ou interne génératrice des cellules de l'épendyme : les épendymocytes bordant le canal central.
- Une zone intermédiaire, **la zone du manteau** où se trouvent les corps cellulaires des neurones ayant migrés de la zone interne, formant plus tard la substance grise de la moelle.
- La couche la plus externe de la moelle spinale contenant les fibres nerveuses provenant des neuroblastes de la zone manteau, c'est **la zone marginale**, elle constitue la substance blanche de la moelle.

À la suite de cette prolifération massive de neuroblastes au sein de la zone manteau, on observe un épaissement ventral et dorsal du tube neural de chaque côté. Ces deux territoires, dorsal et ventral, sont limités par un **sillon limitant**, c'est une gouttière longitudinale située de part et d'autre du canal central et séparant deux régions [fig. 1.5] [4] :

- Une région dorsale ou **lame alaire** contenant les corps cellulaires des neurones sensitifs de la corne dorsale de la substance grise. Cette zone donnera naissance aux aires sensitives de la moelle.
- La région ventrale ou **lame basale** constitue les futures aires motrices de la moelle de la corne ventrale de la substance grise.

D'autre part, une zone apparaît entre les deux cornes, dorsale et ventrale, contenant les corps cellulaires des neurones du système nerveux autonome, la corne latérale, qui n'est présente qu'au niveau thoracique (T1 - T12) et lombaire (L2, L3). En effet, les deux extrémités, dorsale et ventrale, du tube neural situées sur la ligne médiane constituent le toit (roof-plate) et le plancher (floor-plate) qui vont intervenir par la suite dans la régionalisation dorso-ventrale du tube neural.

Cette régionalisation dépend d'une signalisation moléculaire bien déterminée et dont les acteurs principaux sont les deux morphogènes Shh « Sonic hedgehog », produit par la corde et le plancher comme un signal de ventralisation, et la famille des BMP « Bone Morphogenetic Protein » produit par l'ectoderme et qui spécifie la plaque du toit comme étant un signal de dorsalisation. Le Shh intervient dans la mise en place des neurones, dont les motoneurones,

dans la partie ventrale du tube et les BMP, à l'inverse, induisent la formation des interneurons de la partie dorsale. Grâce à cette différence de gradients, l'ensemble des neurones se met en place à ce niveau.

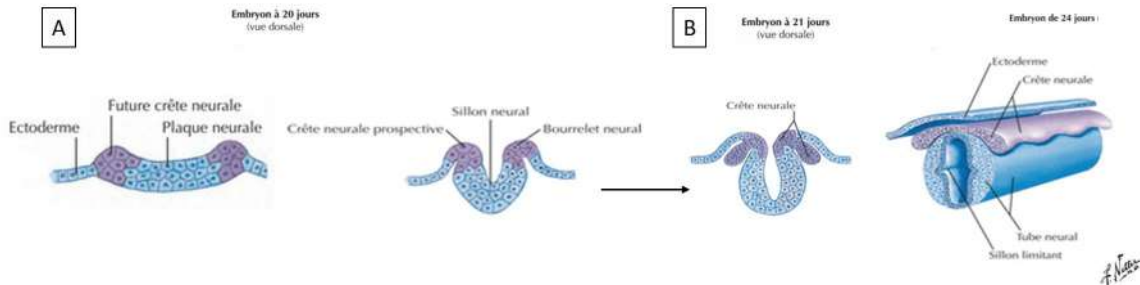


FIGURE 1.3 **La neurulation.** L'ectoderme de la surface s'épaissit, se creuse et se replie sur lui-même. (A) Les crêtes neurales de chaque côté se rapprochent et fusionnent, la neurulation progresse à la fois vers l'extrémité céphalique et caudale (B). D'après [2]

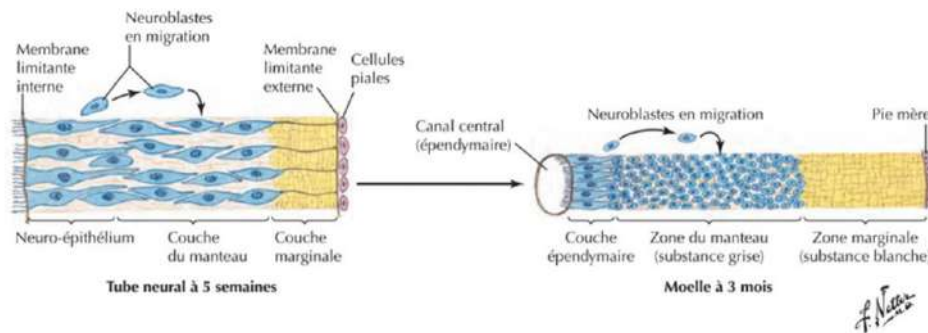


FIGURE 1.4 **Le développement des couches du tube neural de la moelle spinale.** Le neuroépithélium donne naissance à trois couches : 1- La couche épendymaire (général les cellules épendymaires du canal central), 2- la zone manteau (correspondante à la substance grise où sont situés les corps cellulaires) et 3- la zone marginale (correspondante à la substance blanche où sont situées les expansions neuronales). D'après [2]

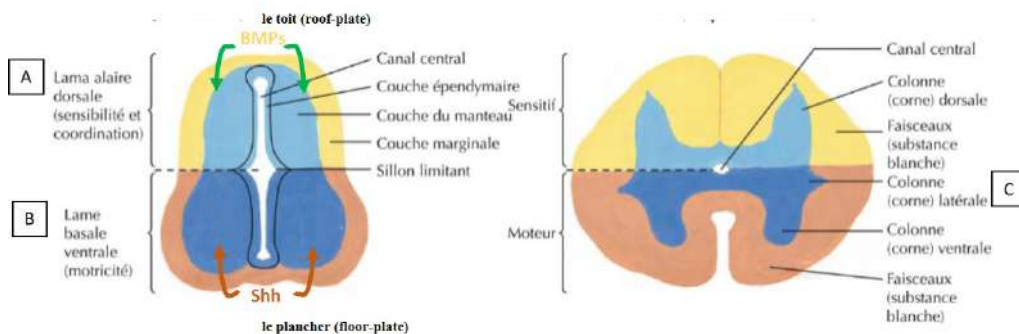


FIGURE 1.5 **Le Développement segmentaire de la moelle spinale.** Selon l'axe dorso-ventral, le tube neural est séparé par une gouttière longitudinale appelée sillon limitant formant deux régions : (A) Une région dorsale ou lame alaire : donnant naissance aux aires sensibles de la moelle. (B) Une région ventrale ou lame basale constitue les futures aires motrices de la moelle. Une zone apparaît entre les deux cornes, dorsale et ventrale, contenant les corps cellulaires des neurones du système nerveux autonome et appelée, la corne latérale. (C) Les deux extrémités, dorsale et ventrale, du tube neural constituent le toit (roof-plate) et le plancher (floor-plate). D'après [2]

1.2 Anatomie spinale

1.2.1 Morphologie externe

La moelle spinale ou Medulla spinalis en terminologie anatomique internationale, est la partie la plus ancienne du système nerveux central d'un point de vue phylogénique. Elle présente un aspect cylindrique longitudinal d'une longueur d'environ 45cm chez l'adulte, suspendue dans la colonne vertébrale [fig. 1.6] [5]. Cette colonne est constituée de 33 vertèbres et est divisée en 5 segments vertébraux :

- Cervicales (C1-C7)
- Thoraciques (T1-T12)
- Lombaires (L1-L5)
- Sacrales (S1-S5)
- Coccygiennes (1-4)

Contrairement à la souris, ayant seulement 30 vertèbres composées de :

- Sept cervicales
- Treize thoraciques
- Six lombaires
- Quatre sacrales

Vers le 3^{ème} mois du développement embryonnaire, la moelle spinale a la même longueur que la colonne. A la fin du 5^{ème} mois, la colonne vertébrale et la dure mère croissent plus rapidement de telle manière que l'extrémité terminale de la moelle se retrouve à un niveau plus élevé S1, jusqu'à se retrouver à la naissance à proximité de la 3^{ème} vertèbre lombaire (L3). À la suite de ce décalage de croissance, les racines spinales s'achèment obliquement de leur segment vers l'étage vertébral correspondant [fig. 1.7].

La moelle spinale est enveloppée par 3 revêtements membraneux de l'extérieur vers l'intérieur : **la dure mère, l'arachnoïde et la pie -mère**. Ces dernières forment les méninges. Elles assurent la circulation du liquide céphalospinal, ainsi que la protection et le soutien de la moelle spinale au sein du canal vertébral [fig. 1.8] [3].

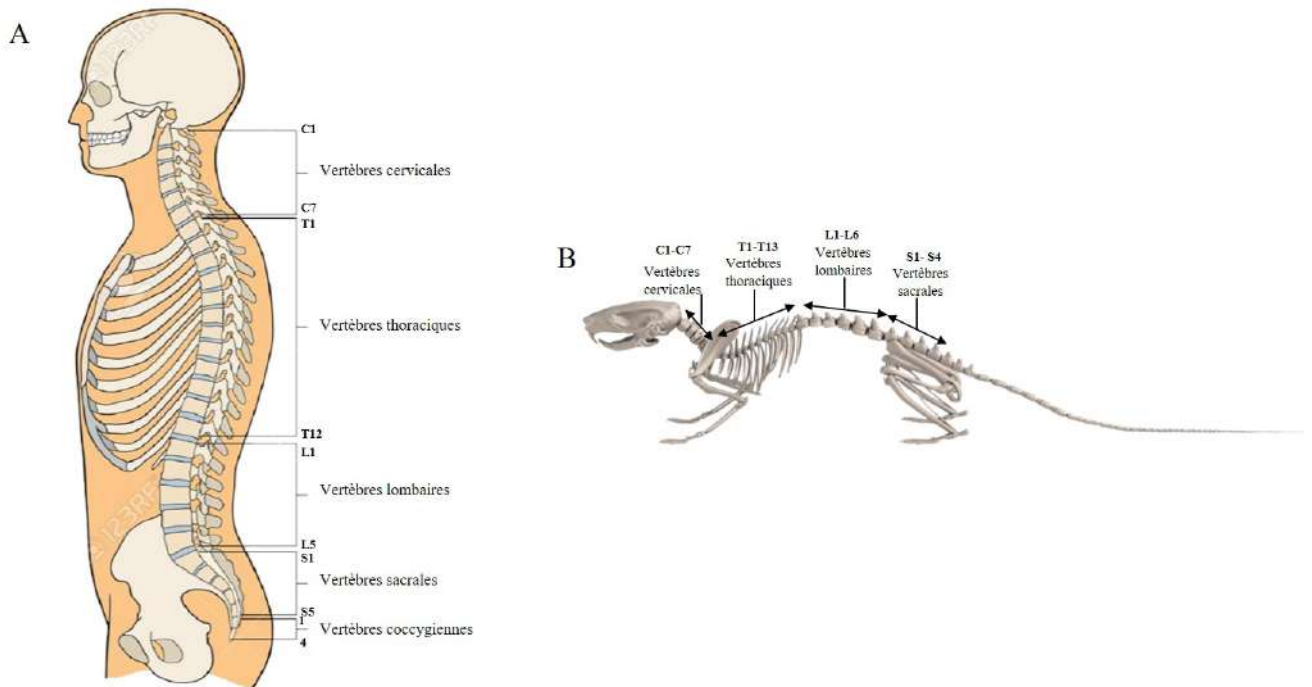


FIGURE 1.6 **Illustrations descriptives de la colonne vertébrale humaine et souris adulte.** Présentant les différents segments vertébraux humains (A) : vertèbres cervicales (C1-C7), thoraciques (T1-T12), lombaires (L1-L5), sacraux (S1-S5) et vertèbres coccygiennes (1-4) comparaison à la souris (B) : cervicales (C1-C7), thoraciques (T1-T13), lombaires (L1-L6), sacraux (S1-S4).

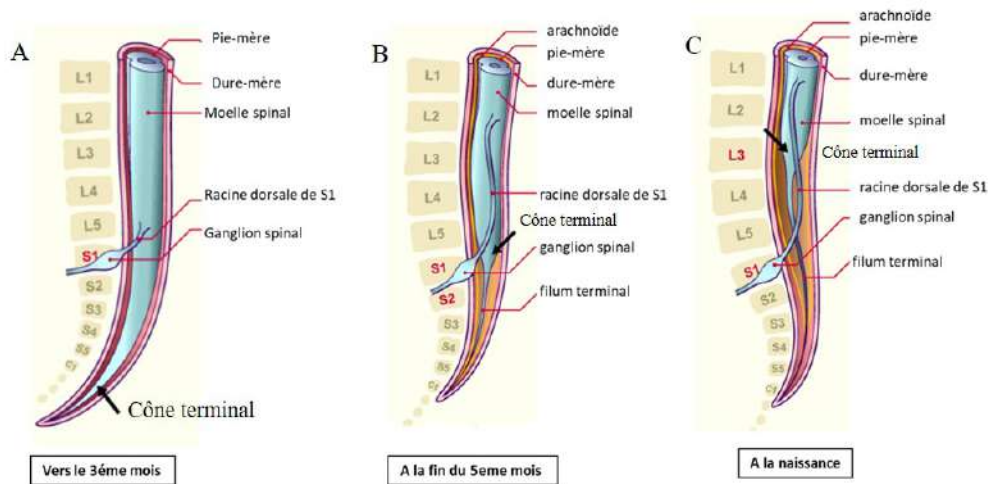


FIGURE 1.7 **La croissance différentielle de la moelle spinale et de la colonne vertébrale durant le développement.** (A) A trois mois de développement, la moelle spinale s'étend sur toute la longueur de la colonne vertébrale, les nerfs rachidiens traversent les foramens intervertébraux correspondants à leurs origines. (B) A la fin du 5ème mois, la colonne vertébrale et la dure mère croissent plus rapidement que la moelle, de telle manière que le cône terminal se déplace à un niveau plus élevé. (C) A la naissance, le cône terminal se situe au niveau L3. D'après [4]

Tout au long de son trajet, la moelle spinale change de diamètre, elle présente deux renflements et une extrémité inférieure :

- **Renflement cervical** : situé entre C5 et T1 d'où sont issus les nerfs spinaux destinés aux membres supérieurs (plexus brachial)
- **Renflement thoracique** : situé entre T10 et L4 d'où sont issus les nerfs spinaux destinés aux membres inférieurs (plexus lombo-sacral)
- **Cône médullaire** : terminaison inférieure qui se projette au niveau de L2 [6]

Il existe 31 paires de nerfs spinaux regroupés en fonction des vertèbres auxquelles ils sont associés, il y a de chaque côté [fig. 1.9] [1] :

- Huit paires de nerfs cervicaux C1-C8
- Douze paires de nerfs thoraciques T1-T12
- Cinq paires de nerfs lombaux L1-L5
- Cinq paires de nerfs sacraux S1-S5
- Une paire de nerf coccygien (Co)

Elles ont pour principale fonction de relier le système nerveux central à la périphérie via le système nerveux périphérique.

Chaque nerf spinal est formé par la fusion de deux racines d'un même segment spinal :

- **Les racines spinales postérieures** : ayant comme rôle de transmettre les influx nerveux sensitifs jusqu'au SN
- **Les racines spinales antérieures** : permettent de transmettre les commandes motrices du SNC vers les muscles.

Ces racines, elles-mêmes, sont issues de l'union de plusieurs radicelles postérieures et antérieures. Chaque nerf spinal, en sortant de ses foramens intervertébraux, se divise en deux rameaux, un petit rameau postérieur et un rameau antérieur plus gros. Le rameau postérieur va innerver les muscles postérieurs du tronc et de la peau, alors que le rameau antérieur innervera les muscles ventraux du tronc, des membres supérieurs et inférieurs et de la peau [fig. 1.10].

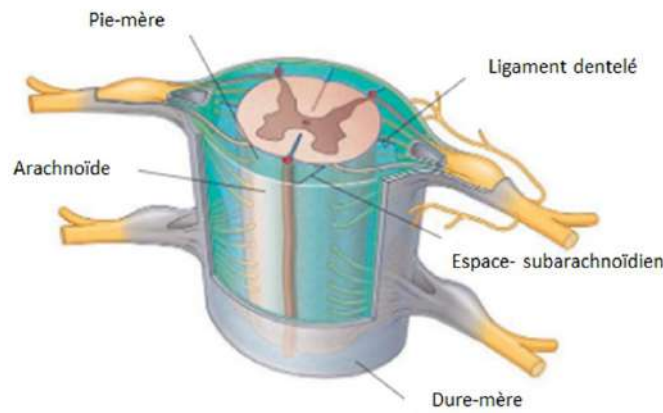


FIGURE 1.8 **Illustration descriptive des différentes méninges spinales présentes au sein de la moelle spinale.** La moelle spinale est enveloppée par 3 revêtements membraneux de l'extérieur vers l'intérieur : la dure mère, l'arachnoïde et la pie-mère. D'après [7]

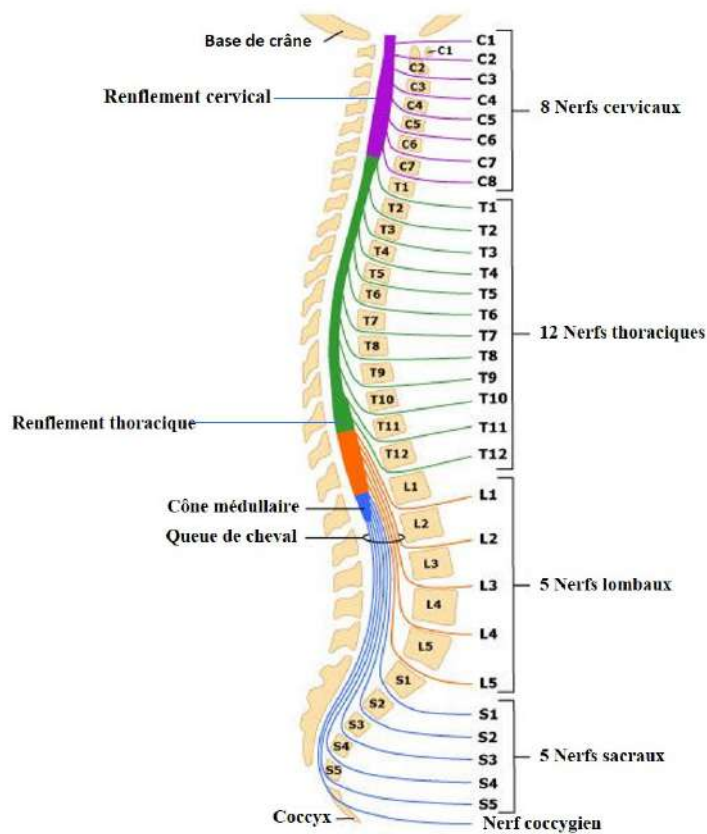


FIGURE 1.9 **Représentation schématique des différents segments spinaux de la moelle spinale.** La moelle spinale présente deux renflements et une extrémité inférieure : renflement cervical, renflement thoracique et un cône médullaire. Il existe 31 paires de nerfs spinaux regroupés en fonction des vertèbres auxquelles ils sont associés. D'après [2]

1.2.2 Morphologie interne

La moelle spinale est constituée de la substance grise, au niveau central, et de la substance blanche, en périphérie. L'ensemble étant parcouru par le canal central.

1.2.2.1 La substance grise

Elle a une forme comparée à la lettre H sur une coupe transversale, présente **deux cornes dorsales, deux latérales et deux ventrales** [8]. Elle contient les corps cellulaires des neurones et se présente comme suit [fig. 1.11] :

- **Les neurones des cornes dorsales** reçoivent les informations sensorielles qui entrent dans la moelle par les racines dorsales des nerfs spinaux.
- **Les cornes latérales** en région thoracique, contiennent les motoneurones viscéraux préganglionnaires qui se projettent sur les ganglions sympathiques.
- **Les cornes ventrales** contiennent les neurones moteurs sortant par les racines ventrales qui vont se projeter au niveau des muscles striés.

1.2.2.2 La substance blanche

Elle est formée par trois colonnes ou **cordons : antérieurs, postérieurs et latéraux** [8]. Chacun possède des faisceaux de fibres responsables de fonctions spécifiques [fig. 1.12] :

- **Les cordons antérieurs** transportent les messages sensoriels ascendants venant des mécanorécepteurs sensoriels somatiques.
- **Les cordons latéraux** possèdent les axones provenant du cortex cérébral et qui se terminent sur les interneurones et les motoneurones des cornes ventrales.
- **Les cordons postérieurs** transportent à la fois des messages ascendants concernant la douleur et la température et des messages moteurs descendants du tronc cérébral et du cortex moteur.

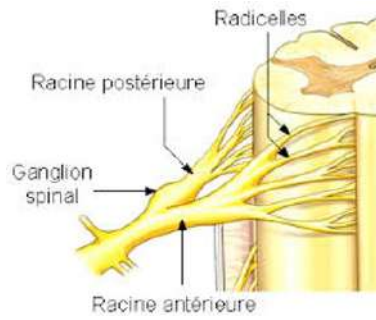


FIGURE 1.10 **Illustration descriptive des racines spinales.** Le nerf spinal est formé par la fusion de deux racines postérieures et antérieures. Ces racines sont issues de la fusion de plusieurs racicules postérieures et antérieures. La racine postérieure comporte un renflement appelé ganglion spinal, dans lequel se situe les corps cellulaires des neurones. Cette racine ayant comme rôle de transmettre les influx nerveux sensitifs jusqu'au SN.

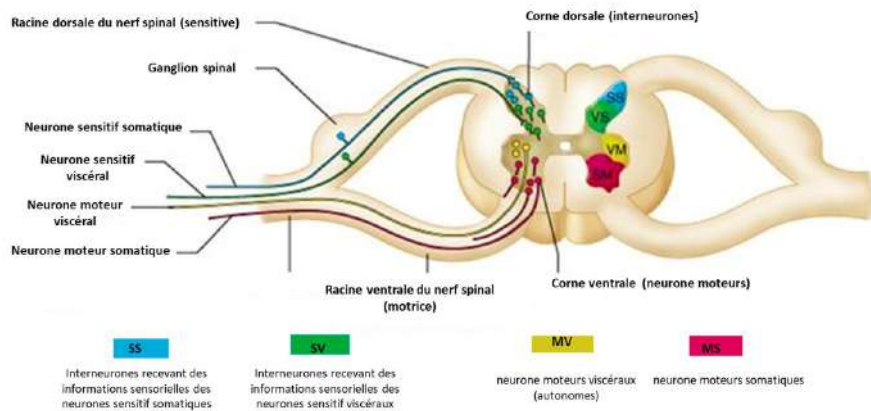


FIGURE 1.11 **Organisation de la substance grise de la moelle spinale.** La substance grise présente deux cornes dorsales, deux latérales et deux ventrales contenant les corps cellulaires des neurones sensitifs dans la partie dorsale et des neurones moteurs dans la partie ventrale. D'après le livre Gray's Anatomie - Le Manuel pour les étudiants. D'après [7]

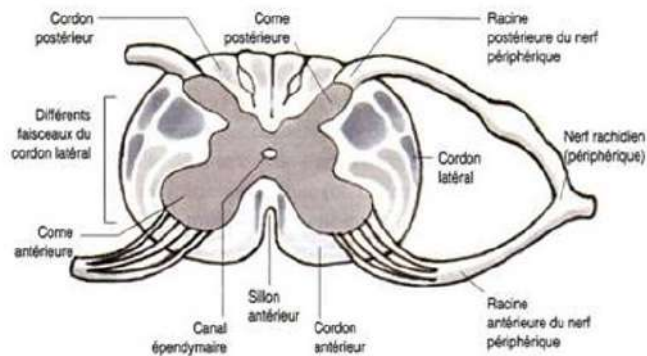


FIGURE 1.12 **Représentation schématique de la morphologie interne d'une coupe transversale d'une moelle spinale.** La moelle spinale est constituée de la substance grise présentant deux cornes postérieures, deux latérales et deux antérieures au niveau central, et de la substance blanche, en périphérie formée par trois cordons : antérieurs, postérieurs et latéraux. L'ensemble étant parcouru par le canal central.

1.2.2.3 Le canal central

Le canal central ou canal épendymaire, est un prolongement de forme elliptique uniforme issu primitivement du canal neural, il se prolonge tout au long de la moelle spinale du quatrième ventricule du rhombencéphale jusqu'au cône terminal de la moelle [9], faisant partie du système ventriculaire dans lequel circule le liquide cébrospinal. Le canal central se situe au centre de la substance grise de la moelle spinale, au niveau de la commissure grise. Son emplacement varie légèrement en fonction du segment médullaire, où, il a une localisation ventrale dans les segments cervicaux et thoraciques, centrale au niveau du segment lombaire et dorsale à l'approche du cône terminal [10].

Le canal central est tapissé d'un revêtement de cellules épithéliales ciliées motiles appelées cellules épendymaires. Cette région épendymaire est composée de plusieurs types de cellules situées, soit en contact direct avec le liquide cébrospinal, ou dans une position sub-épendymaire donnant l'aspect d'un épithélium pseudo-stratifié [fig. 1.13].

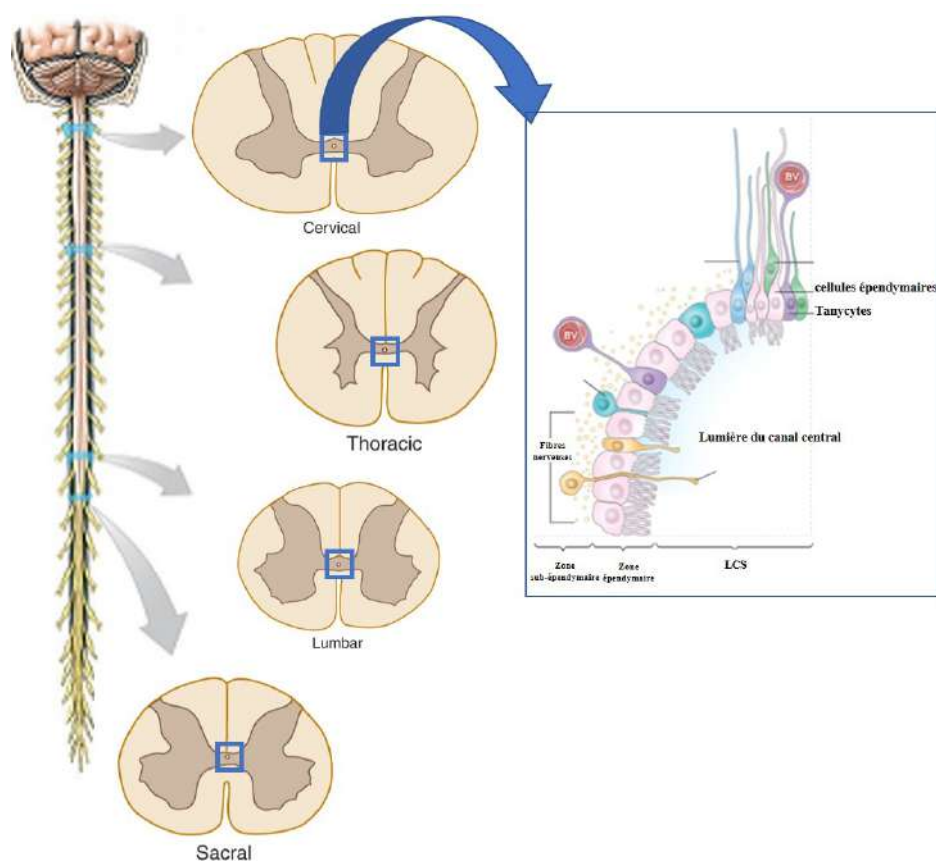


FIGURE 1.13 Représentation schématique du canal central de la moelle spinale. D'après [11]

1.2.3 Vascularisation médullaire

1.2.3.1 La vascularisation artérielle

L'alimentation sanguine de la moelle spinale est multiple et elle se fait selon deux axes [fig. 1.14] [12] :

- **Axe artériel Vertical** : issu des artères vertébrales qui s'étendent tout le long de l'axe médian depuis le tronc cérébral jusqu'à la pointe des cônes médullaires.
- **Axe artériel Horizontal** : provenant des artères segmentaires de l'aorte.

Le système artériel vertical : Il est formé par un axe spinal ventral médian et de deux axes spinaux dorsaux. Au niveau cervical, les artères verticales sont issues d'une branche des artères vertébrales. Au niveau lombaire, ces 3 axes forment des anastomoses qui se regroupent dans une corbeille vasculaire du cône terminal.

Le système artériel horizontal : Ce système est formé par des artères radiculo-spinales issues des artères segmentaires de l'aorte. Chaque nerf spinal est suivi par une artère inter-segmentaire à destinée méningo-radiculo-médullaire. Chez l'homme, il y a six à huit artères radiculo-spinales ventrales et de treize à quinze dorsales, d'origines différentes selon le segment de la moelle spinale.

- Au niveau cervical, elles sont issues des branches de l'artère subclavière
- Au niveau thoracique, elles proviennent de la branche dorsale des artères intercostales
- Au niveau lombaire, ce système horizontal se base sur l'artère radiculo-spinale d'Adamkiewicz.

1.2.3.2 La vascularisation intraspinale

Elle est constituée par 3 principaux axes [fig. 1.15] :

- L'**axe artériel spino-ventral** se trouvant au niveau de la fissure longitudinale ventrale de la moelle.
- **Deux axes artériels spino-dorsaux** se situant au niveau des sillons latero-dorsaux.

Ces axes constituent un réseau artériel pie-mérien circulaire. L'axe artériel spinal ventral donne naissance aux artères sulco-commissurales qui vascularisent la corne ventrale, latérale et la

base de la corne dorsale de la substance grise. Les veines sulco-commissurales drainent le sang de la partie ventrale vers l'axe veineux spinal ventral et les veines radiculaires. L'artère spino-dorsal donne naissance à des branches artérielles perforantes. Les branches veineuses perforantes drainent le sang de la partie dorsale vers l'axe veineux dorso-médian.

Ce réseau artériel pie-mérien va former des branches artérielles perforantes autour de la moelle. Les veines périphériques fusionnent avec le réseau veineux pie-mérien périspinal. D'où la régionalisation de la moelle en 3 principaux territoires artériels de vascularisation intra-spinale :

- Le territoire spinal ventral
- Le territoire spinal dorsal
- Le territoire spinal périphérique.

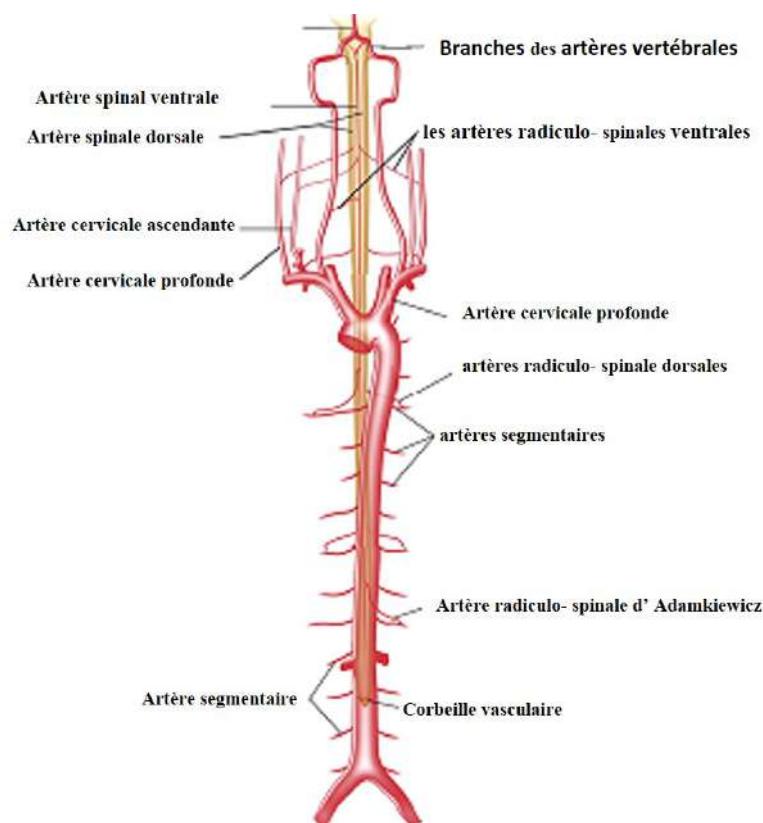


FIGURE 1.14 Organisation générale de la vascularisation artérielle de la moelle spinale. D'après [12]

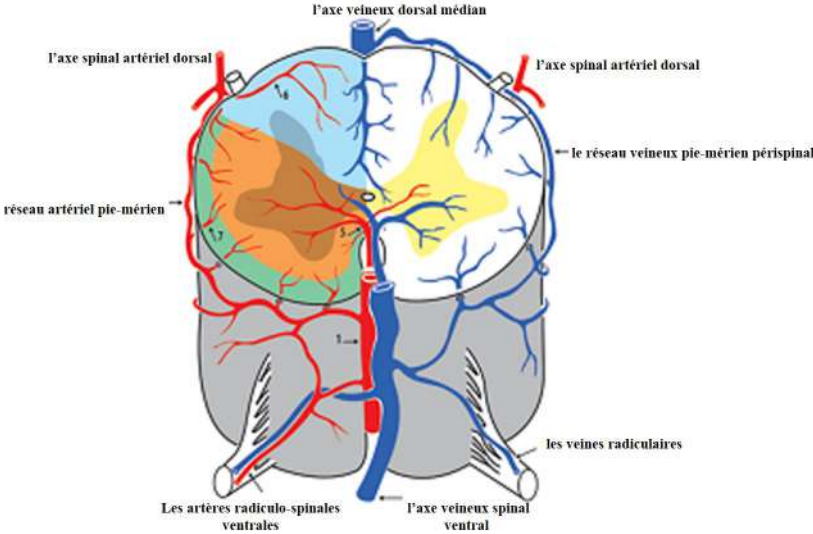


FIGURE 1.15 Organisation générale de la vascularisation intra spinale. D'après [12]

Chapitre 2

Cartographie cellulaire de la moelle spinale

Pour une meilleure compréhension du fonctionnement fondamental de la moelle spinale, il faudrait s'intéresser, en premier lieu, aux différentes populations cellulaires qui la constituent.

Afin de faire une cartographie cellulaire de la moelle, plusieurs études se sont basées sur des critères bien précis afin de décrire au mieux les différents types cellulaires. Parmi ces critères, on peut citer les suivants : localisation ; morphologie ; lignée cellulaire, origine embryonnaire ; expression génétique ou transcriptionnelle ; propriété électrophysiologique et marqueur moléculaire.

2.1 Cytogenèse de la moelle spinale

2.1.1 La neurogenèse au cours du développement spinal

Tel qu'il a été vu dans le chapitre précédent, la mise en place de l'axe dorso-ventral du tube neural est dépendante d'un gradient de concentration de facteurs morphogéniques tels que BMP, $TGF\beta$, la famille des FGFs, l'acide rétinoïque (AR) et la protéine Sonic Hedgehog (Shh).

Ces signaux vont contrôler la localisation et l'identité des différents types de neurones spinaux selon l'axe dorso-ventral. Cette diversité neuronale, aux niveaux spatial et temporel, est contrôlée par des programmes de structurations développementaux distincts, à l'origine de la diversité des populations neuronales.

Dans la partie dorsale du tube neural et sous l'influence des morphogènes de la famille des BMPs, on distingue 6 territoires distincts à l'origine de l'expression ou de la répression d'une combinaison spécifique de facteurs de transcription.

Les progéniteurs neuronaux se trouvant dans ces territoires seront à l'origine des six classes d'interneurones dorsaux : dI1 à dI6. Cette étape de spécification dorsale a lieu chez la souris entre E10 et E12.5 [13].

Au niveau de la partie ventrale, la neurogenèse est dépendante du gradient de concentration du morphogène Shh sécrété par le plancher (floor-plate) du tube neural, ce gradient de concentration de Shh a permis l'identification de cinq territoires p3, pMN, p2, p1 et p0. Les territoires p3, p2, p1 et p0 vont donner les interneurones V3, V2, V1 et V0, respectivement, et le territoire pMN donnera les motoneurones [14].

Chaque territoire est ainsi caractérisé par l'expression d'une combinaison de facteurs de

transcription qui le distingue des autres et qui va être à l'origine de la différenciation en un type cellulaire donné. Par exemple, les progéniteurs du territoire p0 sont identifiés par leur combinaison de sécrétion des facteurs *Dbx1/2*, *Pax6* et *Irx3* et qui vont ainsi générer les interneurons V0. Le territoire p1 est marqué par l'expression de *Dbx2*, *Pax6* et *Irx3*, ce qui donnera naissance aux interneurons V1 et enfin, les progéniteurs du territoire p3 définis par l'expression de *NKx2.2* vont générer les interneurons V3.

Cette diversité de combinaisons à la suite d'activation ou d'inhibition d'expressions de facteurs de transcription, en réponse au gradient de concentration de *Shh*, est nécessaire afin d'acquérir l'identité spécifique pour chaque neurone dans une position bien définie et dans une chronologie précise [fig. 2.1].

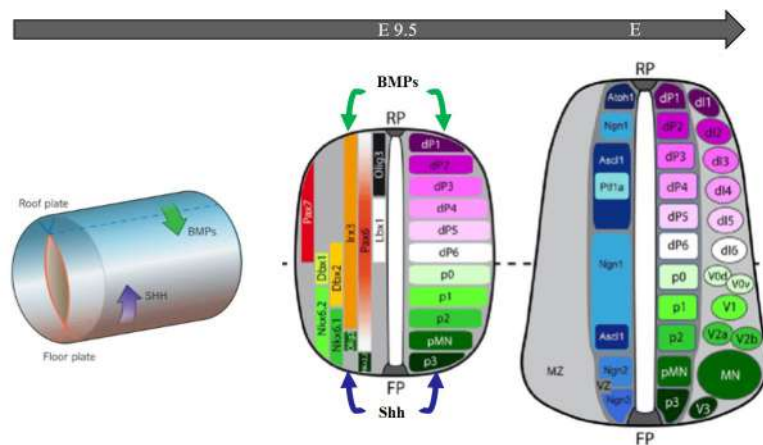


FIGURE 2.1 Représentation schématique des zones d'émergence des neurones durant le développement. D'après [15]

2.1.2 Le neurone

Les neurones sont les unités structurales et fonctionnelles du système nerveux. Ce sont des cellules excitables, hautement spécialisées, qui reçoivent, traitent et transmettent les influx nerveux.

Il y a plusieurs types de neurones que l'on classe selon leur structure ou leur fonction, mais, morphologiquement, ils sont formés de deux composantes principales; le corps cellulaire, appelé aussi le péricaryon, le centre biosynthétique et métabolique d'un neurone, ainsi que les prolongements nerveux : les dendrites et les axones [5].

Les dendrites sont des prolongements courts et ramifiés formant la principale structure réceptrice des neurones. Ils transmettent les influx nerveux vers le corps cellulaire. Ils sont

hérissés de petites excroissances au niveau de leur membrane plasmique, ces protubérances sont appelées épines dendritiques et constituent des points de contact avec d'autres neurones.

Chaque neurone possède un seul axone, qui trouve son origine d'une région du corps cellulaire appelée le cône d'émergence, c'est l'unité conductrice du neurone, elle conduit les potentiels d'action vers les effecteurs cibles ; comme par exemple les cellules musculaires ou glandulaires [fig. 2.2].

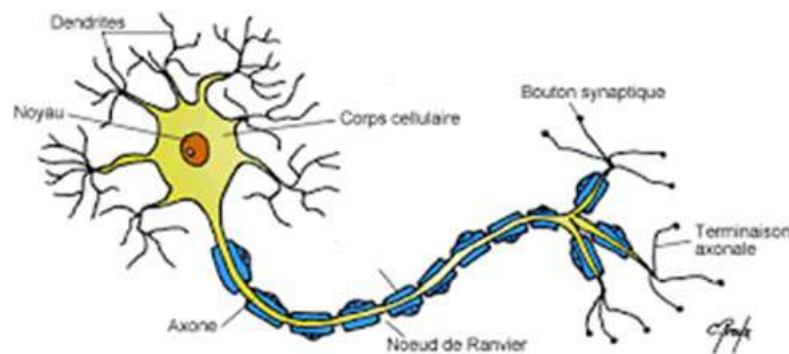


FIGURE 2.2 **Structure d'un neurone.** Un neurone est formé de deux composantes principales ; le corps cellulaire et les prolongements nerveux : les dendrites et les axones

Il existe deux classifications neuronales selon la structure ou la fonction.

2.1.2.1 Classification structurale

Cette classification tient compte du nombre de prolongement(s) qui émerge(nt) du corps cellulaire [3]. On retiendra trois groupes [fig. 2.3] :

- **Les neurones multipolaires**, ce sont les neurones les plus abondants dans le SNC, ils possèdent trois prolongements ou plus, tels que par exemple les neurones pyramidaux ou les interneurons.
- **Les neurones bipolaires**, ils possèdent deux prolongements, un axone et une dendrite. Ce sont des neurones rares, on les trouve au niveau de la rétine et dans la muqueuse olfactive où ils jouent le rôle de cellules réceptrices comme par exemple : les cônes et les bâtonnets.
- **Les neurones unipolaires ou pseudo-unipolaires** possèdent un seul prolongement, qui émerge du corps cellulaire à partir duquel va se former un prolongement périphérique dirigé vers les récepteurs sensoriels et un prolongement central pénétrant dans le SNC.

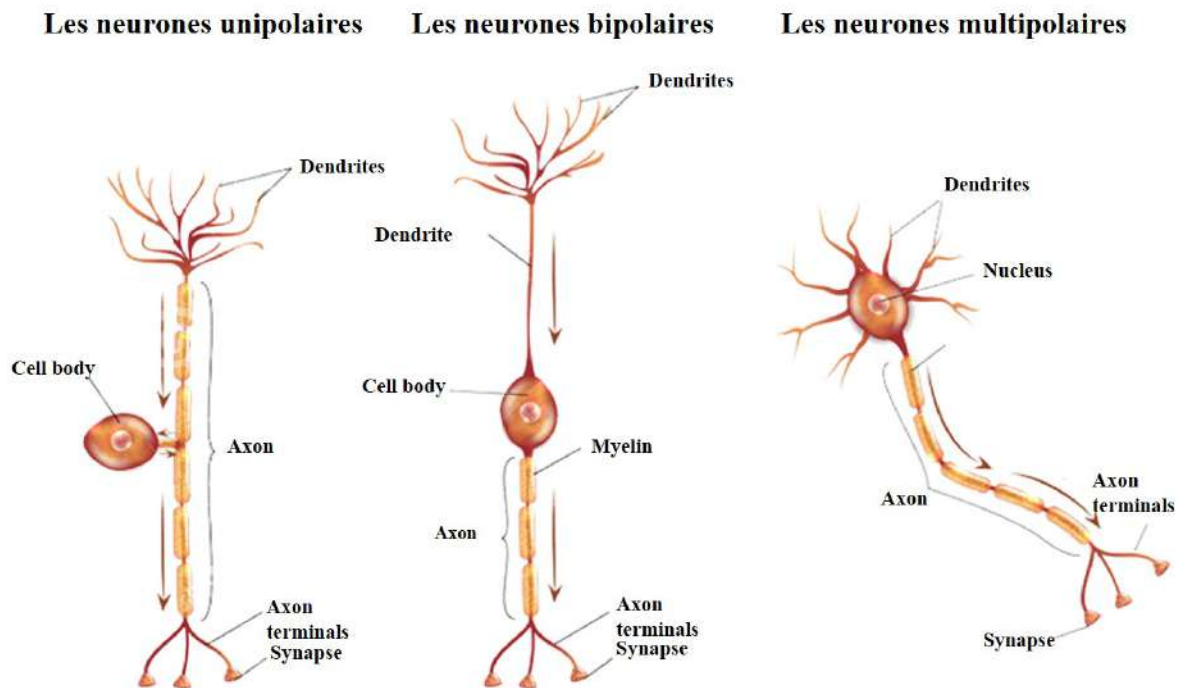


FIGURE 2.3 Les différents types de neurones selon leurs structures dans la moelle spinale. Les neurones se distinguent par leur structure en tenant compte du nombre de prolongement(s) qui émerge(nt) de leur corps cellulaire. On les classe en 3 types : les neurones unipolaires, bipolaires et multipolaires.

2.1.2.2 Classification fonctionnelle

Cette classification tient compte du sens de la propagation du potentiel d'action par rapport au SNC, il y a de ce fait trois types de neurones [3] :

- **Neurones sensitifs ou afférents**, transmettent l'influx de la périphérie vers le SNC.
- **Neurones moteurs ou efférents**, transmettent l'information du cerveau vers l'organe effecteur (le muscle par exemple).
- **Interneurones ou d'association**, ils servent de relais entre les deux types de neurones précédents.

2.1.3 Les cellules gliales

Les cellules gliales ou névroglie ou neuroglie ou glie constituent la population cellulaire la plus abondante du système nerveux. Elle a été caractérisée, la première fois, par Rudolf Virchow en 1846, comme étant des cellules « gluantes », assurant principalement un rôle de soutien structurel et métabolique aux neurones, d'où le terme « glie » signifiant « gluant », auquel s'ajoute le terme « neuro » d'où neuroglie, la glue des neurones [16].

2.1.3.1 Les Oligodendrocytes

Les oligodendrocytes (OLs) sont les cellules myélinisantes du SNC par opposition aux cellules de Schwann, les cellules myélinisantes du SNP. Afin d'acquies ce rôle essentiel de formation de myéline, ces cellules passent par trois stades distincts : prolifération, différenciation et migration [17].

Développement :

Au cours du développement, la majorité des OLs se développent à partir de leurs précurseurs oligodendrocytaires (OPCs) originaires d'un sous-ensemble de précurseurs neuroépithéliaux ventraux du domaine pMN sous l'influence des facteurs de transcriptions Olig1/2, NKx2.2 et Sox10 [18]. L'identification spatio-temporelle des OPCs est basée sur leur localisation anatomique et leur profil antigénique distinct.

Ces cellules subissent différentes vagues de prolifération pendant le développement embryonnaire. Par exemple, chez les souris, il a été démontré que la première vague d'OPCs provient du domaine pMN (motor neuron progenitor domain) du tube neural ventral au 12ème jour embryonnaire (E12.5) [19, 20]. Au 15ème jour embryonnaire, une seconde vague d'OPCs apparaît de la partie dorsale du tube neural, régulée par les facteurs Dbx1 et Ascl1 [21]. Enfin, une troisième vague d'OPCs apparaît à la naissance. celle-ci représente 10 à 20% des OPCs retrouvés à l'âge adulte [17]. Chez une souris adulte, les OPC représentent 8 à 9% des cellules de la substance blanche et 2 à 3% des cellules de la substance grise [fig. 2.4].

Migration :

Les OPCs, nouvellement formés, migrent, guidés par une multitude de facteurs impliquant des molécules présentes dans leur environnement, afin d'atteindre leur destination finale [22]. Ces facteurs peuvent être des facteurs de croissance favorisant cette migration, tels que, platelet derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF) et hepatocyte growth factor (HGF), ainsi que des protéines de la matrice extracellulaire telles que lamine, fibronectine, vitronectine. A cela, s'ajoute des signaux permissifs ou répulsifs de la guidance axonale influençant la direction de la migration des OPCs via des molécules d'adhésions telles que les sémaphorines ou la netrin-1 [fig. 2.5].

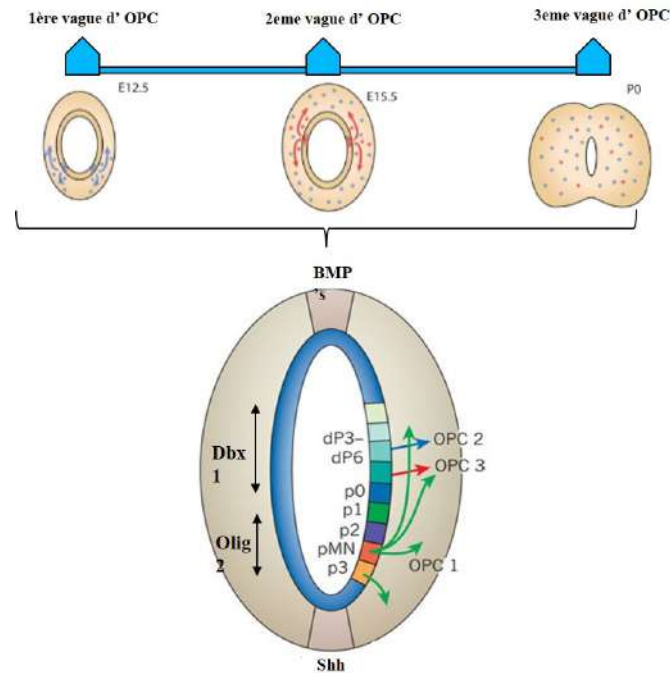


FIGURE 2.4 **Représentation schématique du développement des oligodendrocytes (OL) et des différents stades de maturation.** Les cellules précurseurs oligodendrocytaire (OPC) proviennent des zones neuroépithéliales où les cellules souches neurales (NSC) se différencient en (OPC) sous l'influence de facteurs de transcription Olig1/2, NKx2.2 et Sox10. Ces OPC migrent via des vaisseaux sanguins, tout en favorisant l'angiogenèse de manière dépendante de HIF1 α afin d'atteindre leur destination finale, les OPC prolifèrent pour élargir le pool d'OPC, sous la régulation de facteurs de transcription tels que Id2, Id4, Tcf4 et Hes5. Lorsque la prolifération est inhibée, les OL se différencient en OL prémyélinisants (pré-OL), et enfin en OL matures qui enveloppent les axones neuronaux avec des gaines de myéline, sous l'influence de Myrf. D'après [17]

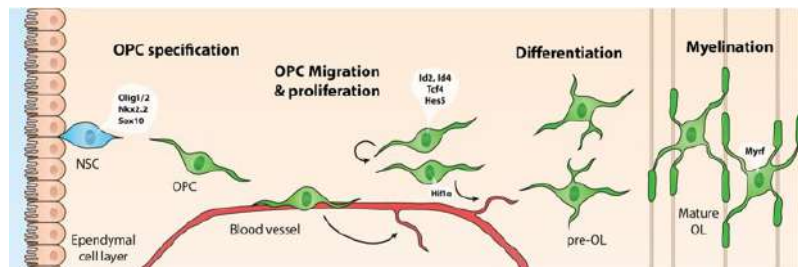


FIGURE 2.5 **Représentation schématique des zones d'émergence des cellules précurseurs des oligodendrocytes durant le développement.** Au cours de développement, on distingue trois vagues de prolifération d'OPC sous la dépendance d'un gradient de concentration des facteurs Shh et BMP selon l'axe dorso-ventral. La première vague d'OPC provient du domaine pMN du tube neural ventral des cellules expriment Olig2 à E12.5. A E15 une deuxième vague se met en place afin de développer les OPC dorsale via des cellules exprimant olig2 des domaine dp3, dp5 et dp6 sous l'influence du Dbx1 et enfin une troisième vague d'OPC apparaît après la naissance. D'après [17]

Maturation et myélinisation :

Dès leur arrivée à leur localisation cible, les OPCs commencent à proliférer afin de garder un « pool » cellulaire d'OPCs suffisant [23].

La régulation de cette prolifération lors du développement est contrôlée par des facteurs qui favorisent la prolifération et qui dans le même temps inhibent la différenciation tels que le PDGF, [24], les voies de signalisation Wnt et Notch [25] et à l'opposé des facteurs tels que endotheline 2, la voie de signalisation IGF1 qui eux vont favoriser la différenciation.

La favorisation de la différenciation ainsi que la levée d'inhibition de ces facteurs permettent aux OPCs de subir des changements morphologiques, accompagnés par l'expression de différents marqueurs cellulaires et de facteurs de transcription [26]. Les OPCs qui expriment alors; Olig 1/2, NG2, A2B5, PDGF α , Sox10, NKx2.2, Dm20 et Cnp se différencient en pré-oligodendrocytes (pré-OLs) caractérisés par l'expression du marqueur O4. Ces derniers vont se différencier en oligodendrocytes (OLs) matures exprimant; PLP, APC, GalC et MBP. Enfin, les OLs matures myélinisants responsables de la synthèse de la gaine de myéline se caractérisent par l'expression notamment de MOG [27]. Cette maturation a lieu sous l'influence du facteur de transcription Myrf (myelin regulatory factor) [28].

A ce stade de maturation, les OLs matures commencent à exprimer des protéines spécifiques de la myéline, telles que, PLP (Proteolipid Protein), MBP (Myelin Basic Protein), CNPase, MAG (myelin-associated glycoprotein) et en dernier lieu, MOG (Myelin-Oligodendrocyte glycoprotein) qui est le signal final de la maturation oligodendrocytaire et permettant la stabilisation de la gaine de myéline. Ces marqueurs sont notamment utilisés afin de déterminer le stade précis de maturation des OLs [fig. 2.6].

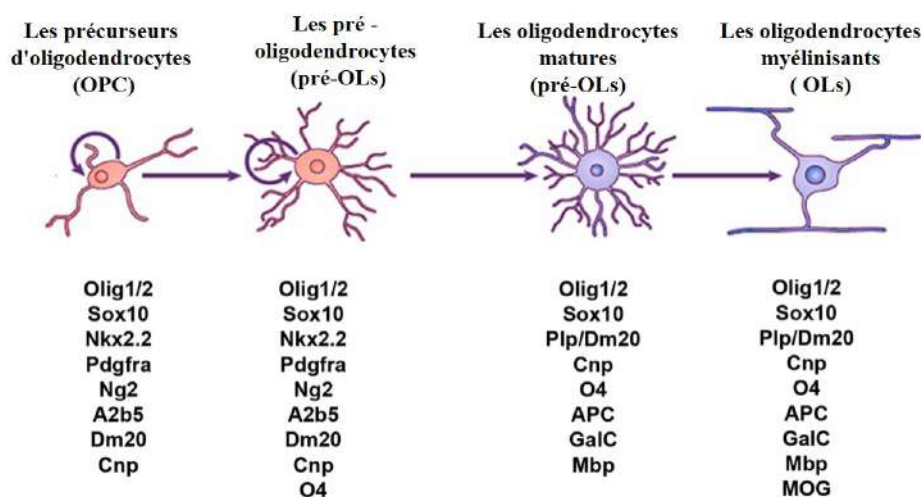


FIGURE 2.6 Représentation schématique des différentes étapes de maturation des oligodendrocytes. Les étapes de maturation des OPC, pré-OL, OL matures et OL myélinisants sont identifiables grâce à leurs caractéristiques morphologiques (en haut) et antigéniques (en bas). D'après [29]

Le rôle principal de ces cellules est la formation de la gaine de myéline qui correspond à

l'enroulement de la membrane plasmique des OLs autour de l'axone. Plusieurs signaux intrinsèques et extrinsèques sont impliqués dans ce processus via le déclenchement du remodelage du cytosquelette d'actine afin d'achever la compaction autour de l'axone [30]. Cette gaine agit comme un isolant électrique, elle permet d'augmenter la vitesse de conduction du potentiel d'action.

2.1.3.2 Les astrocytes

Les astrocytes forment la population cellulaire la plus abondante du SNC. Elle en constitue 30% de ses cellules [31]. Cette population joue des rôles clés dans les processus physiologiques du SNC, tels que, le maintien de l'homéostasie métabolique, la formation des barrières hémato médullaire et hémato encéphalique, la régulation du flux sanguin, et la participation à la signalisation calcique et au synapse tripartite [32].

Les astrocytes sont une population très hétérogène de cellules de par leur phénotype, leur morphologie et du fait de la diversité de leurs origines développementales [33]. Classiquement, on peut distinguer deux types d'astrocytes : les protoplasmiques localisés au niveau de la substance grise et qui possèdent de nombreuses ramifications courtes et les astrocytes fibreux repartis au sein de la substance blanche et arborant des ramifications plus fines et plus longues [fig. 2.7] [34].

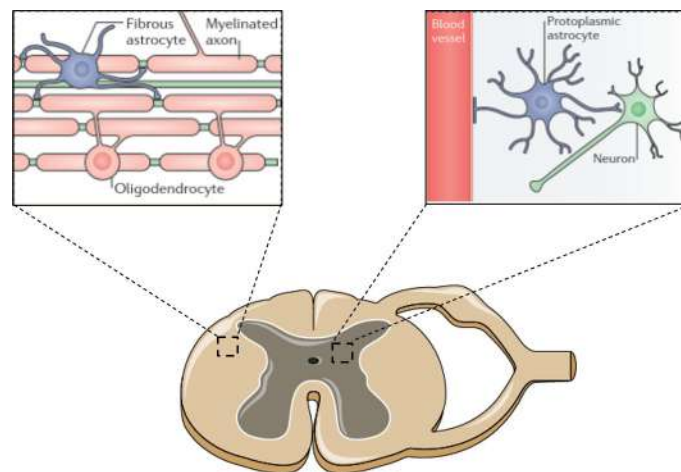


FIGURE 2.7 Localisation des astrocytes fibreux et protoplasmiques au niveau de la moelle spinale. D'après [33]

Au cours du développement, les astrocytes se développent à partir de précurseurs ventraux originaires des domaines p1, p2 et p3 et sous l'influence des facteurs de transcriptions Pax6 et NKx6.1 donnant ainsi les trois sous-populations astrocytaires VA1, VA2 et VA3 [35].

L'identification de ces trois sous-populations est basée sur leur expression du Slit1 (slit guidance ligand 1) et de la reelin. Ces deux derniers jouent un rôle crucial dans le processus de migration et de positionnement au niveau de la substance blanche de la moelle en développement [fig. 2.8] [36].

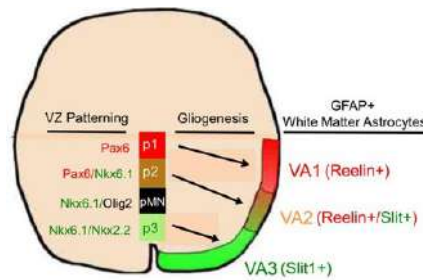


FIGURE 2.8 Représentation schématique des zones d'émergence des astrocytes durant le développement.
 Au cours de développement, les astrocytes se développent à partir des précurseurs ventraux originaires des domaines p1, p2 et p3 sous l'influence des facteurs Pax6 et NKx6.1, donnant naissance aux trois sous-populations astrocytaires les VA1 (qui expriment PAX6 et la reelin, dérivés de p1) les plus dorsaux, VA3 (qui expriment NKx6.1 et SLIT1, dérivés de p3) les plus ventraux et les astrocytes VA2 (qui expriment PAX6, NKx6.1, reelin et SLIT1, dérivés de p3) sont situés dans un domaine intermédiaire de la matière blanche. D'après [37]

2.1.3.3 Les cellules épendymaires

Les cellules épendymaires sont des cellules ciliées qui tapissent les parois du système ventriculaire et le canal central de la moelle spinale. Elles forment une barrière continue entre le liquide cébrospinal (LCS) et le parenchyme nerveux adjacent, contrôlant ainsi la propulsion du flux de LCS.

Origine développementale des cellules épendymaires : Vers E12, les parties dorsales du neuroépithélium formant la paroi du canal central primitif vont fusionner entraînant la réduction de la lumière du canal. Entre E13.5 et E15.5, les cellules radiaires présentes au niveau de la partie ventrale du tube neural vont changer de mode de division et vont se diviser asymétriquement afin de donner naissance à E15.5 aux cellules épendymaires au niveau du canal central primitif [38]. Elles dérivent principalement des cellules des domaines pMN et p2 exprimant le facteur de transcription NKx6.1 sous dépendance du gradient de Shh issu de la plaque du plancher du tube neural [39].

Vers P8 à P10, il a été démontré la naissance d'une seconde vague de cellules épendymaires [40, 41]. Cette division va permettre l'élongation du canal central pendant la croissance de la moelle spinale [fig. 2.9].

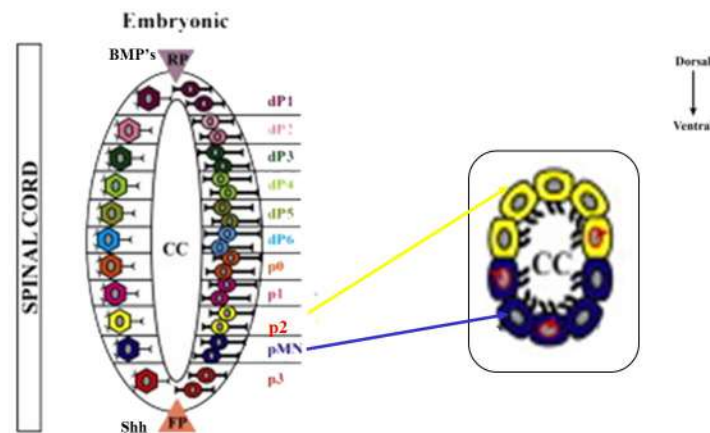


FIGURE 2.9 Représentation schématique des zones d'émergence des cellules épendymaires du canal central de la moelle spinale. Durant la phase tardive du développement embryonnaire, la gliogénèse se met en place, les cellules épendymaires du CC (canal central) commencent à dériver principalement des cellules exprimant NKx6.1 au niveau des domaines pMN et p2 dès E 15.5. D'après [42]

La diversité cellulaire du canal central : Le canal central est un épithélium pseudo-stratifié, composé de plusieurs types cellulaires en contact direct avec la lumière du canal ou en position sous-épendymaire [43]. Majoritairement, le canal central adulte est composé par des cellules épendymaires ciliées en contact avec le LCS avec une disposition divergente polarisée aux niveaux dorsal et ventral du canal.

Actuellement, on distingue quatre types de cellules au niveau du canal [fig. 2.10] :

- **Les cellules épendymaires ciliées** en contact avec le LCS révélant une certaine hétérogénéité morphologique entre elles
- **Les tanocytes ou cellules épendymaire radiaires**
- **Les neurones en contact avec le LCS** (Cerebral-fluid contacting neurons CSF-N) présents dans les différents segments de la moelle spinale [44]. On distingue deux types de CSF-N : une population latérale et une ventrale qui diffèrent par leur origine développementale [45]. Ces cellules sont caractérisées par un profil électrophysiologique similaire à celui des neurones immatures, ainsi que par l'expression, même à l'âge adulte, du marqueur double cortine (DCX) [46]. Dans la moelle spinale adulte, la plupart de ces cellules neuronales sont des neurones GABAergiques suggérant qu'ils sont des neurones fonctionnels [47].
- **Les astrocytes en contact avec le canal central** (central-canal contacting astrocytes Accs) ce sont des cellules peu fréquentes au niveau du canal, leur présence a été

démontrée par une étude dans un modèle de souris transgénique hGFAP-CreER^{T2}::YFP. Ces cellules expriment également au niveau dorsal du canal le marqueur Nestin [48].

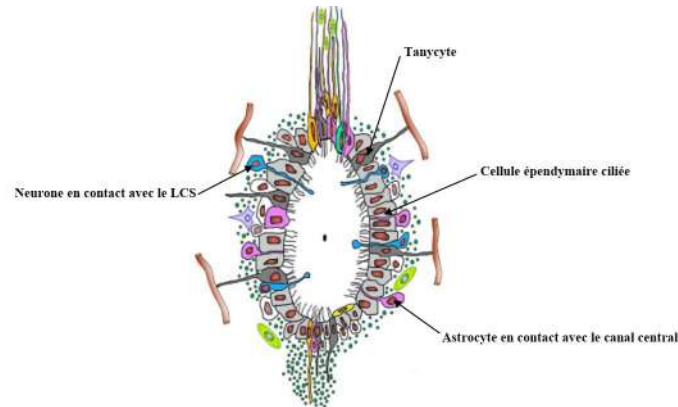


FIGURE 2.10 Composition cellulaire du canal central de la moelle spinale : On distingue quatre types de cellules au niveau du canal central. les cellules épendymaires ciliées, les tanocytes, les neurones en contact avec le liquide cérébrospinal (LCS) et les astrocytes en contact avec le canal central. D'après [43]

Identité moléculaire des cellules du canal central : Plusieurs marqueurs sont exprimés par les cellules du canal central, de l'embryogenèse à l'âge adulte, et traduisent l'hétérogénéité cellulaire et moléculaire de cette zone aussi bien au niveau spatial que temporel [fig. 2.11].

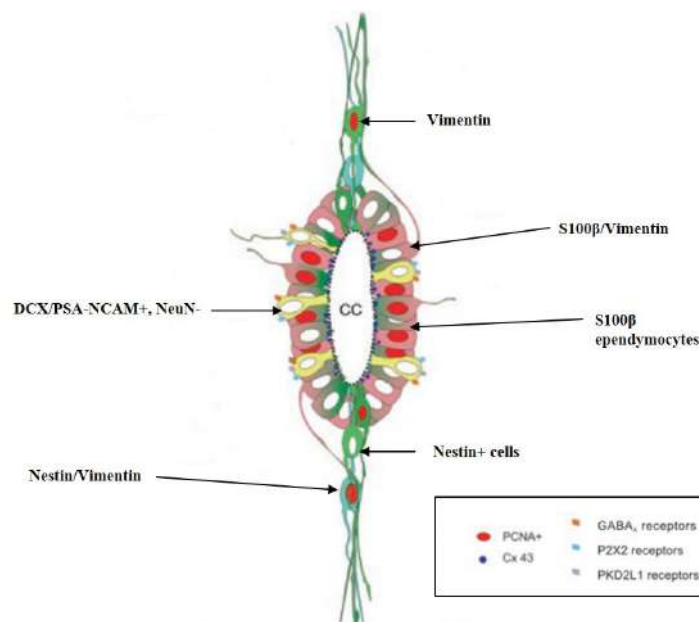


FIGURE 2.11 Identité moléculaire des cellules du canal central de la moelle spinale. D'après [49]

Diverses études ont montré selon la localisation de ces cellules au niveau du canal, qu'elles

exprimaient des protéines et des facteurs de transcription spécifiques. Par exemple, les cellules épendymaires se trouvant au niveau latéral du canal expriment le $S100\beta$ et sont Nestin négatives. Alors même qu'au niveau ventral et dorsal, les cellules expriment fortement ce marqueur de cellules souches, Nestin, et sont identifiées par leurs longs filaments qui se prolongent le long de la ligne dorsale [50]. Ces cellules coexpriment également Pax3, Ac11, NKx6.1, Olig2 et NKx2.2 qui sont, quant à eux, des marqueurs uniquement exprimés au niveau dorsal [51]. Sox2, sox9, CD15, CD133 ou CD24 correspondent à des marques associés aux progéniteurs cellulaires et sont exprimés par les cellules qui bordent le canal central dans son ensemble [52]. De récentes études montrent que toutes les cellules sox2-positives coexpriment également la connexine 50 [53].

Concernant les **CSF-N**, les neurones en contact avec le LCS au niveau du canal, ils maintiennent leurs profils embryologiques, en exprimant NKx6.1, NKx2.2, FOXA2 et GATA2/3 ainsi que certains marqueurs spécifiques, permettant de les identifier, tel que le PKD2L1 et PKD1L2 [54].

Les cellules épendymaires, étant des cellules ciliées, expriment plusieurs types de marqueurs liées à la ciliogenèse. Un de ces marqueurs permettant leur identification au sein du SNC est le FoxJ1 (Forkhead box J1). Ce marqueur est décrit comme régulateur majeur de la multiciliogénèse lors du développement et qui reste toujours exprimé par les cellules ciliées à cils motiles, même à l'âge adulte [41, 52]. On retrouve ce marqueur dans divers tissus tels que le plexus choroïde, les testicules, l'épithélium pulmonaire et l'oviducte [55–57].

Dans la moelle spinale, à E15.5-E17.5 l'expression de FoxJ1 est restreinte aux cellules épendymaires bordant le canal et aux progéniteurs astrocytaires sox9, GFAP et vimentine positifs [fig. 2.12] [58]. En effet, il a été démontré que l'expression de FoxJ1 par les cellules radiaires était essentielle pour la différenciation de ces cellules en cellules épendymaires ou en sous types d'astrocytes. De même, cette expression de FoxJ1 est indispensable durant la neurogenèse néonatale au niveau des bulbes olfactifs [59].

De ce fait, le facteur de transcription FoxJ1 n'est pas qu'essentiel à la régulation de la ciliogenèse mais l'est également durant la régulation de la différenciation cellulaire de certains progéniteurs au cours du développement [60]. Par ailleurs, l'absence de ce dernier entraîne d'importantes anomalies, tel que l'hydrocéphalie définie par une accumulation excessive de LCS, empêchant l'embryon d'arriver à terme [61]. Enfin, il est important de noter que d'un point de vue expérimental, afin de faciliter l'identification des cellules épendymaires et de les suivre, ainsi que leur « progénie » au cours du temps, un modèle de souris transgénique

hFoxJ1-CreER^{T2}::tdTomato utilisant le promoteur humain du FoxJ1 est disponible.

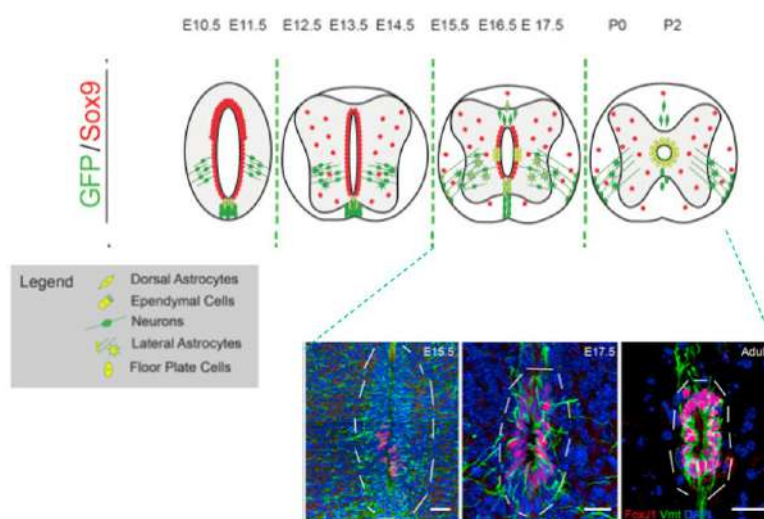


FIGURE 2.12 Représentation schématique de la distribution de l'expression de FoxJ1 selon l'axe dorso-ventral de la moelle spinale durant le développement de E10.5 à P2. Une restriction d'expression de FoxJ1 aux cellules épendymaires bordant le canal à E15.5-E17.5 et aux progéniteurs astrocytaires sox9, et vimentine positifs. D'après [60]

Le caractère souche des cellules épendymaires : les cellules souches endogènes de la moelle spinale : En premier lieu, il est important de rappeler les deux critères qui permettent de définir le caractère souche d'un type cellulaire donné ; à savoir le potentiel d'auto-renouvellement et la multipotence.

Pendant des décennies, on pensait que le SNC était une structure fixe, et que les neurones qui le peuplaient n'étaient pas remplacés, contrairement à ce qui peut être observé à d'autres endroits du corps dans lesquels persistent une population de cellules souches, comme c'est le cas par exemple, au niveau de la peau. De ce fait durant cette période, il était imaginé que nous disposions à la naissance d'un « pool » de neurones et que celui-ci ne faisait que diminuer au cours de la vie. Il a fallu attendre le début des années 60, et la mise au point de méthodes de détection permettant de visualiser la division cellulaire, notamment par le biais de la thymidine tritiée (thymidine-H3), pour qu'Altman et son équipe démontrent pour la première fois l'existence d'une prolifération cellulaire dans le cerveau chez le rat [62].

Durant des années, les avancées en termes d'innovations méthodologiques, ont permis de confirmer l'existence de la neurogenèse adulte ; qui désigne ainsi la formation de nouveaux neurones à partir de cellules souches neurales (NSC) qui vont ensuite intégrer les circuits cérébraux existants.

Cette neurogenèse est principalement confinée à deux structures cérébrales :

- L'hippocampe, précisément au niveau de la zone sous-granulaire du gyrus denté
- Le bulbe olfactif où dans ce cas précis la neurogenèse commence au niveau de la zone sous-ventriculaire où les NSC prolifèrent et migrent le long de la voie de migration rostrale pour enfin atteindre le bulbe olfactif ; lieu de leur différenciation neuronale

Une fois l'existence de cette neurogenèse au niveau cérébral confirmée, les chercheurs ont voulu savoir si ce potentiel neurogénique n'était restreint qu'au cerveau. Ainsi, leurs travaux ont conduit, en premier lieu, à la recherche d'un potentiel d'un autre « pool » de cellules souches neurales au sein de la moelle spinale.

Ces investigations ont commencé en 1962 lorsqu'Adrian et Walker ont pu observer, pour la première fois, une prolifération cellulaire au sein de la moelle spinale chez une souris adulte, en utilisant de la thymidine après lésion médullaire [63].

Plusieurs études se sont alors intéressées à cette population cellulaire issue de la moelle spinale et présentant des similitudes phénotypiques avec les NSC, notamment en exprimant les mêmes marqueurs spécifiques tel que Nestin, cd33, cd15, sox2, BLBP et PSA-NCAM [43].

En 1996, Weiss et al. se sont intéressés à cette population cellulaire. leur étude reste la référence car elle a permis de mettre en évidence le potentiel souche de la moelle spinale *in vitro*. Ce travail fut basé sur la réalisation de culture de neurosphères de segments thoraciques et lombaires de moelle spinale chez la souris, en présence de facteurs de croissance tels que le EGF et FGF. En présence de ces facteurs, les cellules souches neurales se mettent à proliférer et forment des neurosphères. De plus, en absence de ces mêmes facteurs, ces cellules vont pouvoir se différencier ; majoritairement en astrocytes, et minoritairement en OLs, et en neurones [fig. 2.13] [64].

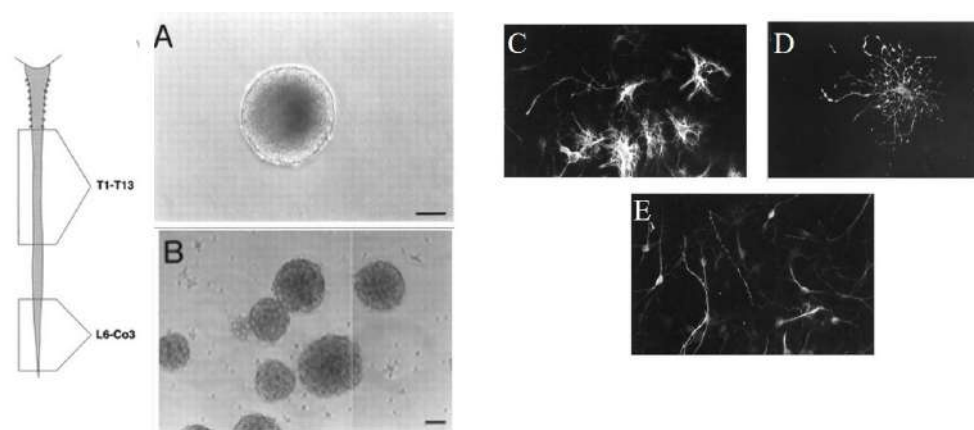


FIGURE 2.13 **La mise en évidence du potentiel souche de la moelle spinale *in vitro*.** Les neurosphères générées par culture des segments thoracique T1-T13 et lombaires L6-Co3 de moelle spinale de souris adulte en présence des facteurs EGF et FGF A) neurosphères primaire B) neurosphères secondaires générées de la dissociation des premières neurosphères C,D et E représentent les cellules différenciées des neurosphères secondaires en absence de facteurs de croissance : astrocytes, oligodendrocytes et neurones respectivement. D'après [64]

Après avoir prouvé la présence d'une population cellulaire au potentiel souche au sein de la moelle spinale, la question s'est alors posée de déterminer l'origine cellulaire ainsi que la localisation anatomique de ces cellules au niveau de la moelle.

Plusieurs études se sont intéressées alors à localiser ces cellules en utilisant différents types de techniques. En 1999, Johansson et al. ont démontré, par l'injection interventriculaire d'un traceur; le DiI au niveau du LCS et par la mise en culture de la paroi du ventricule latéral et de la moelle spinale, que ces tissus généraient des neurosphères fluorescentes *in vitro*. Ceci a confirmé que les neurosphères étaient issues des cellules bordant les ventricules cérébraux et le canal central de la moelle spinale. Johansson et al. ont également constaté *in vivo* qu'une faible incorporation de BrdU était observée au cours du temps par les cellules bordant le canal central [65].

D'autres équipes ont basé leurs investigations sur des techniques de microdissection et des analyses cytométriques. Ils ont ainsi pu montrer que ces cellules souches sont bien les cellules bordant le canal central de la moelle spinale [66, 67].

Toutefois, d'autres études contredisent le fait que ce potentiel souche n'est restreint qu'aux cellules bordant le canal central. En effet, certaines mettent en avant le fait que ce potentiel existe également au niveau du parenchyme médullaire et que ce tissu peut également générer des neurosphères [68, 69]. Cependant, le potentiel souche de ces cellules diffère de celui de celles présentes au niveau du canal central, en effet leur potentiel d'auto-renouvellement est limité; les neurosphères formées à partir du parenchyme médullaire ne pouvant être remises en

culture après dissociation que deux à trois fois [70].

La capacité souche de la moelle semble toutefois différer en fonction de la localisation anatomique considérée; en effet, certaines études mettent en évidence le fait que la moelle lombaire ne génère que peu ou pas de neurosphères [64]. Chez l'homme, notamment, les neurosphères obtenues à partir de biopsies issues de la zone lombaire possèdent un potentiel d'auto-renouvellement limité [71].

Il apparaît ainsi que le long de l'axe rostro-caudale de la moelle, les neurosphères formées ont des propriétés différentes [72] et expriment des combinaisons de marqueurs différents. Ceci tend à prouver l'hétérogénéité moléculaire en fonction de la localisation anatomique des cellules souches endogènes de la moelle spinale.

Selon l'axe dorso-ventral du canal central, les neurosphères qui ont dérivé des cellules dorsales expriment des marqueurs spécifiques des cellules de la glie radiaire tels que BLBP, RC2 et Glast, [73, 74] et également des marqueurs spécifiques de la lignée oligodendrocytaire tels que olig 2, NG2, NKx2.2, PDGF α et MBP [74, 75]. Ceci peut expliquer le fait que ces neurosphères se différencient majoritairement en oligodendrocytes *in vitro* [76].

Ces cellules souches endogènes de la moelle présentent plusieurs points communs avec les cellules souches de la SVZ. Premièrement, cette région épendymaire est richement vascularisée [73]. Deuxièmement, la niche de la moelle spinale maintient, comme décrit précédemment, un « pool » de cellules de type radial glia-like cells au niveau dorsal exprimant Nestin, BLBP et CD15. Enfin, comme au niveau de la SVZ, la niche médullaire surexprime DAN, un antagoniste de la famille des protéines BMPs, facteur de différenciation des cellules souches, [75, 77]; son homologue le noggin est exprimé au niveau de la SVZ : [78]. Ces protéines vont inhiber la différenciation de ces NSC et maintiennent ainsi le potentiel souche de ces cellules jusqu'à l'âge adulte [fig. 2.14].

Enfin, la moelle spinale, pourtant encore parfois décrite comme une simple voie de communication entre le cerveau et les organes cibles situés à la périphérie du corps, constitue une niche de NSC au sein du SNC. En effet, les cellules souches qui s'y trouvent possèdent une cartographie cellulaire complexe et dynamique et dont la réactivité et le potentiel méritent une attention particulière notamment dans un cadre lésionnel.

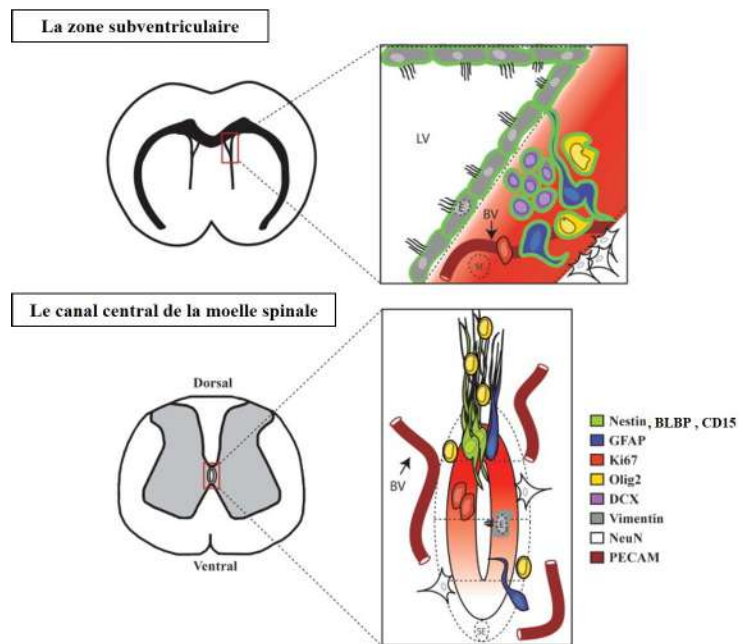


FIGURE 2.14 **Illustration comparative des deux niches du système nerveux central.** la zone subventriculaire et le canal central de la moelle spinale. D'après [73]

Chapitre 3

Les traumatismes médullaires : une physiopathologie complexe et évolutive

3.1 La Lésion médullaire

La lésion médullaire est une affection complexe qui peut résulter d'événements traumatiques ou non traumatiques comme des affections : tumorales, vasculaires, inflammatoires, infectieuses, toxiques, malformatives ou dégénératives. Une lésion médullaire traumatique (LMT) se produit lorsqu'une force physique externe endommage la moelle spinale et entraîne des déficits moteurs et/ou sensoriels. Suite à une LMT, les patients peuvent souffrir d'une paraplégie ou d'une tétraplégie.

On définit la tétraplégie quand le patient présente un déficit ou une perte des fonctions motrices et/ou sensibles dans les segments cervicaux, touchant les membres supérieurs et inférieurs, et la paraplégie lorsqu'il y a un déficit ou perte des fonctions motrices et/ou sensibles dans les segments thoraciques, lombaires et sacrés de la moelle. La paraplégie est caractérisée par une préservation des fonctionnements des membres supérieurs [fig. 3.1].

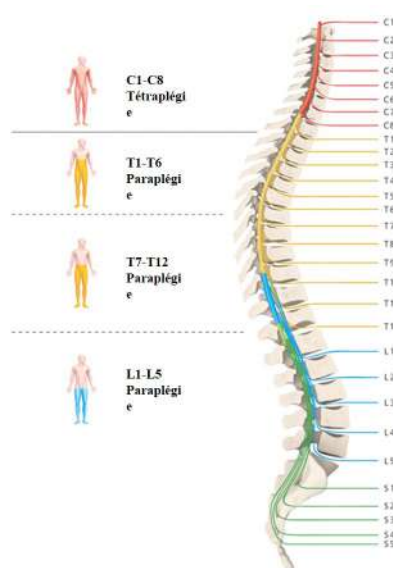


FIGURE 3.1 Classification des paralysies en fonction du niveau de la lésion de la moelle spinale. La nature et l'étendue des déficits d'une LMT varient en fonction du niveau de l'atteinte lésionnelle.

La nature et l'étendue des déficits d'une LMT varient donc en fonction du niveau de l'atteinte lésionnelle et également en fonction de sa sévérité [79]. Selon l'organisation mondiale de la santé, on estime entre 250 000 et 500 milles nouveaux cas de la lésions médullaires traumatiques ou non-traumatiques par an dans le monde. La prévalence des LMTs en France était de 250 cas /million d'habitants en 2014 [80].

Les principales étiologies des LMTs sont principalement [81] :

- Les accidents de la route (38%)
- Les chutes (30.5%)
- La violence (13.5%)
- Les activités sportives (9%)
- Autres (9%)

Deux profils de patients atteints de LMTs sont majoritairement constatés. Une première catégorie concerne des patients entre 16 et 30 ans et une deuxième touche une population de patients âgées de plus de 60 ans. L'âge moyen de survenue des LMTs augmente régulièrement, il était de 29 ans en 1970 et est passé à 42 ans en 2016. Dans 80% des cas, les LMTs se produisent chez des hommes [82].

Cependant, du fait du vieillissement de la population, on peut prédire que la fréquence de ces traumatismes devrait augmenter dans l'avenir chez les personnes de plus de 60 ans. La prise en charge et les conséquences chez ces patients posent des problèmes spécifiques, aussi bien sur le plan médical que socio-économique.

3.1.1 Complication

La lésion médullaire a des conséquences immédiates et dramatiques sur les grands systèmes physiologiques. La compréhension et le traitement des désordres induits par le traumatisme médullaire sont essentiels à la prise en charge immédiate de ces patients. Parmi ces complications immédiates couramment signalées, on mentionne :

- Les complications respiratoires, première cause de mortalité
- Les complications hémodynamiques (telles que les thromboemboliques)
- Les complications uro-néphrologiques, première cause de morbidité
- Les complications digestives

Ces complications immédiates sont suivies par des complications secondaires telles que [83] :

- Des douleurs
- Des troubles de décubitus (escarres)

- Des complications cardiovasculaires (hypotension, bradycardie, dysautonomie)
- Des souffrances psychologiques
- Des complications neuro-orthopédiques (cals vicieux – pseudarthrose)

Ces troubles dépendent du niveau et de la gravité de la lésion, en effet, plus celle-ci se situe en haut de la moelle spinale, plus les conséquences s'aggravent et plus le risque de décès augmente.

3.1.2 Évaluation clinique initiale

L'évaluation des troubles présents chez un lésé médullaire se base sur un examen clinique neurologique complet, qui détermine le niveau lésionnel, le caractère complet ou non de la LMT et une analyse des déficits moteurs et sensitifs.

On sait qu'en matière de pronostic, tout se joue au moment du choc pour les lésions traumatiques et dans les heures qui suivent l'installation de la paraplégie. Quant au diagnostic, les praticiens peuvent déterminer le degré d'atteinte en fonction de la classification internationale américaine de la lésion médullaire ASIA (American Spinal Injury Association). Ci-dessous sont présentées les caractéristiques de cette classification [fig. 3.2] :

- A = Complet : aucune sensibilité ou motricité dans le territoire S4-S5.
- B = Incomplet sensitif : la sensibilité est préservée mais pas la motricité au-dessous du niveau lésionnel, en particulier dans le territoire S4-S5.
- C = Incomplet moteur : la motricité est préservée au-dessous du niveau lésionnel et plus de la moitié des muscles testés au-dessous de ce niveau a un score < 3 (motricité non fonctionnelle).
- D = Incomplet moteur : la motricité est préservée au-dessous du niveau lésionnel et au moins la moitié des muscles testés au-dessous de ce niveau a un score ≤ 3 .
- E = Normal : la sensibilité et la motricité sont normales. Des anomalies des réflexes peuvent pourtant persister.

Cette classification est aussi utilisée pour évaluer les changements (ou la réponse) obtenus grâce à des interventions de réadaptation à la suite de la lésion. Elle comprend :

- Une échelle d'évaluation de la force motrice est effectuée comme suit :
 1. Pas de contraction ou de mouvement
 2. Mouvement minimal (visible ou palpable) sans déplacement perceptible
 3. Mouvement actif mais pas contre la gravité
 4. Mouvement actif contre la gravité du segment mobilisé
 5. Mouvement actif contre la gravité avec résistance modérée
 6. Mouvement actif contre la résistance complète
- Une échelle d'évaluation sensitive (toucher léger et piquûre)
 1. un score de zéro est attribué si le patient ne peut pas faire de différence de sensation cutanée entre la pointe d'une épingle acérée et le bord plat de cette même épingle
 2. Avec facultés affaiblies ou hyperesthésie (allodynie mécanique)
 3. Intact
- Une évaluation de la contraction anale volontaire
- Une évaluation de la sensation anale

3.1.3 La prise en charge

L'objectif initial est de s'assurer de prendre en charge le patient lésé rapidement afin de garantir la stabilisation de ces fonctions vitales dans les meilleurs délais, et ceci en contrôlant la ventilation, la stabilisation du rachis, notamment après lésion cervicale, les paramètres hémodynamiques et l'hémostase, rechercher des éventuelles lésions associées et prévenir et traiter une éventuelle hypothermie. Tout cela afin de limiter le risque de la lésion secondaire de la moelle spinale.

Une fois stabilisé, le patient est dirigé vers un centre hospitalier où aura lieu un examen neurologique détaillé. L'équipe médicale évaluera alors la nécessité d'une intervention neurochirurgicale. Cette intervention consiste à la décompression médullaire afin de limiter la propagation de la lésion du fait notamment de la compression ischémique [84]. Des études cliniques montrent qu'une intervention chirurgicale moins de 12h après la LMT améliore le pronostic neurologique [85].

FIGURE 3.2 Classification de l’ASIA évaluant la motricité et la sensibilité des patients médullo-lésés. .

3.2 La physiopathologie de la lésion médullaire traumatique

Chronologiquement, la lésion médullaire se divise en deux grandes phases :

3.2.1 La phase primaire

Elle se caractérise par la destruction (déchirure ou altération) tissulaire induite par un traumatisme mécanique telle qu’une contusion, compression, lacération ou transection de la moelle. Cette lésion initiale se traduit par une destruction cellulaire qui engendre une rupture des faisceaux axonaux et des vaisseaux sanguins médullaires. Cette phase primaire est le début d’un ensemble d’évènements physiopathologiques complexes conduisant à une lésion secondaire [fig. 3.3].

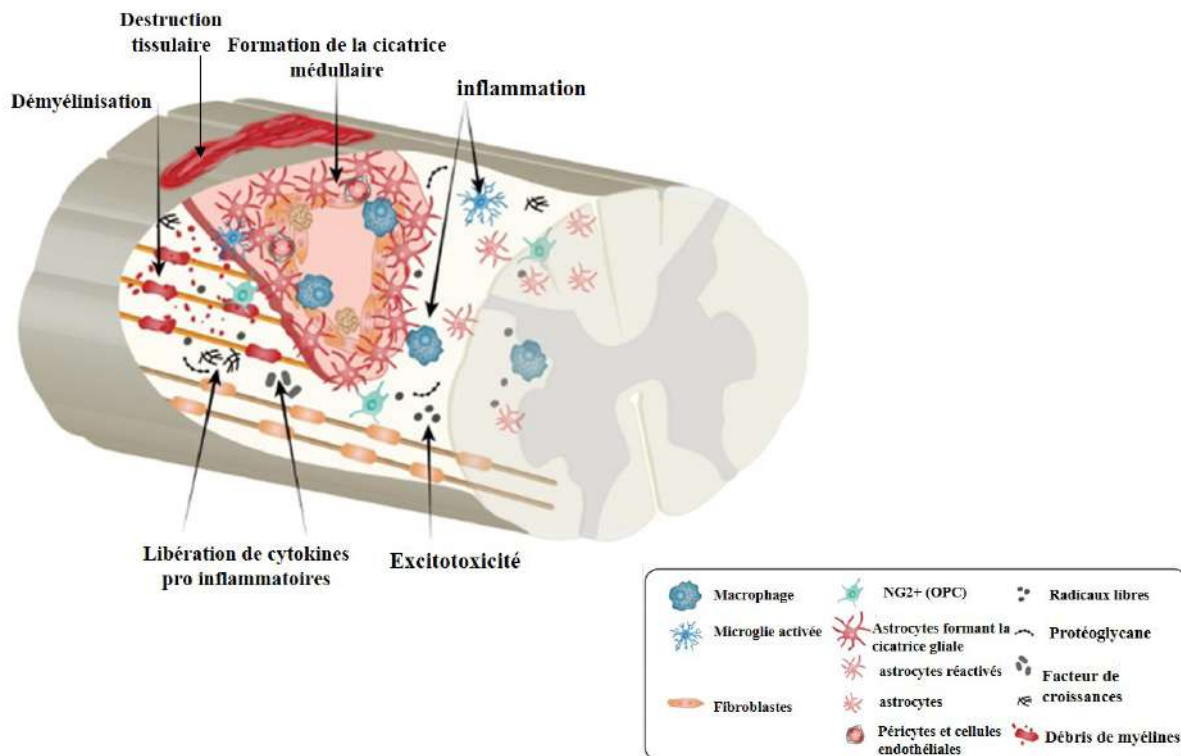


FIGURE 3.3 La physiopathologie de la lésion médullaire traumatique (LMT). La LMT se divise en deux grandes phases : la phase primaire (la destruction tissulaire, rupture des faisceaux axonaux et des vaisseaux sanguins médullaire et la phase secondaire (inflammation, Excitotoxicité, Démyélinisation et la mise en place de la cicatrice médullaire). D'après [86]

3.2.2 La phase secondaire

Plusieurs facteurs moléculaires et cellulaires participent à cette série d'évènements que constitue la phase secondaire et qui se traduit par l'amplification des dégâts initiaux et l'aggravation des déficits neurologiques et fonctionnels. Elle se divise en plusieurs phases, chacune d'elles se caractérisant par des évènements majeurs [fig. 3.4].

3.2.2.1 La phase immédiate ($\leq 2h$)

Lésion vasculaire, Œdème et ischémie :

Cette phase commence quelques minutes après la lésion primaire et correspond aux deux premières heures qui suivent le traumatisme. Elle est caractérisée par une nécrose cellulaire rapide, en particulier des cellules endothéliales, causant ainsi une rupture des vaisseaux sanguins, donnant lieu à une hémorragie.

Les dommages vasculaires, et en particulier l'ischémie, conduisent à une accumulation des fluides interstitiels provoquant des œdèmes peu après l'impact initial. À ce stade, on observe 3

types d'œdèmes : cytotoxique, ionique et vasogénique ; principalement suite à la rupture de la barrière hémato-spinale [87, 88]. En effet, la sécrétion de certains médiateurs inflammatoires telles que les cytokines TNF et IL-1 β , provoque l'altération de la perméabilité de la barrière hémato-spinale.

Tout cela va être accompagné par un événement particulier nommé « spinal shock » qui est un choc spinal transitoire, défini comme un état clinique temporaire de sidération médullaire, avec des atteintes motrices, sensitives et du système nerveux végétatif survenant quelques heures après la lésion.

3.2.2.2 La phase aiguë (2h - 2 semaines)

Cette phase est subdivisée en deux stades lésionnels : aiguë précoce et subaiguë.

La phase aiguë précoce (2h – 48h) :

Elle s'étend de la deuxième heure à la quarante-huitième heure après la lésion primaire. A ce stade, suite à la destruction vasculaire et à l'hémorragie ; la zone des dommages primaires s'élargit considérablement en aggravant les lésions tissulaires et en perturbant l'homéostasie cellulaire.

Excitotoxicité, Trouble ionique, Dysfonctionnement mitochondrial :

Cette phase est caractérisée par une dérégulation ionique, métabolique et mitochondriale contribuant à des dommages cellulaires, causant ainsi une mort cellulaire par un phénomène d'excitotoxicité [89].

Cette excitotoxicité est une augmentation massive du taux de glutamate extracellulaire due à une suractivation de ces récepteurs ionotropiques NMDA, AMPA et métabotropiques kaïnate [90] présents sur les neurones et également sur les astrocytes et les oligodendrocytes [91, 92].

Cette suractivation induit un influx massif de calcium et de sodium dans les cellules, provoquant un déséquilibre osmotique, conduisant à la mort cellulaire. à la suite de l'activation de système protéolytique de la calpaïne ainsi que par la production de radicaux libres et de la peroxydation lipidique [93, 94].

Inflammation :

En général, l'inflammation est une réaction immunitaire qui fait suite à une agression externe ou interne faisant intervenir plusieurs acteurs, notamment, les cellules immunitaires résidentes

et circulantes qui vont sécréter des médiateurs chimiques dans le but d'éliminer les causes à l'origine de l'agression afin d'initier la réparation tissulaire.

Maintenant, si l'on s'intéresse spécifiquement à la réaction inflammatoire dans le cadre de la lésion spinale, on observe que du fait du traumatisme et de l'ensemble des événements secondaires qui lui succèdent, la perméabilité de la barrière hémato-spinale est augmentée.

Cette augmentation de la perméabilité initiée par la destruction vasculaire est la clé du déclenchement progressif de l'inflammation se mettant en place dès les premiers instants et perdurant dans le temps. Dès les premières vingt-quatre heures, le système immunitaire inné recrute des cellules telles que les neutrophiles, qui une fois infiltrés, sécrètent des facteurs pro-inflammatoires sous forme de cytokines /chimiokines éliminant les débris tissulaires et activant ainsi les cellules de la microglie et les astrocytes résidents du parenchyme. Ceci est suivi de la migration des monocytes circulants vers le site de la lésion et où ils se différencient en macrophages. Ces derniers deviennent alors difficilement discernables des cellules de la microglie active, du fait de l'expression commune d'un grand nombre de marqueurs. Toutefois, la différence des niveaux d'expression de certains marqueurs comme le CD45, faiblement exprimé par les cellules de la microglie (CD45 low) et fortement exprimé par les macrophages (CD45 high) [95]. De plus, de manière plus spécifique, récemment, il a été mis en évidence qu'une protéine transmembranaire, la Tmem119 [96] permettrait de suivre spécifiquement les cellules microgliales. Basée sur l'expression spécifique de cette protéine, une souris transgénique permettant de suivre la microglie a d'ailleurs été créée (Tmem119-tdTomato) et permettant ainsi de différencier les cellules microgliales des macrophages [97–99].

La réponse inflammatoire se mettant en place suite à la lésion revêt deux phénotypes distincts ; un premier neurotoxique et un second neuroprotecteur [100]. Ceci est le reflet de l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des macrophages et de la microglie pouvant être de type pro-inflammatoire (M1-like) et produisant alors des cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6) et des chimiokines (CXCL1, CXCL12) proinflammatoires ou de type anti-inflammatoire (M2-like) et sécrétant alors des cytokines telles que IL-10, IL-13 induisant le remodelage tissulaire [101, 102].

Dégénérescence wallérienne et Démyélinisation :

La destruction tissulaire, l'ischémie, la libération de cytokines proinflammatoires, le stress oxydatif ainsi que l'excitotoxicité forment un microenvironnement apoptotique induisant la mort cellulaire. Les OLs sont particulièrement vulnérables aux altérations se mettant en place

suite au traumatisme médullaire, une part importante de cette population cellulaire entre donc en apoptose [103, 104]. En effet, il a été démontré que dans un modèle de contusion chez le rat, on observe que cette perte oligodendrocytaire est présente dès la quinzième minute après la lésion et perdue jusqu'à trois semaines après [105]. Cette perte d'OLs, d'abord cantonnée au site de la lésion, s'étend ensuite au-delà de l'épicentre lésionnel et engendre ainsi une démyélinisation axonale, associée à la dégénérescence wallérienne [106, 107].

La phase Subaigue (48h - 2 semaines) :

Elle commence à partir du deuxième jour après la lésion et prend fin deux semaines plus tard. Cette phase est caractérisée par une élimination intensive des débris cellulaires accumulés au niveau du site de la lésion. Les événements marquants de cette phase sont la prolifération massive des astrocytes et l'hypertrophie de leur corps cellulaire. Quelques heures après le traumatisme, les astrocytes se mettent à surexprimer la GFAP, le facteur de transcription STAT3, le NF- κ B ainsi que les chondroïtines sulfate protéoglycanes (CSPG) [108–111].

Cette astroglie se situe à la périphérie du cœur lésionnel formant les bordures de cette zone, donnant ainsi naissance à une des composantes majeures de la cicatrice gliale. Cette composante gliale de la cicatrice empêche la propagation de la zone lésionnelle et assure la protection de l'intégrité tissulaire de la moelle [112]. Cette réactivité est intense entre le 3^{ème} et le 5^{ème} jour après la lésion, se ralentit au 7^{ème} jour et se stoppe au 14^{ème} jour [113].

Cette cicatrice gliale a été considérée pendant des décennies comme étant le principal élément inhibiteur à la régénération et à la récupération fonctionnelle après LMT [114, 115]. Cependant, cette hypothèse a été remise en cause. En effet, différentes études ont montré que la perte ou le dysfonctionnement de cette cicatrice engendre l'extension de la zone lésionnelle et de l'inflammation se traduisant par une aggravation ou une perte de la récupération fonctionnelle après LMT [116, 117].

3.2.2.3 La Phase Intermédiaire (2 semaines - 6 mois)

Elle commence dès la deuxième semaine après le traumatisme et se prolonge pendant les six mois qui suivent. On observe un arrêt progressif de la prolifération des astrocytes réactifs. En revanche, la réactivité de ces cellules au sein de la cicatrice gliale persiste. Cette dernière commence à devenir mature [118]. D'autre part, on remarque l'apparition spontanée de bourgeonnements axonaux [119], ces derniers ne sont toutefois pas suffisants pour entraîner une amélioration fonctionnelle significative.

3.2.2.4 La phase chronique (≥ 6 mois)

C'est la dernière phase. Elle commence à partir du 6^{ème} mois après la lésion et persiste durant toute la vie chez le traumatisé médullaire. Pendant cette phase, la lésion peut se stabiliser ou évoluer vers la constitution de cavitations kystiques, notamment observées chez l'homme et chez le rat. Chez l'homme, on observe également chez 30% des patients l'apparition de myélomalacie [120]. La dégénérescence wallérienne se poursuit des années après la lésion et conduit à une perte cellulaire supplémentaire ainsi que des perturbations accentuant les déficits [121, 122]. On considère qu'une à deux années après le traumatisme, les déficits fonctionnels se stabilisent [80].

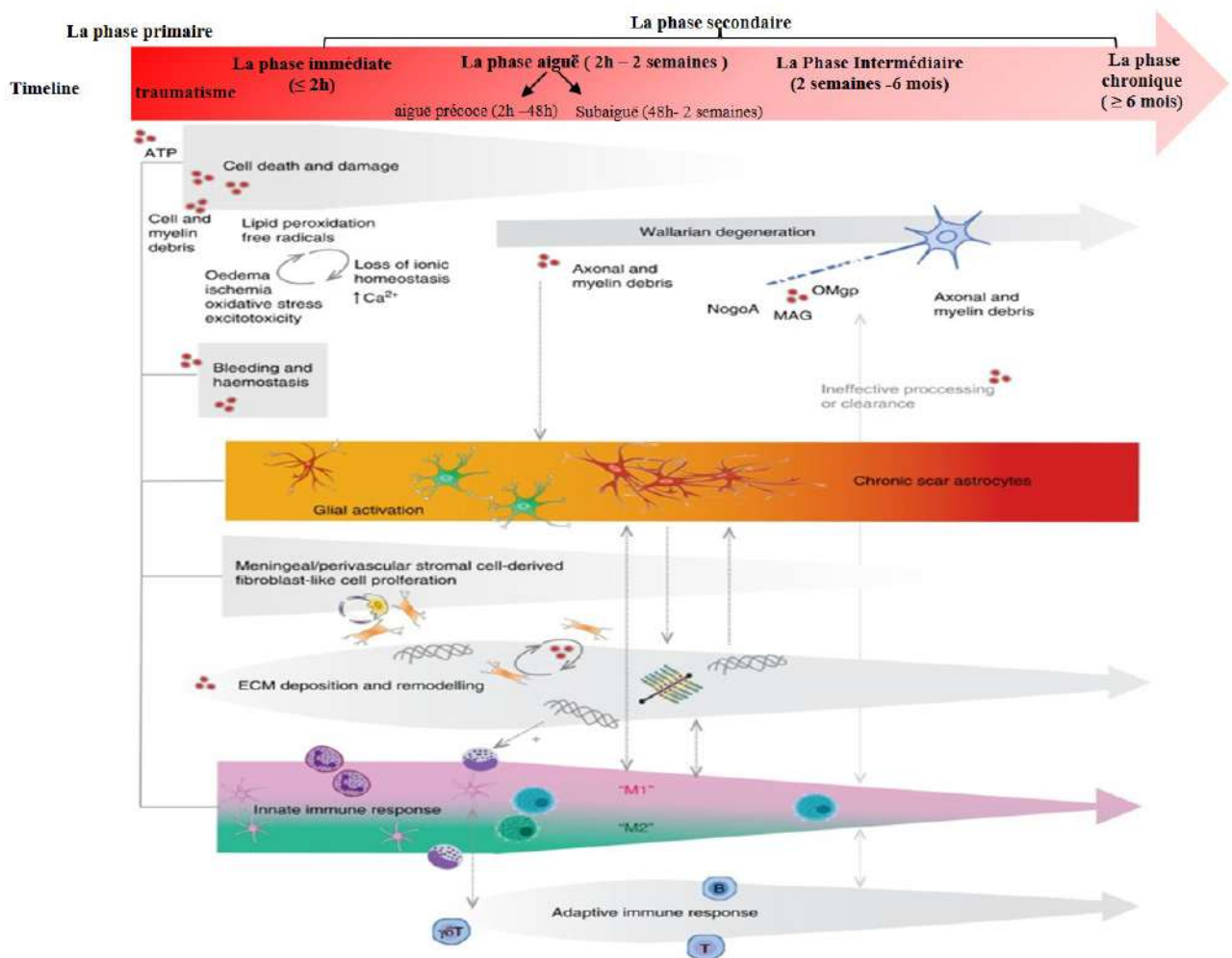


FIGURE 3.4 Illustration chronologique résumant les différents événements physiopathologiques. D'après [95]

Chapitre 4

La réactivité cellulaire en réponse à un traumatisme médullaire

Comme décrit précédemment, la physiopathologie de la lésion médullaire est une cascade d'événements caractérisée par des modifications du microenvironnement tissulaire de la moelle. Ce microenvironnement lésionnel possède une caractéristique particulière définie par son hétérogénéité cellulaire et moléculaire et par sa dynamique durant la phase chronique de la lésion. Ce microenvironnement hétérogène constitue la cicatrice médullaire.

Dans ce chapitre, on s'intéressera, en premier lieu, aux différentes composantes cellulaires de cette cicatrice, puis à leurs réactivités et leurs rôles suite à la lésion, et enfin aux différentes stratégies thérapeutiques proposées afin de la moduler.

4.1 La cicatrice médullaire

La cicatrice médullaire est généralement composée de deux zones : le cœur de la lésion, contenant des fibroblastes dérivés des cellules stromales et des cellules immunitaires, et est entouré par une deuxième zone appelée la pénombre qui contient des astrocytes hypertrophiques [fig. 4.1].

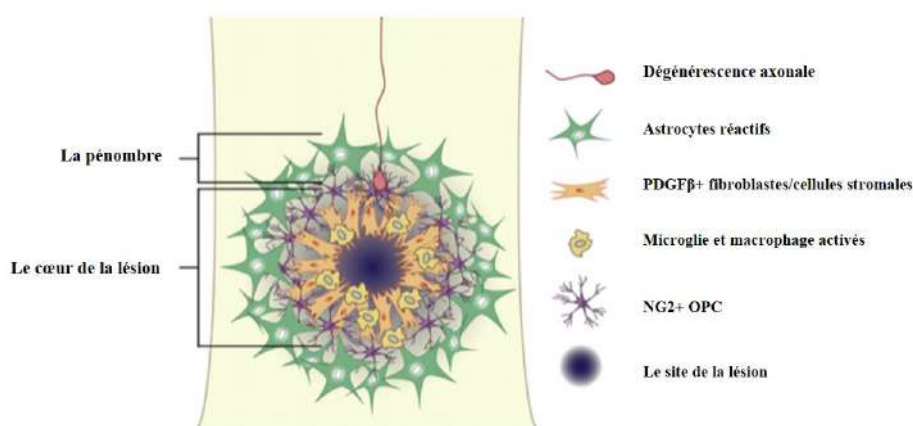


FIGURE 4.1 La cicatrice médullaire. Composée de deux zones : le cœur de la lésion, contenant des fibroblastes dérivés des cellules stromales et des cellules immunitaires, et est entouré par une deuxième zone appelée la pénombre qui contient des astrocytes réactifs. D'après [123]

Le terme de cicatrice médullaire induit une certaine confusion du fait de débats entre les chercheurs quant à la définition de « cicatrice médullaire ». En effet, chacun à sa propre vision de la cicatrice et de sa mise en place suite à la lésion. Les termes et la composition de celle-ci diffèrent donc d'une équipe à une autre.

Ainsi, depuis des années, des équipes la dénommaient « cicatrice gliale » en la décrivant comme étant composée uniquement d'astrocytes bordant la zone de la lésion. D'autres équipes caractérisaient cette zone de manière plus globale [124] en la décomposant en cicatrice gliale et fibrotique. D'autres encore, parlent de tissu lésionnel réunissant à la fois le centre de la lésion et la bordure astrocytaire de celle-ci, ainsi que le tissu réactif non lésionnel qui l'entoure [116].

Bien que ces visions s'opposent concernant la compartimentation de cette cicatrice et les terminologies utilisées dans cette partie du microenvironnement lésionnel de la moelle, il est important de noter qu'ils font référence aux mêmes types de cellules, à savoir : astrocytes, fibroblastes, microglies et OPCs. Toutes ces cellules interagissent entre elles dépendamment de la phase de la lésion.

La cicatrice médullaire ne doit pas être considérée comme une composante isolée du reste de la moelle lésée car elle est façonnée par les processus d'inflammation et de remodelage de la matrice extracellulaire de la moelle lésée.

Tout au long de ce chapitre, nous considérerons que le terme cicatrice médullaire englobe les trois composantes suivantes : a) **la cicatrice fibrotique** située au cœur de la lésion, b) **la cicatrice gliale** située en bordure de la zone fibrotique et c) **la zone neurale réactive** entourant les deux cicatrices précédentes comme une pénombre lésionnel. [116]. Chacune de ces zones ayant sa propre composition cellulaire et ses propres interactions fonctionnelles [fig. 4.2].

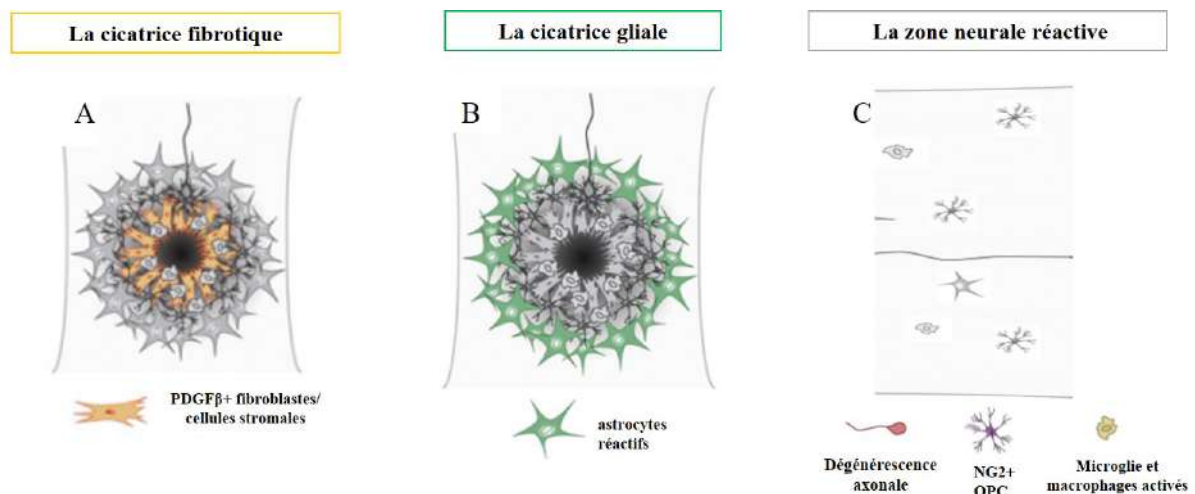


FIGURE 4.2 **La composition cellulaire de la cicatrice médullaire.** A) la cicatrice fibrotique située au cœur de la lésion, B) la cicatrice gliale située en bordure de la zone fibrotique et C) la zone neurale réactive entourant les deux cicatrices. D'après [123]

4.2 La composition cellulaire de la cicatrice médullaire

4.2.1 La cicatrice fibrotique : le cœur de la lésion

À la suite du traumatisme mécanique ayant lieu au niveau de la moelle, on observe une destruction tissulaire engendrant, comme cela a été décrit dans le chapitre précédent, une rupture des vaisseaux sanguins et de la nécrose cellulaire, notamment celle des cellules endothéliales.

Rapidement, en réponse à cette lésion primaire, les cellules microgliales sont activées afin d'éliminer les débris accumulés au niveau de la zone de la lésion. Suite à cela, par l'intermédiaire de certaines cytokines et chimiokines, le système immunitaire inné recrute depuis la circulation générale des macrophages, des neutrophiles, des lymphocytes et des leucocytes vers le cœur de la lésion [fig. 4.3] [116, 123].

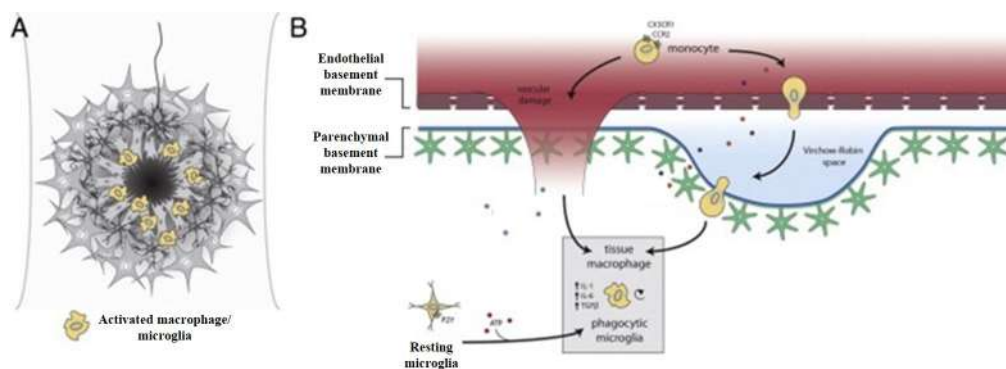


FIGURE 4.3 Activation microgliale et sa mise en place au niveau de la cicatrice médullaire suite à la lésion de la moelle spinale. D'après [123]

En parallèle, une invasion massive de fibroblastes a lieu au niveau de la zone de la lésion formant progressivement la cicatrice fibrotique. Plusieurs études se sont attelées à démontrer l'origine de ces fibroblastes, caractérisés par leur expression de $PDGFR\beta$, suggérant ainsi deux origines principales potentielles : une origine méningée [125] ou périvasculaire [126]. En 2011, Goritz et al. ont tiré avantage de la lignée de souris transgéniques inducible $Glast::CreER^{T2}-YFP$ afin de déterminer l'origine de ces fibroblastes au niveau du cœur de la lésion. En se basant sur la localisation des cellules $Glast^+$, $PDGFR\beta^+$ se trouvant à proximité de la lame basale de l'endothélium des capillaires, ils ont pu identifier le type de cellules : péricytes A. Ces péricytes A sont un sous type de cellules périvasculaires exprimant $Glast$ et $PDGFR\beta$, $CD13$ mais n'exprimant pas la αSMA (α -Smooth muscle actin), contrairement aux péricytes de type B.

Cette découverte a permis de mettre en évidence que les fibroblastes qui constituent cette cicatrice proviennent des péricytes A. Suite au traumatisme et en réponse aux signaux des cellules inflammatoires, entre le troisième et le cinquième jour après la lésion, la néovascularisation commence, permettant ainsi aux péricytes d'infiltrer la lésion. En effet, ces derniers, dès détection du microenvironnement lésionnel, quittent les capillaires, où ils se situent habituellement, pénètrent le site de la lésion et commencent à proliférer et à s'accumuler à ce niveau. Entre le cinquième et le neuvième jour après la lésion, les cellules dérivées des péricytes A expriment temporairement un des marqueurs des cellules stromales, la α SMA, et se différencient, lors de la maturation de la cicatrice médullaire, en cellules de type fibroblastes formant ainsi, au cœur de la lésion, la cicatrice fibreuse [127]. Il est important de noter que ce processus cicatriciel a été observé aussi bien dans des modèles de la lésion par section de la moelle, que dans des modèles de compression [fig. 4.4] [126, 128].

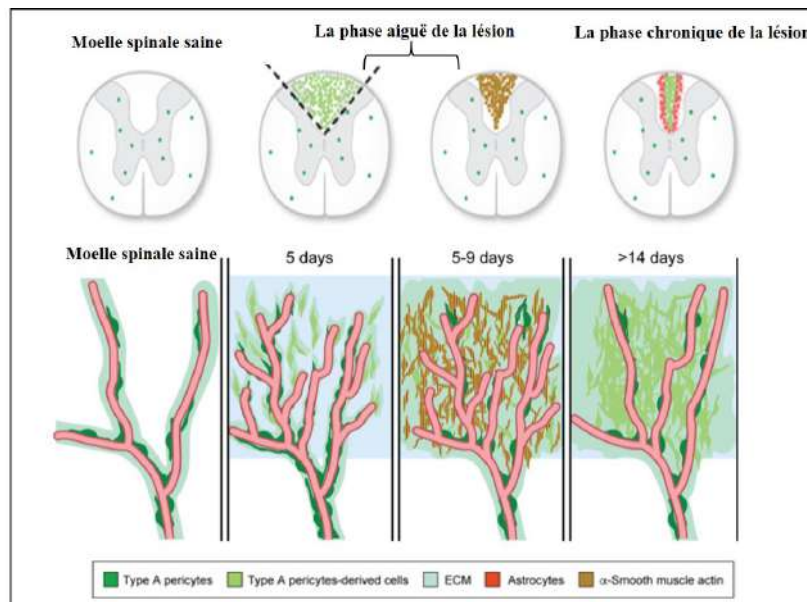


FIGURE 4.4 Représentation schématique illustrant la mise en place de la cicatrice fibrotique durant les 14 jours après la lésion provenant des péricytes A. D'après [129]

Cette cicatrice fibreuse est elle-même entourée par une couche de cellules de type astrocytaires qui composent la cicatrice gliale [70].

4.2.2 La cicatrice gliale

4.2.2.1 L'astrogliose

La zone gliale, commence à se mettre en place dès les deux premiers jours après la lésion, et est constituée principalement par des astrocytes hyper-réactifs. Ceux-ci voient leur prolifération

augmenter entre le 7^{ème} et le 10^{ème} jour et s'arrêter 14 jours après la lésion [130].

Leur degré de réactivité est dépendant des signaux présents au niveau du microenvironnement lésionnel, tels que les cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et des récepteurs présents au niveau des cellules tels que les DAMP (Damage Associated Molecular Pattern) [131].

Ces astrocytes subissent une prolifération massive, des changements morphologiques (hypertrophie) et commencent à surexprimer des marqueurs comme la GFAP, la vimentine et Nestine [132, 133], suivi d'un réarrangement spatial aboutissant à la formation d'une bordure étroite qui entoure le cœur de la lésion [134]. Cette bordure d'astroglie forme la cicatrice astrocytaire, assez différente des astrocytes réactifs présents dans les tissus neuraux adjacents [135]. La maturation de cette cicatrice astrocytaire est médiée par la signalisation de STAT-3 (Signal transducer and activator of transcription 3) et l'expression des protéines kinase MAP3K13 (Mitogen-activated protein 3 kinase 13) [136].

Concernant l'origine des astrocytes formant cette cicatrice ou zone gliale, plusieurs études ont montré leur provenance de deux origines différentes. Une première partie des astrocytes dérivent des cellules épendymaires du canal central. Suite à la lésion, les cellules épendymaires, normalement quiescentes, se voient activées, elles prolifèrent, quittent le canal central, migrent au niveau du site de la lésion où elles se différencient en astrocytes, formant, ainsi, la partie la plus profonde de la cicatrice gliale, en contact avec la cicatrice fibrotique. La deuxième composante gliale provient des astrocytes résidents qui composent la couche périphérique de cette même cicatrice [fig. 4.5] [70, 137].

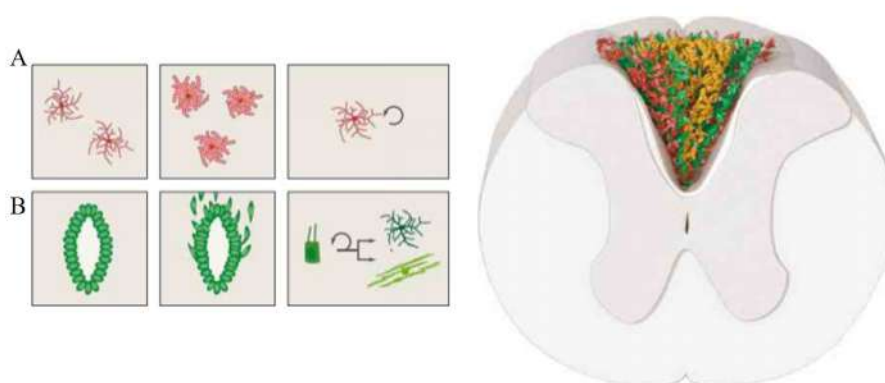


FIGURE 4.5 Origine et distribution cellulaire de la cicatrice gliale de la moelle spinale. La cicatrice gliale est formée par des astrocytes provenant de deux origines ; A) des astrocytes résidents qui composent la couche périphérique de cette cicatrice (rouge) et B) des astrocytes dérivant des cellules épendymaires du canal central suite à leur réactivité après la lésion qui forment la partie la plus profonde de la cicatrice gliale (vert) entourant la cicatrice fibrotique (orange). D'après [137]

Cependant, récemment, ces résultats ont été remis en cause par une étude de Ren et al. dans laquelle, ils affirment que ces nouveaux astrocytes proviennent uniquement des astrocytes résidents et que les cellules épendymaires ne contribuent pas à la mise en place de la cicatrice gliale. Ils décrivent également que la réactivité des cellules épendymaires est locale et dépendante du modèle de la lésion. Cette étude est basée sur l'utilisation d'un modèle de souris transgénique Knock-in FoxJ1-CreER^{T2}, permettant le traçage du devenir des cellules épendymaires [118]. Toutefois, ces résultats peuvent s'expliquer par le modèle de souris utilisé. En effet, ce modèle Knock-in FoxJ1-CreER^{T2} induit une mutation au niveau du promoteur du gène *FoxJ1*, de ce fait les souris homozygotes pour cette construction sont *FoxJ1*^{-/-}; ces souris n'arrivent pas à terme et meurent durant le développement embryonnaire. De la même façon, dans le laboratoire, nous avons montré aussi bien *in vitro*, qu'*in vivo* que les souris hétérozygotes *FoxJ1*^{+/-} présentes une altération du potentiel souche médullaire. Notamment, *in vitro*, le nombre de neurosphères obtenues à partir de moelles de souris Knock-in FoxJ1-CreER^{T2} est significativement inférieur au nombre de neurosphères obtenues à partir de moelles de souris WT [60, 61].

Ces astrocytes dérivés des cellules épendymaires sont des éléments essentiels afin de limiter les dégâts tissulaires et freiner leur propagation ainsi que prévenir la mort cellulaire. Ceci a été étudié par Sabelström et al. où, ils ont montré que le fait d'inhiber la contribution à la cicatrice gliale par les cellules épendymaires provoque une exacerbation de la lésion aboutissant à des atteintes axonales plus importantes que chez les animaux contrôles. Ceci a pu être démontré via un modèle expérimental FoxJ1-CreER^{T2}::YFP-Rasless qui induit, suite à l'injection du tamoxifène, l'inhibition du cycle cellulaire dans les seules cellules épendymaires [138]. Il a pu également être démontré que le lien étroit entre les deux zones ; astrocytaire et fibrotique, est médiée par des éphrines B2, ce qui permet de confiner les cellules immunitaires et les fibroblastes au niveau de l'épicentre de la lésion et d'éviter leur infiltration au niveau de la zone neurale saine avoisinante [139].

4.2.2.2 Les précurseurs oligodendrocytaires : OPC -NG2

Les précurseurs oligodendrocytaires exprimant le NG2 (neuron-gliale antigène 2) constituent l'une des composantes principales de la cicatrice médullaire. Suite à la lésion, ces OPC-NG2 deviennent réactifs et subissent une hypertrophie cellulaire et une expression accrue de NG2. En effet, leur prolifération devient plus massive en s'entremêlant avec les cellules de la cicatrice gliale qui entourent le cœur de la lésion [140, 141]. Plusieurs études ont montré la contribution de ces OPC-NG2 au niveau du microenvironnement lésionnel notamment via la remyélinisation, soit par oligodendrogenèse, soit du fait de leur différenciation en cellules de

Schwann-like myélinisante [fig. 4.6].

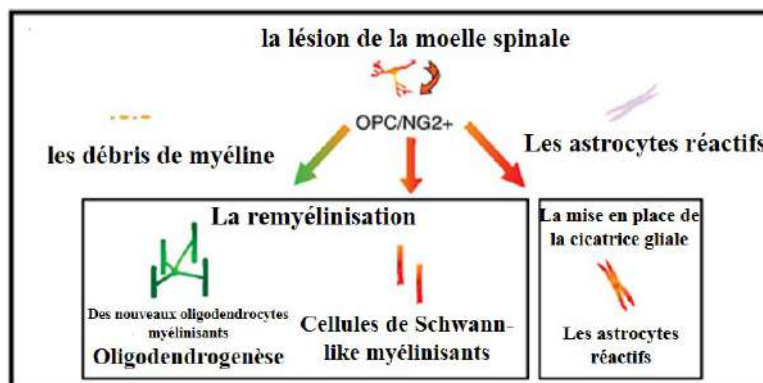


FIGURE 4.6 La réponse oligodendrocytaire et sa contribution dans la cicatrice médullaire suite à la lésion médullaire traumatique. D'après [142]

L'oligodendrogenèse, a été montrée par l'étude de Sellers et al. qui ont observé que, dans les 24h suivant la lésion, les progéniteurs NG2⁺ contribuent à la formation de la cicatrice gliale, tandis que ceux produits 7 jours après la lésion semblent contribuer principalement à la production d'oligodendrocytes myélinisants [143]. Plus récemment, des études basées sur la méthode de « fate mapping » en utilisant une souris transgénique PDGFR α -CreER^{T2}, ont cartographié le devenir des cellules PDGFR α ⁺. Cette étude a confirmé que la plupart des oligodendrocytes myélinisants, nouvellement formés et coexprimants CC1, MBP, PDGFR α et EDU⁺ après LMT, sont dérivés des OPC.

La remyélinisation par le biais de la différenciation en cellules de Schwann-like myélinisantes, a été démontrée également dans cette même étude. En effet, en utilisant la lignée de souris PDGFR α -CreER^{T2}, les auteurs ont pu démontrer que des cellules de Schwann coexprimant P0 (marqueur de myéline périphérique), PDGFR α et MBP se trouvaient au niveau du cordon dorsal suite à une contusion dorsale de la moelle [144]. Cependant, il est à noter que, dans cette étude menée par l'équipe de Tetzlaff, la myélinisation par le biais des cellules de Schwann-like a été observée durant les deux premières semaines après LMT, au moment où la majorité de la récupération locomotrice spontanée se produit chez la souris. A l'inverse, la remyélinisation par le biais de nouveaux oligodendrocytes se met en place plus tardivement six semaines après la lésion et est presque absente durant les deux premières semaines post LMT [fig. 4.7] [28]. Le rôle majeur joué par les cellules de Schwann-like dans la récupération spontanée post LMT a été confirmée dans une autre étude récente. En effet, dans cette étude, les chercheurs ont pu démontrer que dans un modèle knock-out inductible de la neuréguline-1, empêchant ainsi la myélinisation des cellules de Schwann-like dans un modèle de la lésion thoracique modérée,

une diminution de la récupération fonctionnelle était observée [145].

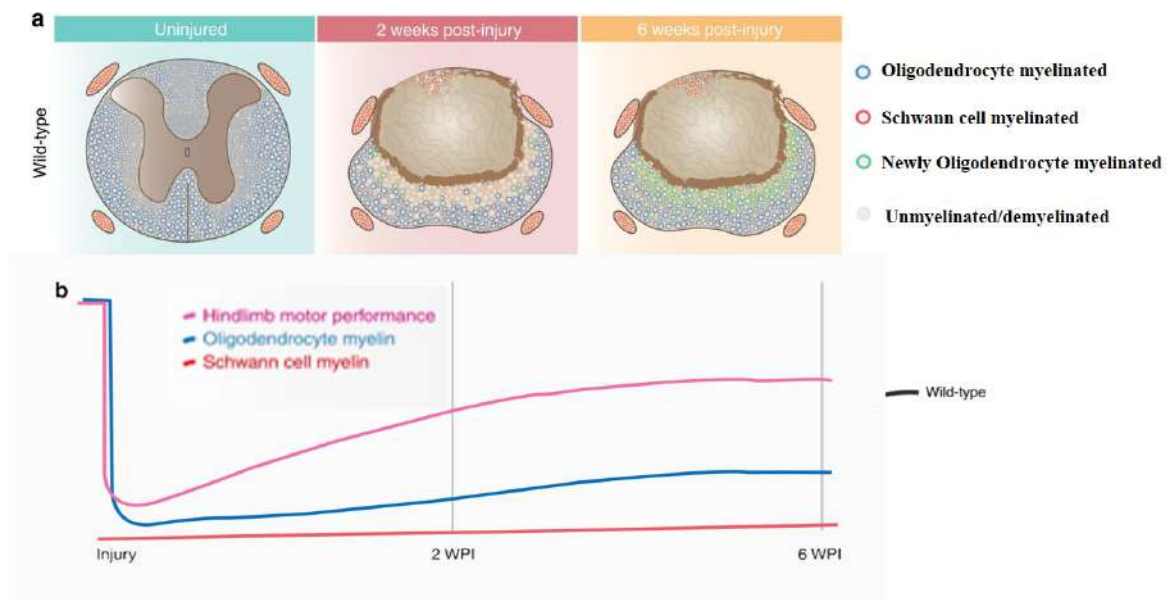


FIGURE 4.7 Le rôle des cellules de Schwann-like dans la récupération fonctionnelle deux semaines après la lésion médullaire. D'après [28]

Il s'agit ici d'une piste thérapeutique intéressante, en effet on peut imaginer que le fait de cibler l'augmentation de la remyélinisation par les nouveaux oligodendrocytes ou par la différenciation de ces OPCs en cellules de Schwann-like pendant les premières semaines suivant la LMT, pourrait accélérer ou augmenter le degré de récupération locomoteur.

4.2.3 La zone neurale réactive : le tissu sain

La zone neurale réactive se trouve tout autour de la zone de la lésion, en périphérie de la cicatrice gliale. Cette zone est composée par les mêmes éléments que ceux présents dans la moelle spinale physiologique, à l'exception de la présence de cellules gliales réactives : astrocytes, microglies et OPC-NG2. L'hyperréactivité de ces cellules diminuent graduellement en s'éloignant de la zone de la lésion [116]. Ces astrocytes réactifs diffèrent tant sur le plan phénotypique que fonctionnel de ceux formant la cicatrice gliale. [135]. Au niveau de cette zone, du fait de la réactivité cellulaire et des éléments fonctionnels présents, plusieurs mécanismes de réorganisation et d'établissement de nouveaux circuits neuronaux et de remodelage tissulaire se mettent en place, telle que la formation de nouvelles synapses [117].

4.3 Le double rôle de la cicatrice médullaire

De nombreuses études se sont intéressées à investiguer l'intérêt de la cicatrice médullaire dans le cadre des LMT. Bien que le rôle exact reste inconnu, il est couramment décrit que la cicatrice médullaire à un double rôle : inhibiteur et permissif [fig. 4.8]. Dans cette partie, nous nous concentrons sur la bibliographie dévoilant les différents rôles.

4.3.1 Le rôle inhibiteur

4.3.1.1 La cicatrice médullaire : une barrière physique à la repousse axonale

Durant des décennies, la cicatrice médullaire a été considérée comme étant un constituant principalement inhibiteur et qu'elle s'opposait à la régénération du SNC. Dès les premières observations dans les années 1940, il a pu être montré que la régénération axonale est de fait bloquée par la cicatrice médullaire formant ainsi une barrière physique à la repousse axonale [114]. D'autres études sont venues confirmer les résultats de cette première étude rendant la représentation purement inhibitrice de la cicatrice très répandue [115].

Néanmoins, cette hypothèse a été contestée en raison de l'incapacité à produire des effets bénéfiques en absence de cicatrice gliale [146, 147]. On peut citer notamment les travaux réalisés par Anderson et al. récemment et selon lesquels l'ablation de la cicatrice gliale n'induit pas de régénération [148]. Ainsi, même si de nombreuses études se sont concentrées sur d'autres mécanismes inhibiteurs, la notion de cicatrice gliale comme barrière physique a persisté jusqu'à aujourd'hui même si toutefois de plus en plus controversée.

4.3.1.2 La cicatrice gliale, principal producteur des protéoglycanes

Une autre raison pour laquelle la cicatrice médullaire était auparavant considérée comme l'inhibiteur principal de la régénération axonale découle de son rôle dans la production de certaines molécules inhibitrices de la matrice extracellulaire tels que les CSPGs.

On sait, depuis quelques années, que les astrocytes réactifs formant la cicatrice gliale expriment des taux importants de CSPGs suite à la lésion [149]. Cependant, les astrocytes ne sont pas les seuls responsables de la production des CSPGs. Ceci a été démontré par Anderson et al. via l'utilisation de deux modèles de souris transgéniques induisant la perte de la zone astrocytaire de la cicatrice médullaire : une souris STAT3-KO permettant la suppression des voies de signalisation nécessaires à la prolifération de ces cellules, ainsi qu'un autre modèle qui consiste à utiliser un système de gènes « suicides » induisant la mort spécifique des

astrocytes en utilisant la thymidine kinase du virus de l'herpes TK+GCV administrée 7 jours après la lésion. Cette étude a montré que même en bloquant la prolifération des astrocytes par le biais de ces deux modèles, les CSPGs sont toujours exprimés au niveau du site de la lésion [148].

Ainsi, les constatations précédentes suggèrent que d'autres cellules contribuent à la libération de CSPGs telles que les NG2-OPC, les macrophages et les oligodendrocytes. Le même résultat a été observé dans des études bloquant les NG2-OPC au niveau de la lésion [150–152]. Ceci peut être expliqué par un effet de compensation dans la production des CSPGs par les différentes cellules gliales. Ainsi, une meilleure stratégie consisterait à cibler directement les molécules inhibitrices de la MEC et ses récepteurs et non pas les cellules participant à leurs productions, ceci pourrait permettre de réguler leurs expressions et d'induire une meilleure régénération axonale [113].

4.3.1.3 Le caractère neurotoxique des populations astrocytaires formant la cicatrice

En se basant sur les connaissances récentes acquises sur l'hétérogénéité et la plasticité astrocytaire, il est raisonnable de suggérer qu'il peut y avoir des phénotypes astrocytaires particuliers jouant un rôle neurotoxique ou neuroprotecteur contribuant ainsi au double rôle de la cicatrice médullaire [153]. Au niveau cérébral, une étude menée en 2017 a mis en évidence l'existence d'un sous-groupe d'astrocytes réactifs formant la cicatrice gliale et appelé astrocytes A1, ce phénotype astrocytaire a été défini comme neurotoxique. Leur présence est induite par l'activation de la microglie via la libération d'IL1 α , de TNF et de C1q [154].

Récemment, ces astrocytes A1 ont été étudiés dans un modèle de la lésion médullaire, où il a été montré que cette dernière induit une augmentation de l'expression du marqueur C3 par les astrocytes A1 et que cette augmentation est observée les trois premiers jours après la lésion. Vingt-huit jours après la lésion, les auteurs ont observé une zone C3 positive entourant le cœur de la lésion (la cicatrice fibrotique), ce qui coïncide avec l'emplacement de la cicatrice gliale et des astrocytes qui la forment [155].

D'autres études se sont attelées à réduire la proportion de ces astrocytes A1 via des transplantations cellulaires de cellules souches mésenchymateuses dans le but de réduire les facteurs inflammatoires responsables de l'induction de ces astrocytes neurotoxiques. Dans cette étude, une récupération motrice a été observée malgré la non-spécificité du marqueur C3 utilisé pour suivre ces astrocytes A1 [156].

Ces résultats montrent bien que ces astrocytes neurotoxiques font partie de la cicatrice gliale et que leur présence est étroitement liée à l'inflammation dans la phase aiguë de la lésion. Cependant, une meilleure compréhension et le développement de biomarqueurs spécifiques de ces cellules permettrait de les cibler car ils représentent une cible thérapeutique prometteuse [113].

4.3.2 Le rôle permissif

4.3.2.1 Le rôle immunomodulateur de la cicatrice gliale

L'élimination des débris cellulaires par les cellules inflammatoires est essentielle afin d'atténuer les dégâts au niveau du site de la lésion. Toutefois, une propagation incontrôlée de l'inflammation peut être cytotoxique et dévastatrice pour le tissu neural sain adjacent à la lésion. Bien que le rôle de la cicatrice médullaire soit encore sujet à débats, il existe un consensus sur le fait que la cicatrice gliale empêche la propagation de l'inflammation du cœur de la lésion vers les tissus qui l'entourent [157].

Par ailleurs, plusieurs études montrent que le fait de bloquer la mise en place de l'astrogliose affecte l'efficacité de la récupération fonctionnelle [148, 158]. Cependant, la cicatrice gliale n'a pas seulement un rôle anti-inflammatoire. En effet, après LMT, les astrocytes réactifs, la microglie et les cellules immunitaires périphériques libèrent des cytokines pro-inflammatoires et interagissent les uns avec les autres contribuant ainsi à l'inflammation présente lors des stades aigus et subaigus de la lésion secondaire [136]. Récemment, il a été démontré que les astrocytes formant la cicatrice gliale agissent par feedback négatif sur l'inflammation et se comportent de ce fait comme un immunomodulateur de l'inflammation [159, 160].

4.3.2.2 Blocage de la propagation de la zone fibrotique

Plusieurs études suggèrent que la cicatrice gliale chronique revêt un caractère de plus en plus néfaste au cours du temps empêchant ainsi la régénération axonale. Afin de tester cette hypothèse, Anderson et al. ont voulu éliminer la cicatrice astrocytaire chronique, cinq semaines après la lésion, en utilisant des doses très faibles de toxine diphtérique ciblant son récepteur. La distribution et la spécificité du ciblage sur la zone astrocytaire mature ont été vérifiées à l'aide d'un rapporteur tdTomato. Après vérification de l'élimination spécifique de la cicatrice astrocytaire chronique par le biais d'un marquage GFAP, les auteurs ont pu en déduire via un marquage des axones, dix semaines après la lésion, que ceux-ci ne parvenaient pas à repousser spontanément à travers la zone de la cicatrice astrocytaire chronique éliminée [148].

D'après ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'en absence de cicatrice gliale chronique, il y a propagation de la cicatrice fibreuse et infiltration de cellules inflammatoires. C'est pour cela que, dès son ablation, contrairement aux attentes, le cœur de la lésion s'étend sur les tissus adjacents à la lésion et empêche ainsi toute régénération axonale.

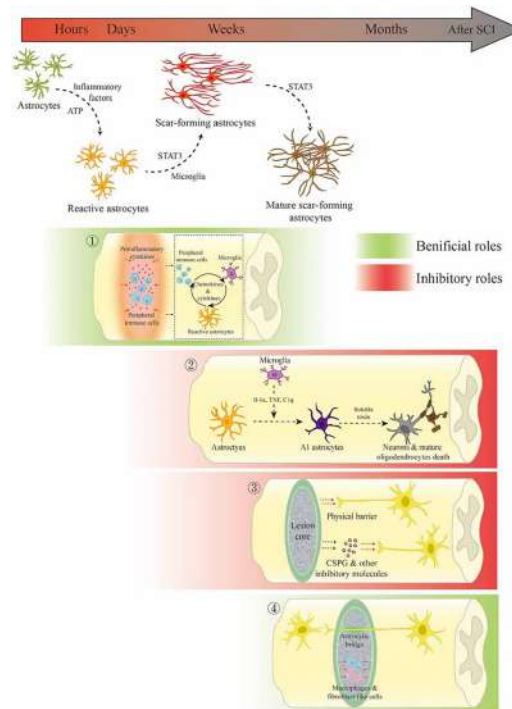


FIGURE 4.8 Représentation schématique résumant les différents rôles de la cicatrice médullaire et leurs dualités entre l'inhibition et la permisivité. D'après [113]

4.4 La cicatrice médullaire : potentielle cible thérapeutique

De plus en plus de preuves montrent que la cicatrice médullaire ne joue pas un rôle purement inhibiteur au sein de la moelle lésée, mais qu'elle pourrait être une cible thérapeutique potentielle donnant un nouvel espoir pour la régénération de la moelle spinale à la suite d'un traumatisme.

En se basant sur les différents rôles de la cicatrice médullaire mentionnés précédemment, différentes suggestions, permettant un meilleur ciblage de la cicatrice afin de promouvoir une récupération plus efficace, se présentent.

En effet, nous avons décrit précédemment que la cicatrice est composée d'un cœur lésionnel

fibrotique entouré d'une cicatrice gliale astrocytaire, or, son élimination totale ne représente pas la solution idéale pour rétablir la récupération fonctionnelle. En revanche, d'autres études ont montré que la réduction de la taille de la cicatrice fibrotique améliore la régénération axonale [161]. En effet, récemment l'étude menée par Dias et al., en se basant sur l'utilisation d'un modèle de souris transgénique GLAST-CreER^{T2}::YFP-Rasless inhibant spécifiquement le cycle cellulaire des péricytes de type A formant la cicatrice fibrotique, a démontré la réduction de la composante fibrotique de la cicatrice. Suite à cette diminution, les auteurs ont pu remarquer une amélioration de la récupération sensorimotrice comparée à des souris GLAST-CreER^{T2} servant de contrôle [162].

Une autre cible cellulaire pouvant être modulée dans le cadre des LMTs est les astrocytes. Par ailleurs, comme décrit précédemment, la réactivité des astrocytes est dépendante des signaux présents dans le microenvironnement lésionnel. De ce fait une hypothèse peut être formulée ; à savoir qu'une intervention au niveau du microenvironnement pourrait moduler ou changer le phénotype et la réactivité de ces cellules.

De plus, il existe une autre population cellulaire qui joue un rôle majeur en réponse aux LMTs, il s'agit des cellules souches endogènes médullaires : les cellules épendymaires.

4.5 La réactivité des cellules souches endogènes à la suite de la lésion

Comme décrits dans les parties précédentes, chaque cellule de la moelle spinale a une réponse spécifique suite à la lésion et chacun de ces types cellulaires participent à la mise en place de la cicatrice médullaire. Dans cette partie nous allons nous intéresser à la réponse des cellules souches neurales de la moelle : les cellules épendymaires et leur contribution au microenvironnement lésionnel.

Meletis et al. ont mené en 2008 une étude qui s'intéressait à la réactivité des cellules du canal épendymaire et de leur devenir suite à la lésion. Afin de suivre ces cellules, les auteurs ont utilisé deux lignées de souris transgéniques Nestin-CreER^{T2} et FoxJ1-CreER^{T2}. En premier lieu, ils ont validé que seules les cellules épendymaires de la moelle coexpriment les marqueurs FoxJ1 et Nestin. Cette validation a été suivie par une investigation *in vivo* de l'activation des cellules épendymaires suite à la lésion du finuculus dorsalis, en utilisant le modèle de souris transgénique FoxJ1-CreER^{T2}. Ces travaux ont ainsi pu montrer que ces cellules épendymaires prolifèrent peu dans les conditions physiologiques, cependant, suite à la

lésion, une augmentation significative de leur taux de prolifération au niveau du canal central est observée. Une partie de ces cellules quitte alors le canal central et migre vers le site de la lésion afin de contribuer à la mise en place de la cicatrice médullaire. Suite à cette migration, les cellules commencent à se différencier majoritairement en astrocytes, et minoritairement en oligodendrocytes au niveau du site de la lésion. La mise en évidence de potentiel souche a été observée également *in vitro* via des cultures de neurosphères de moelles issues de souris FoxJ1-CreER^{T2}. Ces neurosphères recombinaés après différenciation sont capables de donner des astrocytes, des oligodendrocytes et des neurones *in vitro* [52].

Cette multi potentialité des cellules épendymaires ainsi que leur capacité à conserver leur propriété de cellules souches endogènes, en conditions physiologiques et également dans un contexte lésionnel, ont été étudiées par Barnabé-Heider et al. en suivant trois populations cellulaires : les oligodendrocytes, les astrocytes et les cellules épendymaires. Pour cela, trois lignées transgéniques ont été utilisées : olig2-CreER^{T2}, cx30-CreER^{T2} et hFoxj-CreER^{T2}. Cette étude a confirmé qu'en conditions physiologiques, seuls les progéniteurs oligodendrocytaires prolifèrent et donnent alors des oligodendrocytes matures au cours du temps, contrairement aux cellules épendymaires et aux astrocytes qui eux sont quiescents. Toutefois, suite à une lésion, seules les cellules épendymaires ont la capacité de s'autorenouveler et de se différencier en astrocytes et oligodendrocytes participant à la cicatrice médullaire [70]. Cette étude a donc mis en évidence que non seulement les cellules épendymaires constituaient une population de cellules souches endogènes présentes dans la moelle spinale mais également que ce potentiel souche était confiné à ces seules cellules [fig. 4.9].

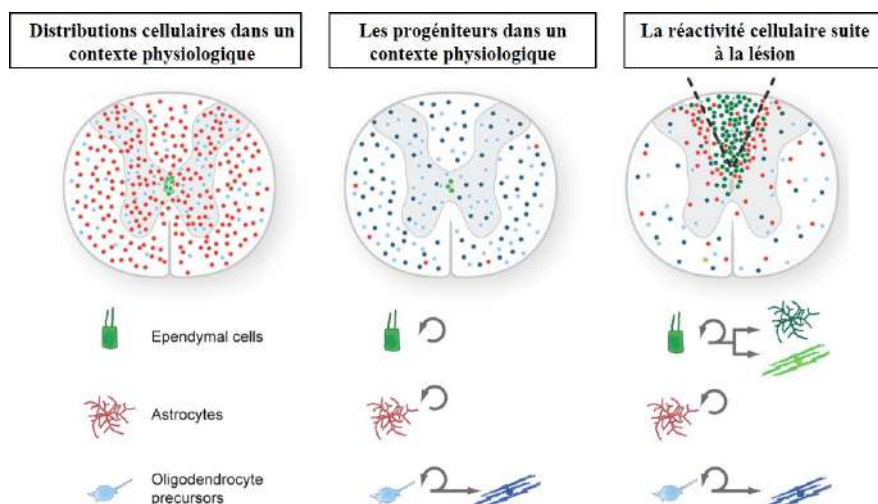


FIGURE 4.9 **Réactivité des cellules médullaires.** cellules épendymaires, astrocytes et oligodendrocytes en conditions physiologique et lésionnelle. D'après [70]

Récemment, des études ont montré que la réactivité des cellules souches endogènes de la moelle, à la suite de la lésion, est médiée par plusieurs facteurs présents lors de la phase secondaire. Ces facteurs ont été considérés comme délétères pour les neurones et les cellules gliales mais paradoxalement nécessaires à l'activation de ces cellules épendymaires via l'induction de leur prolifération et de leur différenciation [163].

Dans cette partie, nous nous intéresserons aux différents facteurs déclenchant l'activation de ces cellules souches endogènes [fig. 4.10].

En premier lieu, la libération du glutamate en grande quantité dans le site de la lésion provoquant une excitotoxicité est un des événements majeurs de la phase secondaire. Une récente étude suggère que le glutamate a un effet activateur sur les cellules souches endogènes de la moelle. *In vitro*, il a été démontré que des concentrations élevées de glutamate, comparables aux niveaux observés *in vivo* après LMT, conduisent à leur prolifération massive et à une augmentation de leur taux de survie [164]. Les mécanismes par lesquels le glutamate stimule la prolifération et la survie de ces cellules restent inconnus. Il est cependant connu que les cellules souches adultes expriment des récepteurs fonctionnels AMPA, kainate et NMDA. Certaines études suggèrent que les récepteurs AMPA pourraient jouer un rôle central dans la régulation des réponses médiées par le glutamate, via l'augmentation du taux de BDNF [165, 166].

Le deuxième facteur est l'inflammation induite lors de la lésion. En effet, l'équilibre entre les facteurs pro et anti-inflammatoires après une LMT induit des effets différentiels sur les cellules épendymaires. Une étude récente a montré que lors de la co-culture de cellules souches endogènes issues de moelles de souris, avec des macrophages pro-inflammatoires M1, a conduit à l'expression massive d'iNOS, de $TNF\alpha$ et d'IL-1 β induisant la prolifération des cellules souches via la signalisation MAPK. En revanche, la co-culture avec des cellules M2 anti-inflammatoires a augmenté l'expression de l'arginase et d'IL-10 réduisant ainsi la prolifération de ces cellules et favorisant leur différenciation vers un profil neuronal [167].

Le troisième facteur est l'accumulation des protéines inhibitrices dérivées de la myéline, telles que Nogo-A, la MBP, la glycoprotéine associée à la myéline, ainsi que la molécule de guidage répulsive A, qui servent de barrières majeures à la régénération axonale suite à la lésion. En effet, ce n'est que récemment que la réponse des cellules souches de la moelle à ces molécules a été élucidée. En effet, il a été démontré que la diminution de leur potentiel de prolifération et de différenciation est due à l'expression du récepteur Nogo-66 par ces cellules. Ce dernier est un

récepteur commun à de nombreuses protéines inhibitrices dérivées de la myéline [168].

Une meilleure compréhension des réponses des cellules souches endogènes de la moelle suite à la LMT pourrait aider à cibler et moduler les cascades de signalisations régulatrices de leur prolifération et de leur différenciation. Ceci pourrait offrir une stratégie thérapeutique plus ciblée et plus efficace.

De plus, une meilleure investigation de la contribution cellulaire et fonctionnelle des cellules épendymaires, dans la cicatrice médullaire, pourrait également améliorer les stratégies thérapeutiques et ainsi le rôle bénéfique de la cicatrice tout en atténuant les effets inhibiteurs de cette dernière sur la régénération axonale.

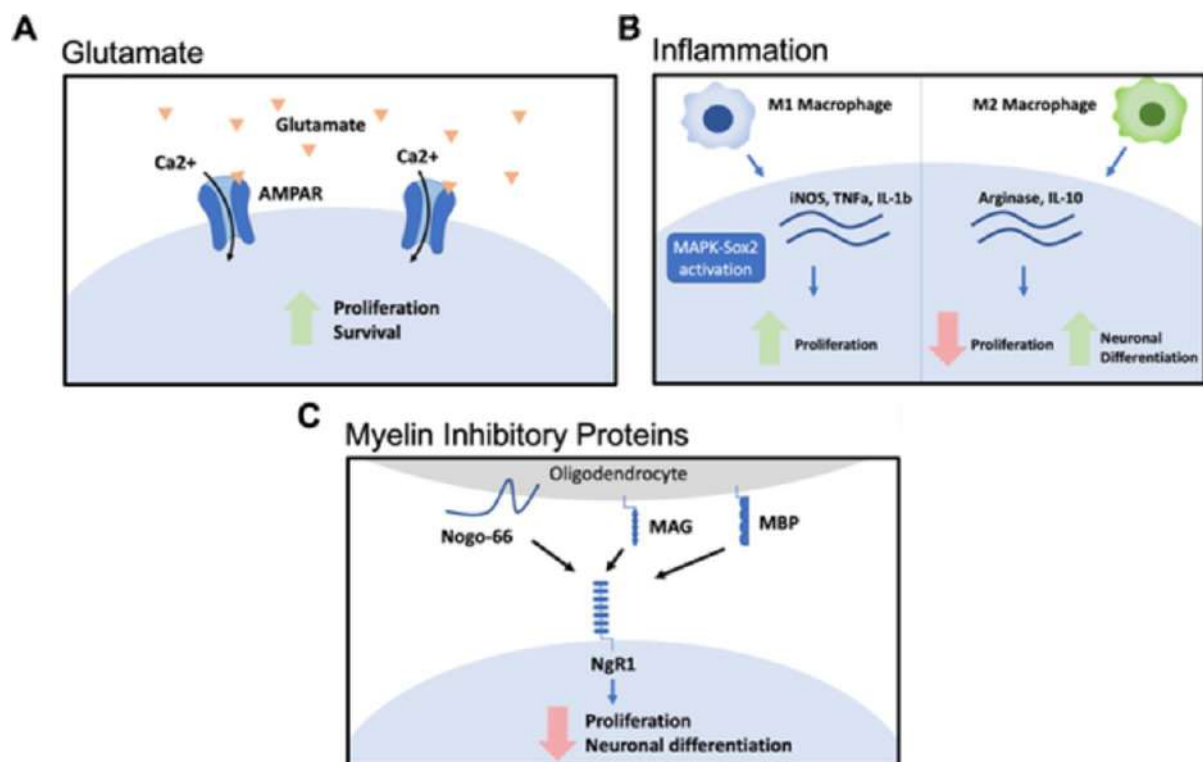


FIGURE 4.10 Les différents facteurs déclenchant l'activation de ces cellules souches endogènes de la moelle spinale. A) la libération du glutamate B) l'inflammation induite lors de la lésion C) l'accumulation des protéines inhibitrices dérivées de la myéline telles que Nogo-A et MBP. D'après [163]

Chapitre 5

Les stratégies thérapeutiques et leurs cibles

Bien que ces dernières décennies, de nombreuses études ont permis d'apporter une meilleure compréhension de la physiopathologie des LMTs, il n'existe malheureusement pas, à l'heure actuelle, de traitement permettant une récupération des fonctions neurologiques perdues.

Dans ce chapitre, nous nous concentrerons sur les différentes approches thérapeutiques utilisées dans le cadre des lésions médullaires traumatiques, une attention particulière sera portée sur les thérapies utilisées dans les différents travaux de recherche qui composent ma thèse.

5.1 Approche neuroprotectrice

Un certain nombre d'innovations médicales et technologiques ont permis d'améliorer la prise en charge et la qualité de vie des patients médullo-lésés dès la phase primaire de la lésion, en mettant en place une stratégie neuroprotectrice afin de freiner et d'éviter la survenue des lésions secondaires. Cette stratégie est basée sur une prise en charge des patients le plus précocement possible. Dès l'arrivée des secours, les premiers gestes consistent à mettre en place l'immobilisation de l'axe crano-spinal du patient. Suite à cela une administration d'agents pharmacologiques est effectuée afin de maintenir une perfusion médullaire optimale et d'atténuer les phénomènes inflammatoires par le biais de l'injection de minocycline [169, 170] ou de granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) [171], à cela vient s'ajouter l'administration d'agents visant à réduire les signaux causant l'environnement excitotoxique via des injections de Riluzole [172]. Enfin une intervention chirurgicale dans le but de décompresser la moelle afin de diminuer les risques d'aggravation de la lésion peut être effectuée [173].

Bien que cette stratégie de neuroprotection a permis de réduire le taux de mortalité précoce chez les patients médullo-lésés et ainsi d'améliorer leur qualité de vie, la physiopathologie de la lésion médullaire reste complexe et aucune de ces stratégies ne permet d'induire une récupération fonctionnelle. Notamment du fait que ces stratégies ne ciblent que peu la cascade d'évènements qui constituent les lésions secondaires.

Diverses stratégies thérapeutiques sont en cours de développement, certaines semblent prometteuses et ciblent plus spécifiquement les différents dommages liés à la lésion, dans le but de favoriser la régénération et de remplacer les cellules perdues [174]. Cette recherche nécessite une connaissance précise et chronologique des différents évènements permettant de définir une fenêtre thérapeutique efficace pour chacune de ces stratégies [fig. 5.1] [175].

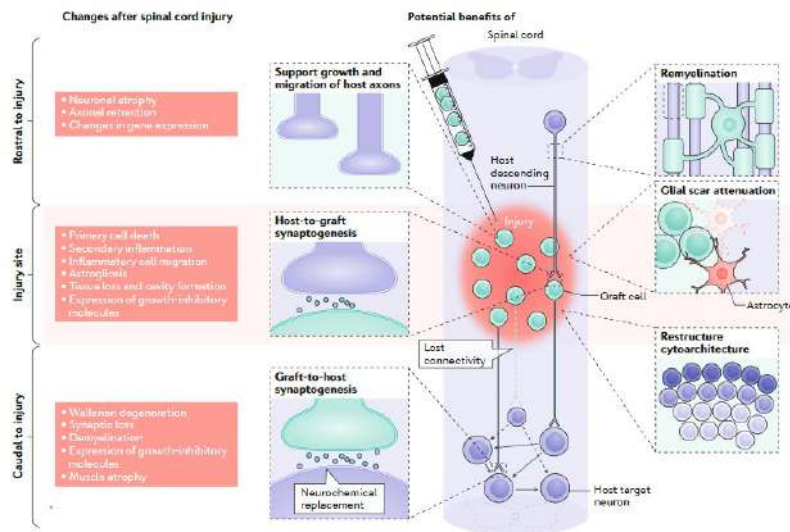


FIGURE 5.1 Les différentes cibles thérapeutiques des stratégies neuroprotectrices et neurorégénératives liées à la physiopathologie de la lésion de la moelle spinale. D'après [176]

5.2 Approches neurorégénératives

Cet axe thérapeutique cible la régénération axonale, la remyélinisation et le remplacement cellulaire. Il se base principalement sur deux approches : la pharmacologie et la thérapie cellulaire [fig. 5.2].

5.2.1 Approche pharmacologique

Le microenvironnement lésionnel après LMT, induit la sécrétion d'un certain nombre de molécules inhibitrices constituant la matrice extracellulaire notamment les CSPG (Neurocan, brevicane, et versican). Ils sont décrits comme inhibiteurs de la repousse axonale via leur rôle sur l'enzyme $PTP\sigma$ d'où l'intérêt thérapeutique de bloquer cet enzyme [177]. Une autre glycoprotéine inhibitrice, qui a été étudiée comme une cible thérapeutique potentielle, est la Nogo-A qui active la voie de signalisation Rho-ROCK via son récepteur.

Une stratégie destinée à bloquer la protéine Nogo-A ou ses récepteurs a été proposée, on peut citer des anticorps anti-Nogo-A (ATI355) ou des inhibiteurs de la voie de signalisation Rho-ROCK (Cethrin). Ces stratégies ont montré leur efficacité sur des modèles lésionnels chez le rat [178]. Des inhibiteurs de la voie de signalisation Rho-ROCK ont été utilisés dans un essai de phase II et sont en cours de phase III depuis 2016 chez des patients lésés au niveau cervical [179].

5.2.2 La thérapie cellulaire

La transplantation cellulaire est une stratégie prometteuse, qui fait appel aux potentiels spécifiques de chaque type de cellules utilisées. Ceci afin de créer un environnement favorable à la régénération axonale via la sécrétion de molécules neurotrophiques, de facteurs anti-apoptotiques, par la modulation de l'inflammation, ou la stimulation de l'angiogenèse. Elles sont aussi utilisées comme source potentielle de remplacement des cellules mortes suite à la LMT.

Divers types cellulaires ont été étudiés, montrant leurs effets bénéfiques au niveau de la zone lésionnelle. Ceci est dépendent du type cellulaire transplanté, de son état de différenciation (dans le cas de la transplantation de cellules souches), et du moment de la transplantation par rapport à la chronologie de la lésion [180]. Les types de cellules étudiés sont notamment : les différents types de cellules souches ; les cellules souches pluripotentes induites (IPSC), les cellules souches neurales (NSC), les cellules souches mésenchymateuses (MSC) et également certaines cellules différenciées comme : les cellules de Schwann ou les cellules gliales olfactives.

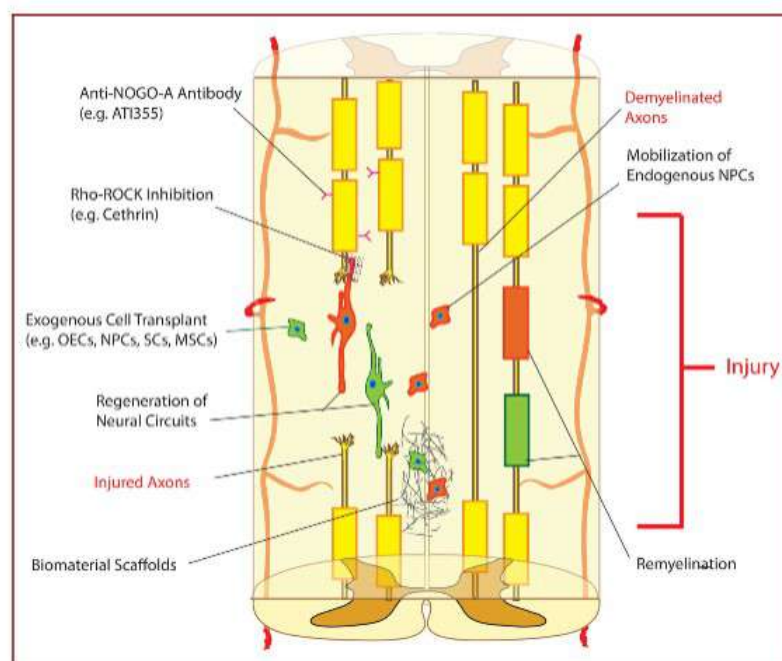


FIGURE 5.2 **Les différentes approches neurorégénératives.** ciblant la remyélinisation, la régénération axonale et le remplacement cellulaire y compris le traitement par anticorps anti-NOGO-A, inhibition de Rho-ROCK et la transplantation cellulaire telle que les iPSC-NPC, ES-NPC, OEC, SC, BMC, MSC, l'implantation de biomatériaux et la mobilisation des cellules endogènes. D'après [181]

Dans cette partie, nous nous concentrons sur la transplantation des cellules gliales olfactives qui fait l'objet des sections *Article II* et *Projet III* de mon manuscrit de Thèse.

5.2.2.1 Les cellules gliales olfactives (CGO)

Les cellules gliales olfactives proviennent du système olfactif primaire qui correspond anatomiquement à l'épithélium et aux bulbes olfactifs. De ce fait, on peut distinguer deux types de CGO : les CGO issues de la muqueuse et les CGO bulbaires. Elles présentent une hétérogénéité morphologique et antigénique en fonction de leur origine anatomique, mais ont des similitudes avec deux autres types cellulaires présents au sein du SNC et du SNP : les astrocytes et les cellules de Schwann. Elles ont en commun la même origine embryonnaire que les cellules de Schwann ; la crête neural et partagent de ce fait un certain nombre de marqueurs comme le S100 β , la GFAP et le P75NTR [182]. Concernant le P75, il est exprimé de manière différentielle par les deux sous-types de CGO, il est fortement exprimé par les CGO de la muqueuse (P75High) et faiblement par les CGO bulbaires (P75Low). En effet, ces différences entre les CGO du bulbe et de la muqueuse ont été étudiées par Guérout et al. en 2010 via des analyses transcriptomiques. Ils ont pu démontrer que les CGO de la muqueuse surexpriment des gènes impliqués dans la régulation de la matrice extracellulaire alors que les CGO provenant des bulbes surexpriment des gènes impliqués dans la régénération et la guidance axonale [183].

Les CGO ont été étudiées dans le cadre de la lésions nerveuses centrales et périphériques du fait de leur capacité à stimuler la repousse axonale et à migrer au sein du site lésionnel [184]. De plus, dans le cadre des LMTs, il a été démontré que les CGO se mélangeaient librement aux astrocytes sans déclencher une hyperréactivité de ces derniers [185]. De ce fait, les CGO peuvent migrer au sein de la cicatrice gliale. Il a été également démontré, par Mayeur et al. en 2013, que la transplantation de CGO dans un modèle murin de la lésion médullaire sévère permettait d'observer une récupération motrice au cours du temps ainsi qu'une modulation de la cicatrice gliale [186]. En effet, les CGO sont capables de créer un microenvironnement permissif à la repousse axonale, de moduler l'inflammation, de favoriser la remyélinisation et l'angiogenèse [187] via la sécrétion de facteurs neurotrophiques tels que NGF, BDNF, GDNF et des protéines de la matrice extracellulaire comme la laminine, la fibronectine, le collagène de type IV [188].

Cependant, ces résultats concernant les effets de la transplantation des CGO après LMT ne sont pas retrouvés dans toutes les études. Cette variabilité quant aux résultats observés peut être due à diverses raisons : la source anatomique du prélèvement des cellules (muqueuse ou

bulbes olfactifs), les conditions de culture (purifiée ou non), le délai entre la culture cellulaire et la transplantation ou encore la temporalité entre la lésion et l'injection des cellules [187, 189].

Néanmoins, le potentiel thérapeutique des CGOs a encouragé les chercheurs à étudier leur efficacité lors d'essais cliniques. Une première étude, publiée par Tabakow et al. en 2013, incluait 6 patients ayant une LMT au niveau thoracique. Ces patients avaient bénéficié d'une transplantation autologue de CGO issues de la muqueuse olfactive. Suite à cette transplantation, ils ont été suivis pendant un an. Chez ces patients, il a été constaté que les transplantations étaient bien tolérées mais qu'elles n'entraînaient que peu de récupération fonctionnelle [190]. En revanche, en 2014 la même équipe a publié un « case report » qui a eu un retentissement médiatique important. Cette étude rapportait le cas d'un patient ayant subi une transection médullaire au niveau thoracique suite à une agression à l'arme blanche et qui avait pu bénéficier d'une transplantation de CGO non purifiées prélevées à partir de l'un de ses bulbes olfactifs. Cette transplantation était additionnée d'un pontage nerveux et d'une rééducation intensive.

Suite à cette association thérapeutique, plusieurs mois après l'intervention, des sensations liées aux étages médullaires sous lésionnels ont été enregistrées et une récupération fonctionnelle très prometteuse chez ce patient fut observée [191].

5.2.3 La neurostimulation

La neurostimulation a été considérablement étudiée au cours de ces dernières années. Plusieurs études se sont intéressées à ses effets sur différentes pathologies, telles que, les troubles du mouvement, les troubles psychiatriques, la douleur (y compris douleur neuropathique et céphalées primaires), l'épilepsie, les troubles cognitifs et certaines maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou bien encore la maladie de Parkinson.

Récemment, quelques études se sont intéressées à l'utilisation de la neurostimulation dans le contexte des LMTs, en se basant sur des outils déjà existants et utilisés dans d'autres pathologies. On peut ainsi citer la stimulation trans-spinale à courant continu «Trans spinal Direct Current Stimulation (TsDCS)», la stimulation électrique transcutanée «Transcutaneous Electric Stimulation (TsESS)», la stimulation électrique épidurale «epidural electrical stimulation (EES)» et la stimulation magnétique transcrânienne «transcranial magnetic stimulation (TMS)».

Ces approches ont des modes d'action et des cibles thérapeutiques distincts [192] :

1. Stimuler des aires cérébrales spécifiques afin de supprimer ou d'induire un effet immédiat, tel que, stimuler la région locomotrice mésencéphalique associée à l'initiation et au contrôle des mouvements locomoteurs dans le cadre des troubles de la marche et de l'équilibre.
2. Cibler les voies motrices en se basant sur leur neuroplasticité, comme par exemple, le tractus corticospinal latéral qui est une liaison directe entre le cortex moteur et les motoneurons de la moelle spinale et qui contrôle ainsi les muscles des extrémités et permet le contrôle volontaire de ces muscles.
3. Stimuler des régions cérébrales spécialement adaptées à être un centre de réparation spontanée au traumatisme et qui répond dans ce cadre aux stimulus aversif sensoriel et chimique liée à ce traumatisme (des cytokines circulantes, l'hypothermie, perte de conscience et la nociception). Dans ce cas, la stimulation induit ce potentiel via la libération d'un certain nombre de facteurs trophiques par ces régions, tels que les noyaux du raphé innervant la moelle spinale et modulant les influx sensoriels liés à la douleur et la substance grise périaqueducule.

5.2.3.1 Les techniques de stimulation à caractère invasif

La stimulation électrique épидurale (EES) :

L'EES est une technique d'électrostimulation invasive, elle correspond à un dispositif constitué de deux parties : un réseau d'électrodes implantées dans l'espace épидurale sous la région lésée de la moelle spinale et qui est relié à un stimulateur (batterie) greffé sous la peau de l'abdomen délivrant des courants électriques en continu [fig. 5.3].

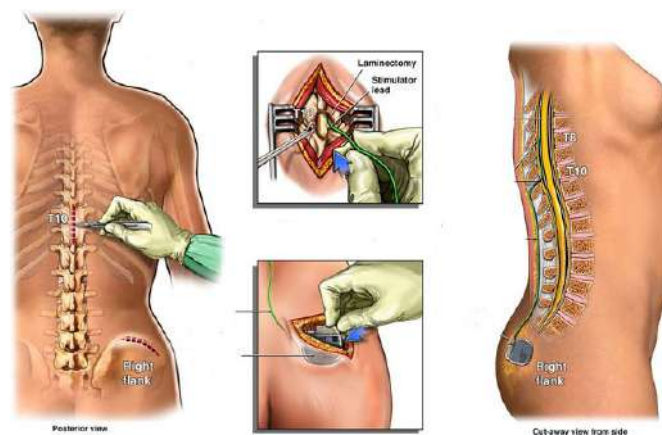


FIGURE 5.3 La stimulation électrique épидurale (EES). D'après [193]

Le but de ce système est de stimuler les réseaux sensori-moteurs spinaux qui sont fonctionnellement déconnectés du cerveau en raison de la lésion. Malgré son caractère invasif, depuis quelques années, plusieurs équipes se sont intéressées à cette approche et ont commencé les essais cliniques sur des patients médullo-lésés de manière chronique.

En 2017, Grahn et al. ont démontré que, suite à l'implantation d'un stimulateur de type EES sur un patient qui présentait une paralysie sensori-motrice complète, ce dernier, deux semaines après l'implantation du dispositif, pouvait se tenir debout et contrôler ses mouvements. Le patient était aidé pour cela d'un dispositif de soutien permettant de le maintenir en position debout [194].

La même équipe a poursuivi ses études en augmentant le nombre de patients. Au total, six patients avec une lésion de sévérité comparable à celle du premier patient, ont pu bénéficier de l'implantation des électrodes. Dans ce protocole, les patients ont bénéficié, en plus de l'EES, d'un entraînement sur tapis roulant pendant 43 semaines. Les patients étaient également toujours aidés du dispositif de soutien à la posture. Cette combinaison de traitement entre stimulation, rééducation et dispositif de soutien à la posture a montré que les patients pouvaient marcher en utilisant un déambulateur à roues [fig. 5.4] [195].

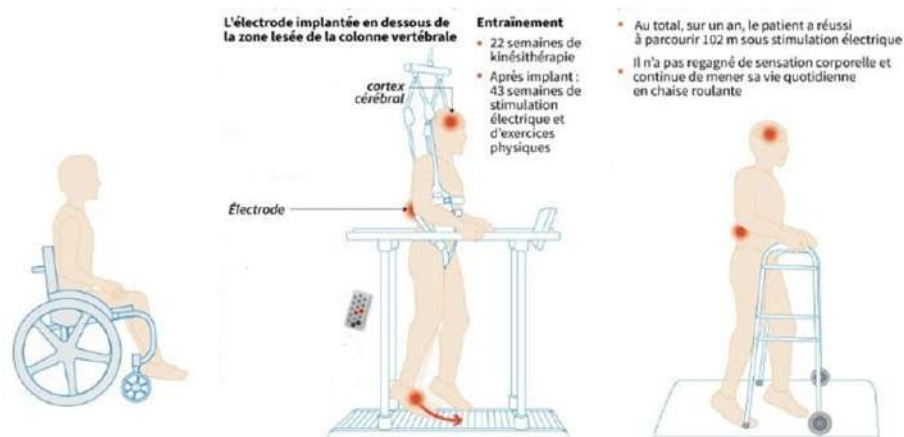


FIGURE 5.4 Illustration schématique d'une étude clinique de la stimulation électrique épurale (EES).
D'après [195]

Ces deux études montrent que l'EES est une thérapie prometteuse, mais, qui seule, n'est pas en mesure de restaurer chez ces patients une activité motrice robuste et coordonnée. De ce fait, d'autres études se sont intéressées à l'utilisation de l'EES en combinaison avec d'autres approches thérapeutiques. Notamment, l'étude menée par Dominici et al. en 2012 portant sur un modèle murin qui avait subi une transection complète au niveau T7. Ces animaux avaient

bénéficié d'une implantation du stimulateur épidural entre L2 et S1 associée à l'administration d'un agoniste sérotoninergique (Quipazine) et d'un programme de rééducation sur tapis roulant. De la même manière que dans les études cliniques préalablement présentées, les animaux étaient soutenus grâce à un support par le biais de harnais. Ce programme commença 7 jours après la lésion à raison de 40 min /jour, pendant 2 mois. Avant chaque séance, le rat recevait une dose de Quipazine. A l'issue de cette combinaison de traitement, une récupération motrice a été observée [fig. 5.5] [196].

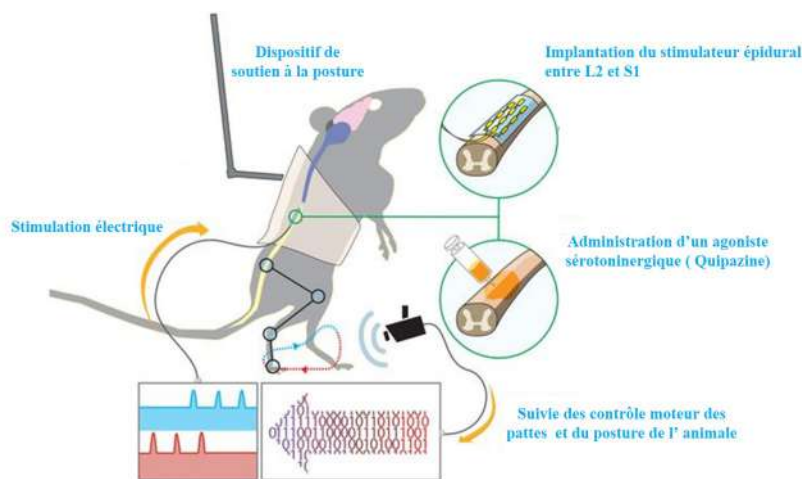


FIGURE 5.5 Illustration schématique des résultats observés d'après l'étude. D'après [196]

Cette étude a été transposée chez l'homme en 2018, l'essai comportait 3 patients présentant des déficits moteurs ou une paralysie complète depuis plus de quatre ans. Les trois patients ont reçu un programme de rééducation associé à la stimulation épidurale et à un système de harnais permettant le maintien de la posture. Dans cette étude le système de stimulation était très précis ciblant chaque muscle du membre paralysé. Cette étude a montré que ces patients ont pu récupérer le contrôle volontaire des muscles des jambes et également que ces patients pouvaient marcher à l'aide de béquilles ou d'un déambulateur.

Ces thérapies basées sur l'EES sont très prometteuses notamment lorsqu'elles sont associées à des traitements pharmacologiques ou de la rééducation. Toutefois, il a été démontré que la récupération fonctionnelle, pouvant être observée après traitement, n'est pas maintenue en absence de rééducation ou lorsque le stimulateur est désactivé. De plus, le recours à l'EES reste invasif [197].

5.2.3.2 Les techniques de stimulation à caractère non invasif

La stimulation trans-spinale à courant continu (TsDCS) :

La TsDCS est une technique de stimulation non invasive. Elle consiste à moduler l'excitabilité des neurones au niveau d'une région donnée [198]. Ceci se fait grâce à l'induction d'un courant électrique d'intensité relativement faible (1.5-2.5 mA) via deux électrodes, une première positionnée sur la moelle spinale et la deuxième positionnée (la référence) au niveau du bras droit [fig. 5.6] [199].

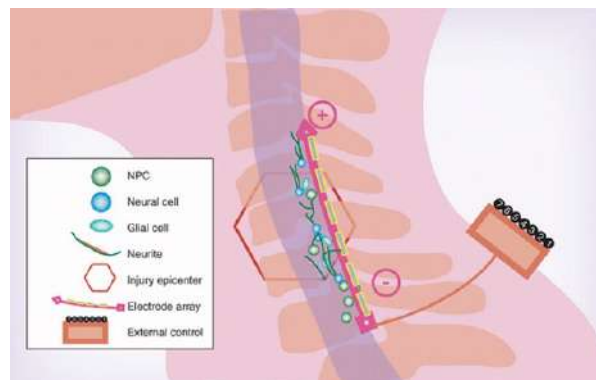


FIGURE 5.6 La stimulation trans-spinale à courant continu (TsDCS). D'après [200]

Avant d'être appliquée aux LMTs, cette technique s'est avérée efficace pour un certain nombre de pathologies du SNC tels que les accidents vasculaires cérébraux [201] ou la sclérose en plaque [202], en modulant l'excitabilité de la région ciblée. Des effets indésirables ont été rapportés lors d'une mauvaise utilisation comme des crises d'épilepsies, des sensations d'inconfort et également des brûlures cutanées [203].

À l'heure actuelle, la TsDCS est donc une technique de neuromodulation prometteuse mais son utilisation dans le cadre des LMTs est encore en cours d'étude. Une meilleure compréhension des effets neurobiologiques et physiologiques de la TsDCS est nécessaire afin de mieux maîtriser son utilisation de manière efficace et sécurisée.

Une des limites de cette technique en comparaison aux autres techniques de stimulation non invasives comme la stimulation magnétique, c'est qu'elle induit un courant de faible intensité qui modifie le potentiel membranaire de repos des neurones, alors qu'en comparaison, la stimulation magnétique induit un courant électrique suffisant pour permettre de déclencher un ou une série de potentiels d'action et ainsi de stimuler la plasticité neuronale et produire des effets neurobiologiques maintenus à long terme.

La stimulation magnétique transcrânienne (TMS) :

La TMS fait partie des techniques médicales de stimulation du SNC. Tout d'abord, elle a été utilisée comme outil de diagnostic en mesurant les seuils d'excitabilité et les vitesses de conduction motrice chez des patients souffrant de déficits moteurs. Par la suite, son efficacité thérapeutique a été mise en évidence dans diverses pathologies psychiatriques comme la dépression [204] et également chez des patients après AVC [205]. Cette technique a aussi prouvé, de manière indirecte, son efficacité tant au niveau fonctionnel que cellulaire chez des patients souffrant de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson [206] ou la maladie d'Alzheimer [207].

Elle se distingue par son caractère non invasif et indolore, sa facilité d'utilisation et la rareté des effets secondaires observés. Le mécanisme d'action de la TMS repose sur le principe de l'induction mutuelle décrit par Michael Faraday en 1831, basé sur l'induction de pulsations électriques au sein d'une bobine électromagnétique placée au contact de la région d'intérêt. Un champ magnétique est généré par le courant circulant dans cette bobine, il est dirigé perpendiculairement en direction de la région à stimuler tout en passant à travers les os et les tissus sans être modifié. Ces pulsations magnétiques induisent un courant électrique dans la région en question [fig. 5.7] [208].

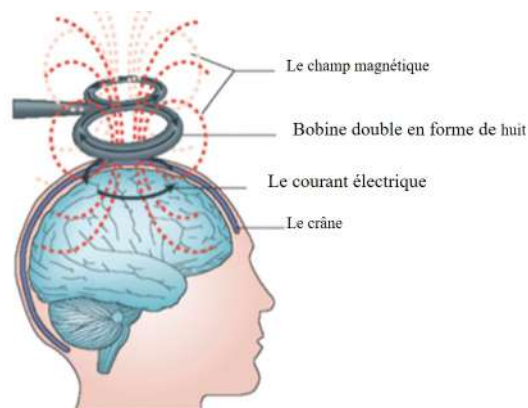


FIGURE 5.7 Le mécanisme d'action de la TMS. D'après [208]

L'équipement de la TMS est composé : (1) d'une **unité centrale** destinée à paramétrer le programme de stimulation (fréquence, intensité de stimulation, nombre de stimuli, durée) et (2) d'une **bobine de stimulation**. Il existe des bobines de différentes tailles, formes et modèles. Ce sont ces caractéristiques qui vont déterminer l'étendu spatial du champ et sa résolution [209]. A titre d'exemple, lorsque des bobines plates circulaires avec un simple fil de conduction embobiné sont utilisées, le courant induit se propage de manière circulaire. Ce type

de bobine possède un pouvoir de pénétration élevée, mais peu sélectif spatialement ($> 4\text{--}5\text{cm}^2$). En revanche, les bobines doubles ou en forme de huit composées de deux enroulements de fil de cuivre qui se croisent l'un avec l'autre, de telle sorte qu'il y ait une sommation des courants électriques au niveau de leur point d'intersection (hot spot), génèrent un champ magnétique plus focal ($1.5\text{--}2\text{cm}^2$ pour des bobines possédant un diamètre de 25 à 70 mm) [fig. 5.8] [210].

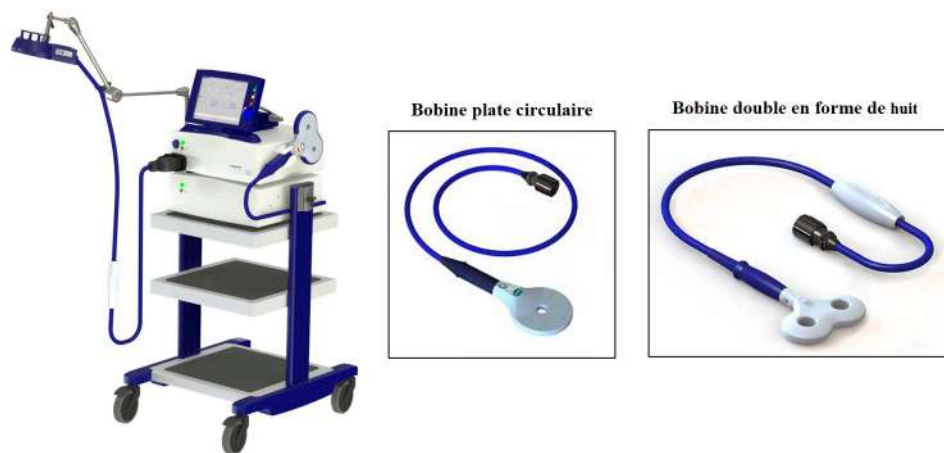


FIGURE 5.8 Les différents équipements de la stimulation magnétique transcrânienne.

La seule contre-indication absolue à l'usage de la TMS est la présence de matériels métalliques en contact ou à proximité de la bobine tels que des implants ou un pacemaker qui peut induire un dysfonctionnement de ces derniers.

La technique de TMS, telle que nous la connaissons actuellement, a été mise au point en 1985, par Barker et al. en stimulant le cortex cérébral à l'aide d'une bobine produisant un champ magnétique bref et intense à la surface du scalp. Le champ magnétique produit par la bobine est faiblement atténué par les tissus traversés et produit alors un courant électrique suffisant pour induire une dépolarisation au niveau des axones des neurones corticaux. Il est classiquement décrit que la TMS peut être appliquée à basse fréquence $< 1\text{Hz}$ et est décrite alors comme « inhibitrice » ou à haute fréquence $> 5\text{Hz}$ décrite alors comme « excitatrice » ou « facilitatrice » de l'activation pyramidale évoquant par similitudes les notions de la potentialisation à long terme et la dépression synaptique à long terme. Ces notions quant à l'effet « excitateur » ou « inhibiteur » de la TMS sont à relativiser car ils sont dépendants des paramètres de la stimulation et laissent entendre que les effets de la TMS ne sont liés qu'à la dépolarisation ou la repolarisation des

neurones. En effet, il existe deux types distincts de TMS :

1. la TMS par impulsion unique : utilisée généralement comme méthode de pronostic notamment pour définir la cartographie des « outputs » corticaux moteurs ou pour étudier le temps de conduction moteur.
2. la stimulation magnétique utilisée de manière répétée, et dite « répétitive » : rTMS, utilisée le plus souvent en application clinique, elle consiste à émettre une série d'impulsions pendant un intervalle de temps donné de façon à modifier durablement l'activité de la région visée.

Les effets décrits comme « excitateurs » ou « inhibiteurs » sont ceux décrits lors de mesures de potentiels évoqués moteurs (PEM) enregistrés après une stimulation magnétique par TMS du cortex moteur primaire [208, 211].

Comme évoqué précédemment, cette technique de neuromodulation a été utilisée dans plusieurs pathologies. Depuis la fin des années 80, plusieurs études ont pu démontrer l'efficacité de la stimulation magnétique (SM) notamment dans des modèles de la lésions des nerfs périphériques. Ces études ont mis en évidence que la SM induisait une croissance et une régénération *in vitro* et *in vivo* suite à ces lésions. De la même façon, l'effet de la SM a été étudié dans des modèles de la lésions cérébrales. Néanmoins, peu d'études se sont intéressées à l'application de la TMS au niveau de la moelle spinale et en particulier dans un cadre lésionnel.

On peut toutefois citer une première étude de 1976 dans un modèle de chat ayant subi une héli-cordotomie. Les auteurs dans cette étude ont pu démontrer que la SM a induit chez le chat une repousse axonale au niveau de la cicatrice [212]. Une autre étude a permis de mettre en évidence après une transection médullaire dans un modèle de chat que la SM diminuait la mort cellulaire au niveau de la corne ventrale [213].

C'est seulement en 2003 que Crowe et al. se sont intéressés à l'effet de la stimulation magnétique en utilisant une bobine développée spécifiquement par le laboratoire, et non un modèle commercial, dans un modèle de chat ayant subi une contusion médullaire au niveau thoracique (T5-T6). Cette étude a montré, pour la première fois, l'effet neuromodulateur et régénératif de la SM via la récupération motrice observée chez le groupe stimulé en comparaison à des animaux contrôles. De plus, dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence que la SM diminuait la taille de la zone de la lésion chez les animaux stimulés [214]. Les mêmes effets bénéfiques de la SM en termes de régénération axonale et de récupération fonctionnelle ont été rapportés dans d'autres études et d'autres modèles de la lésion, comme

dans l'étude de Poirrier et al. où les auteurs avaient utilisé un modèle de compression médullaire thoracique chez le rat [215]. Une autre étude montre également un effet de la SM sur la récupération fonctionnelle lorsqu'elle est associée à des exercices dans un modèle de souris après transection médullaire entre T10-T11 [216]. La particularité de cette étude est qu'elle soit l'une des rares dans laquelle la bobine de stimulation est placée à proximité du site de la lésion [212, 213]. En effet, dans la plupart des études de la SM, dans le cadre de la lésions médullaires, les auteurs utilisent une méthode basée sur la rTMS.

Contrairement à ce qui était décrit précédemment au sujet des effets de la EES, ici les effets induits par le SM sur la récupération fonctionnelle sont persistants, ce qui a justifié l'utilisation de cette thérapie chez l'Homme. Le but de ces études était de mettre en évidence le rôle que pouvait jouer la SM dans les trois problèmes majeurs liés à la lésion médullaire chez l'homme : **1** - le déficit fonctionnel sensitif et moteur, **2** - la spasticité (qui correspond à un désordre moteur auquel s'associe des spasmes en flexion et en extension avec une augmentation du tonus musculaire), **3** - les douleurs neuropathiques et la vessie neurogène [217]. La plupart de ces essais cliniques ont utilisé des protocoles de rTMS en stimulant les aires corticales correspondantes à la zone d'intérêt au niveau du cortex moteur primaire (M1) [218–220]. Toutefois, une étude portant sur des patients souffrant du syndrome de la vessie neurogène (dysnergie vésico-sphinctérienne), a utilisé un protocole de stimulation spinale. Dans cette étude, les patients ont été stimulés au niveau lombaire entre T11 et L1. Seize semaines après le début du protocole, il a été constaté que les patients stimulés avaient retrouvé une capacité à contracter de manière volontaire et contrôler leur sphincter urinaire induisant de ce fait une diminution de la pression vésicale [221].

Bien que cette technique ne soit pas encore d'utilisation routinière, de solides arguments suggèrent son efficacité. Il persiste toutefois une variabilité des effets observés qui peut s'expliquer par les différences quant aux paramètres utilisés, parmi lesquels, on peut citer la fréquence, l'intensité de stimulation, le site de stimulation, le nombre de stimuli, la durée d'un train individuel d'impulsions, l'intervalle inter train, le nombre de trains, le nombre d'impulsions par séance et la durée de traitement.

Ces dernières années, les chercheurs se sont intéressés aux mécanismes neurobiologiques de la SM. Le chapitre suivant se concentrera sur l'étude de ces mécanismes; physiologiques, cellulaires et moléculaires qui peuvent expliquer les effets de cette dernière.

Chapitre 6

Les mécanismes neurobiologiques sous-tendants à l'effet thérapeutique de la stimulation électromagnétique

La stimulation électromagnétique (SEM), comme décrit précédemment, est une méthode clinique efficace pour diagnostiquer et traiter de nombreux troubles neurologiques, psychiatriques et neurodégénératifs. Alors que son principe d'action et ses effets thérapeutiques ont été bien décrits, il existe peu d'études qui démontrent les mécanismes induisant ces effets aux niveaux cellulaires et moléculaires.

Souvent, les recherches menées attribuent l'effet thérapeutique de la SEM à son principe d'action. Ce dernier consiste à l'induction d'un champ électrique traversant le tissu nerveux, par l'application d'un champ magnétique, créé par une bobine, et exploitant ainsi la propriété de plasticité cérébrale afin de provoquer un transfert d'ions à travers la membrane plasmique des neurones et conduire, par la suite, à une dépolarisation ou une repolarisation d'un groupe de neurones adjacents à la stimulation.

D'autre part, les effets observés à la suite de la stimulation, suggèrent une activation indirecte d'autres types de cellules; cellules gliales ou cellules souches, dont la SEM va modifier les cascades de signalisations liées à leur survie, prolifération, différenciation ou sécrétion. Ces cellules ayant une capacité à répondre à l'activité électrique et à la facilitation de l'activité neuronale, fait de ces dernières des effecteurs cellulaires de la SEM.

Tout au long de ce chapitre, nous nous intéresserons aux différents effecteurs cellulaires et moléculaires de la SEM qui induisent ces effets. Une meilleure compréhension de ces mécanismes est essentielle dans une perspective translationnelle afin de mener des protocoles plus efficaces et applicables chez l'homme.

6.1 Les effets neurobiologiques de la stimulation électromagnétique

Depuis quelques années, des études ont montré les effets neurobiologiques de la stimulation électromagnétique dans le SNC. Ceux-ci incluent, à la fois, des effets neurotrophiques, neuroprotecteurs, anti-apoptotiques, neuromodulateurs et neurorégénératifs [fig. 6.1] [222–224].

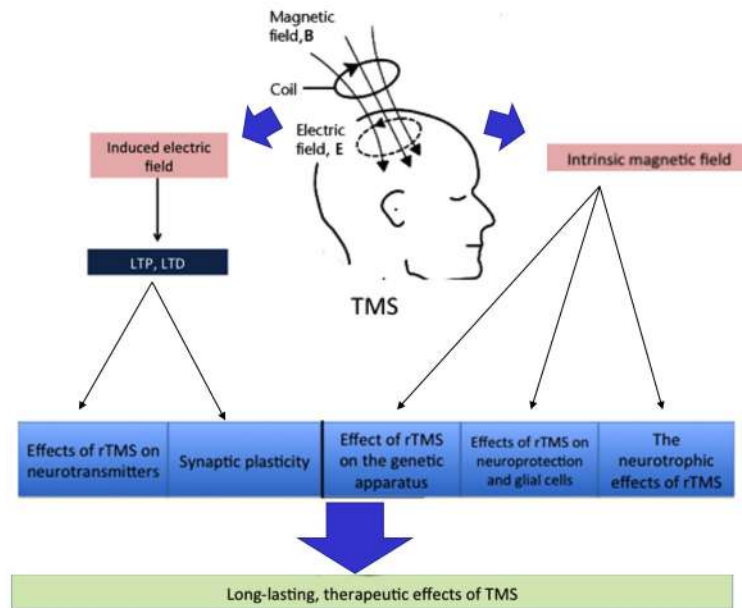


FIGURE 6.1 Représentation schématique résumant les différents effets du champ électromagnétique au niveau du système nerveux central. D'après [225]

6.1.1 L'effet neurotrophique de la SEM

6.1.1.1 L'effet de la stimulation sur les cellules souches neurales

Les cellules souches neurales assurent l'homéostasie des tissus grâce à leurs propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation. Elles se caractérisent également, par leur capacité à maintenir un état de quiescence, dont elles en peuvent sortir pour réintégrer le cycle cellulaire sous l'influence de certains facteurs intrinsèques ou extrinsèques. Ces propriétés ont incité à la recherche des mécanismes qui influencent leur auto-renouvellement et leur différenciation de manière contrôlée et non invasive, dans le cadre de maladies neuropathologiques.

Dans ce contexte, il a été prouvé, dernièrement, que l'application de la SEM peut stimuler les processus endogènes des cellules souches. L'étude menée par Abbasnia et al, en 2015 a montré que la rTMS augmente le taux de prolifération des cellules souches neurales présentes dans la zone sous-ventriculaire, *in vitro*, ainsi que leur différenciation. Ceci, en appliquant la rTMS au niveau cérébral chez des souris adultes, stimulées tous les jours pendant deux semaines à une fréquence de 30 Hz [6]. Le même résultat a été observé, *in vivo* dans l'étude de Ueyama et al. en 2011, montrant l'augmentation significative du nombre de cellules bromodeoxyuridine positives (BrdU⁺) au niveau du gyrus denté chez un groupe de rats, suite à une stimulation pendant 14 jours consécutifs à une fréquence de 25 Hz [226].

Dans la littérature, afin d'expliquer cette augmentation de prolifération des cellules souches suite à la SEM, plusieurs mécanismes et facteurs impliqués ont été suggérés ;

La régulation de l'expression des gènes par les microARN : miR-25

En 2011, l'étude de Perruisseau-Carrier a prouvé qu'un certain nombre de microARN jouent un rôle dans la différenciation et la prolifération des cellules souches [227]. Dans ce contexte, il a été observé dans l'étude de Brett et al, que la rTMS induit une prolifération des cellules souches au niveau de la zone sous-ventriculaire (SVZ) en régulant l'expression du microARN (miR-25), dans un modèle d'ischémie cérébrale focale [228] ; ce microARN (miR-25) étant connu comme étant favorable à la prolifération des cellules souches neurales via l'inhibition de l'expression de la Kinase dépendante des cyclines p57 [229].

La libération des facteurs neurotrophiques et l'induction des voies de signalisation : le BDNF

Le facteur neurotrophique BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) est un facteur clé pour l'augmentation de la prolifération des cellules souches neurales au niveau de l'hippocampe. Il a été prouvé que l'application de la rTMS sur un modèle murin induit l'augmentation de l'expression de facteur, ainsi que celle du pERK1/2, dans les aires hippocampiques CA1 et CA3. Cette augmentation suggère ainsi l'effet de la SEM sur l'activation de la voie de signalisation BDNF/ERK, régulatrice de la prolifération cellulaire au niveau de l'hippocampe [fig. 6.2] [230].

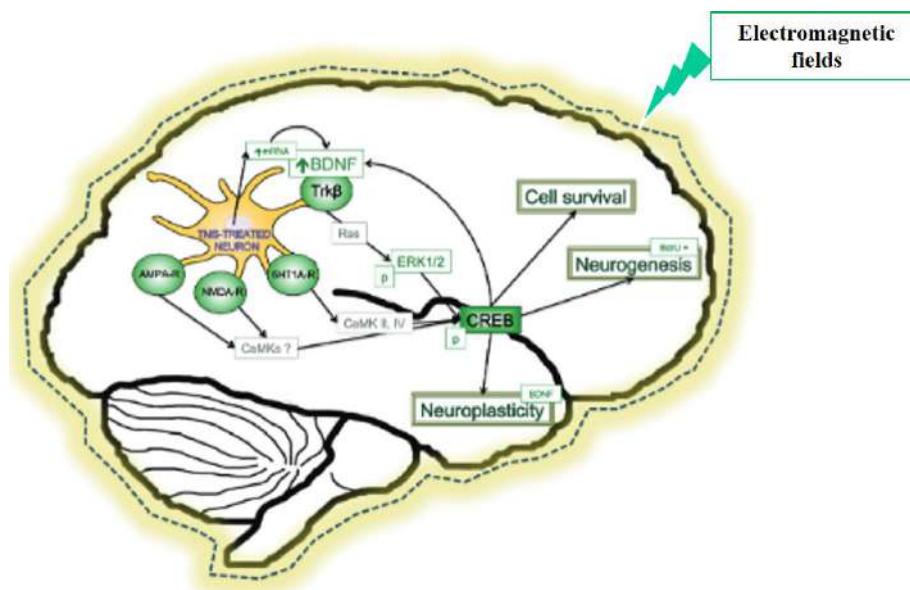


FIGURE 6.2 Les différents mécanismes cellulaires et moléculaires induits par le champ électromagnétique sous-tendant à l'effet neurotrophique. D'après [223]

La libération des neurotransmetteurs :

La présence de neurotransmetteurs dans le milieu extracellulaire des cellules souches neurales favorise leur prolifération. Ceci a été mis en évidence par l'étude de Mengchu et al, montrant que la présence de la dopamine et de la sérotonine exerce une influence positive sur la prolifération des cellules souches neurales de la SVZ [231]. Ces résultats sont également corroborés par l'étude de Tong et al. démontrant que la libération de la sérotonine par les neurones du noyau du raphé peut agir sur les récepteurs 5HT-2C et 5HT-2A présents au niveau des cellules souches neurales, situées dans la zone sous-ventriculaire (SVZ), provoquant leur dépolarisation, et ainsi, favorisant leur prolifération [232]. De même, la libération de la sérotonine dans l'hippocampe peut favoriser la neurogenèse [233]. Ainsi, l'hypothèse d'un effet modulateur, direct ou indirect, de la rTMS sur la libération de neurotransmetteurs augmentant ainsi la prolifération de cellules souches, n'est pas à exclure [234].

6.1.2 L'effet neuroprotecteur de la SEM

6.1.2.1 L'effet de la SEM sur la survie et la maturation des oligodendrocytes :

Outre ces effets sur la prolifération des cellules souches neurales, les mécanismes d'action de la SEM sont également impliqués dans les processus de survie et de maturation des oligodendrocytes. En particulier, le mécanisme de libération des neurotransmetteurs dans le microenvironnement cellulaire, et surtout celle de l'adénosine et du BDNF, exerce une influence directe sur l'oligodendrogenèse et la myélinisation. En effet, ces deux derniers sont deux neurotransmetteurs clés dans ces processus [92, 235, 236].

Dans ce contexte, l'étude de Sherifat et al, sur un modèle murin de démyélinisation par induction chimique via l'injection de lysolécithine au niveau du corps calleux, a montré une augmentation significative du taux de myélinisation suite à l'application de la SEM à partir du premier jour de l'injection et ce durant 14 jours [237]. De même, une récente étude de Cullen et al, en 2019, a montré que l'iTBS, une nouvelle forme de rTMS ayant le même principe d'action avec une unique différence étant la durée de la stimulation (37 minutes/séance pour la rTMS contre 3 minutes/séance pour l'iTBS), à une fréquence de 10 Hz effectuée au niveau du cortex sain d'un modèle de souris transgénique PDGF β -CreER^{T2}::YFP, induit une augmentation du nombre d'oligodendrocytes nouvellement différenciés (YFP⁺, olig2⁺, PDGF β ⁻). Cette augmentation a été déduite à travers une quantification du ratio de cellules incorporant l'EDU et exprimant le PDGF β par rapport à la totalité des cellules PDGF β ⁺. Néanmoins, grâce à un test Tunel, les auteurs ont pu constater que l'iTBS augmente le nombre de nouveaux oligodendrocytes, plutôt, en empêchant ces derniers d'entrer en apoptose et en

préservant la survie des oligodendrocytes prémyélinisants, qu'en favorisant l'oligodendrogenèse. Cette étude a montré également que la SEM augmente le nombre et la longueur des internœuds au niveau des axones [238].

Par ailleurs, ces résultats concordent avec ceux d'une autre étude publiée en 2017 dans laquelle, des cultures de précurseurs oligodendrocytaires humains avaient été stimulés *in vitro* deux heures par jour pendant 14 jours. Dans cette étude une augmentation de l'expression de c-fos, de CNP, de MBP, de l'expression des sous-unités du canal calcique (CaV1.2 et CaV1.3), ainsi que l'expression des facteurs neurotrophiques BDNF et neurotrophine3 (NT3) ont été observés. Ces observations expliquent ainsi les mécanismes potentiels de la SEM sur les oligodendrocytes [239].

6.1.2.2 L'effet anti-apoptotique de la stimulation électromagnétique

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, cause la mort neuronale, non seulement dans des pathologies neurodégénératives chroniques, mais également lors des traumatismes ou des lésions du SNC. Ce processus est complexe et est lié à plusieurs mécanismes tels que l'excitotoxicité, l'ischémie et l'inflammation ; soulignant ainsi l'intérêt d'investiguer l'effet de la SEM sur ces processus.

On peut citer une première étude menée par Gao et al, qui démontre l'effet neuroprotecteur de la rTMS, dans le cadre des accidents vasculaires cérébraux. En utilisant un modèle d'ischémie/reperfusion après occlusion de l'artère cérébrale moyenne, ces travaux ont montré que le traitement à base de rTMS à une fréquence de 20 Hz a augmenté la survie des neurones. Ceci a été objectivé par la diminution du nombre de cellules caspase-3 positives et par l'augmentation du rapport du taux de Bcl-2, le facteur anti-apoptotique, par rapport au facteur pro-apoptotique Bax, engendrant, ainsi, une réduction de la zone de pénombre ischémique [240]. Une autre étude menée par Yoon et al. a montré une récupération fonctionnelle chez les animaux traités par rTMS à 10 Hz dans un modèle d'ischémie cérébrale subaiguë. Cette récupération était probablement induite par une augmentation de la survie neuronale plutôt grâce à des mécanismes anti-apoptotiques en augmentant l'expression des facteurs anti-apoptotiques Bcl2, que par des phénomènes de plasticité neuronale. Cette constatation est due à l'absence de différences significatives d'expression de MAP-2 et NMDA entre les groupes traités. En augmentant la survie neuronale, on induit ainsi un microenvironnement plus permissif à la régénération tissulaire et axonale qui se traduit enfin, par une amélioration locomotrice [fig. 6.3] [241].

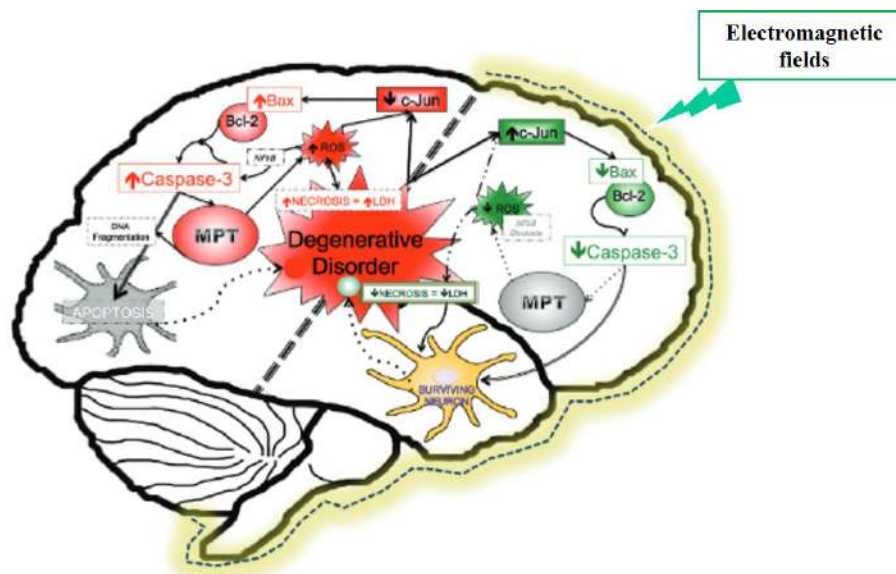


FIGURE 6.3 Les différents mécanismes cellulaires et moléculaires induits par le champ électromagnétique sous-tendant à l'effet anti-apoptotique. D'après [223]

6.1.2.3 L'effet immunomodulateur de la SEM sur le stress oxydatif et la neuroinflammation

La plupart des troubles neurodégénératifs et traumatiques du SNC impliquent des processus inflammatoires dans leurs physiopathologies. En étant les principales cellules immunitaires du SNC, la microglie est activée avec les leucocytes, induisant ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires provoquant une réponse inflammatoire aux conséquences néfastes.

Hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF1 α est un facteur de transcription qui joue un rôle important dans l'activation de la microglie lors des lésions tissulaires. Il est impliqué dans le dysfonctionnement microvasculaire et l'activation de l'inflammation innée. Au sein du SNC, HIF1 α est principalement exprimé par les cellules gliales et les neurones [242]. Une récente étude a montré qu'appliquer une SEM sur des cultures cellulaires de neurones et de cellules microgliales, inhibe l'expression de HIF1 α en diminuant la libération des principaux signaux pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α , IL-6 et IL-8, réduisant ainsi la réponse inflammatoire et la mort cellulaire [243].

Plusieurs cytokines et enzymes pro-inflammatoires semblent être modulées par la SEM. À cet égard, une étude menée dans un modèle de maladie de Parkinson induit par injection intracérébrale d'hydroxydopamine 6-OHDopamine, a montré une augmentation de la survie cellulaire dans la substance noire ainsi qu'un maintien de la libération de dopamine dans le striatum, après traitement à base de rTMS à raison de 0.5 HZ durant 4 semaines. Ceci a été

accompagné d'une régulation positive de l'expression des médiateurs inflammatoires. Cette étude a démontré, également, qu'au moins une partie de l'effet neuroprotecteur de la rTMS provient du fait de réduire l'expression des molécules pro-inflammatoires telles que l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et du TNF α [fig. 6.4] [244].

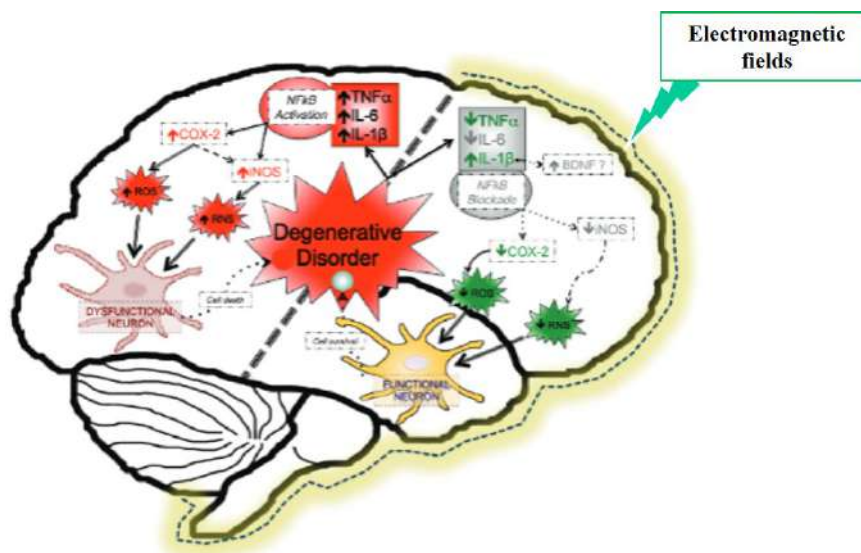


FIGURE 6.4 Les différents mécanismes cellulaires et moléculaires induits par le champ électromagnétique sous-tendant à l'effet anti-inflammatoire. D'après [223]

6.1.3 L'effet neurorégénératif de la SEM au niveau médullaire

La lésion médullaire, comme décrite précédemment, est caractérisée par une phase secondaire qui induit une inflammation, une apoptose, une excitotoxicité, une ischémie et une dégénération axonale, ainsi que la mise en place d'une cicatrice. Ces mécanismes se traduisent, par la suite, par des altérations des fonctions motrices. Bien que des pistes thérapeutiques prometteuses soient en cours de développement, elles ne sont pas encore suffisamment efficaces pour être transposées chez l'homme. A ce jour, aucun traitement, empêchant la propagation des dégâts et induisant des processus de régénération visant la restauration des fonctions neurologiques perdus, n'est approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) [245]. Dans ce contexte, plusieurs études ont montré les effets bénéfiques de la stimulation électrique, épidurale ou directe, sur la récupération fonctionnelle dans le cadre des LMTs. Pour autant, son utilisation reste inefficace à cause de son caractère invasif et des effets indésirables pouvant être causés par ces implantations électriques. [246]. Par conséquent, il était nécessaire d'explorer une nouvelle stratégie non invasive qui vise à limiter les altérations suite à la phase secondaire.

Tout au long de ce qui précède, nous avons décrit les différents effets neurobiologiques de la SEM sur les pathologies du SNC : sa capacité à stimuler la neurogenèse, son effet neurotrophique, immunomodulateur et neuroprotecteur. Tous ces effets font de la SEM un bon candidat qui peut cibler chacun de ces événements caractéristiques de cette phase secondaire.

Peu d'études se sont intéressées à explorer ces effets au niveau de la restauration tissulaire et la récupération fonctionnelle à la suite de LMTs. L'étude menée par Li et al. en 2010 montre pourtant que dans un modèle de la lésion du finuculus dorsalis chez le rat, l'application de la SEM sous forme de rTMS, pendant 5 min/jour durant 2 semaines et à différentes fréquences (1-20 Hz), induit une diminution de la zone de la lésion. Cette diminution est accompagnée d'une augmentation de l'expression de GFAP, MAP2 et ERK1/2 à son épiceutre. De même, il a été démontré que les effets de la SEM sont optimaux à 10 Hz. Ces résultats prouvent ainsi, que l'augmentation de l'expression de la protéine ERK1/2 est corrélée à l'augmentation de l'expression de GFAP ayant un rôle important durant l'astrogliose et dans la voie de signalisation MEK/ERK intervenant dans les processus de prolifération, migration et différenciation cellulaire. Cette étude nous confirme, enfin, que la SEM favorise la migration des astrocytes vers le site de la lésion via l'activation de voies de signalisation ERK1/2 [247]. Dans ce même contexte, une autre étude, menée en 2013, montre, dans un modèle de contusion chez le rat au niveau T9, que la SEM (25 Hz pendant 8 semaines) induit une diminution de l'aire microgliale Iba1⁺ et de l'aire gliale GFAP⁺ au niveau de la corne dorsale de la moelle au niveau L4 et L5 en comparaison du groupe contrôle lésé sans traitement [248]. Dans cette étude, les auteurs se sont intéressés, particulièrement, à la douleur neuropathique, symptôme très présent chez les patients médullo-lésés et altérant souvent leur qualité de vie. Or, il a été démontré, dans une autre publication, que l'activation microgliale au niveau des cornes dorsales contribue à un état hyper-réactif notamment en cas de douleur neuropathique, et qu'une atténuation de cette activation microgliale et astrocytaire est essentielle pour réduire cette douleur [249].

D'autres études se sont intéressées à un autre aspect clinique, la spasticité, qui correspond à un désordre moteur et, en particulier, à des spasmes musculaires fréquents chez les patients atteints d'une lésion médullaire. Ainsi, plusieurs études ont démontré que la rTMS peut atténuer la spasticité après LMT. Bien que les effets de la rTMS sur la spasticité ont été étudiés, les mécanismes sous-jacents à cet effet ne sont pas encore entièrement connus. Dans ce contexte, depuis quelques années, des études ont montré que la voie GABAergique est étroitement corrélée au développement de la spasticité. Pour cette raison, une étude [250] a

appliqué une SEM de 10Hz à différents intervalles de la lésion, en commençant la stimulation au 8^{ème} jour ou 15^{ème} jour après LMT chez des rats. L'objectif était de quantifier l'expression des récepteurs GABAA et B chez le groupe lésé, ainsi que l'effet de la stimulation sur ces récepteurs. En premier lieu, il a été constaté que, lors de la lésion et en absence de traitement, une diminution de l'expression de ces récepteurs survient et que cette diminution est plus importante 14 jours après la lésion que 7 jours après. A l'opposé, lors de l'application de la SEM, on constate une augmentation de l'expression des récepteurs GABA, corrélée à l'expression du BDNF qui se traduit par un soulagement de la spasticité favorisant, ainsi la récupération motrice.

Cette récupération motrice induite par l'effet de la SEM a été étudiée, autrement, en ciblant, cette fois, différents processus conduisant à la réparation fonctionnelle telle que la plasticité synaptique de la moelle via l'augmentation de l'activation du récepteur NMDA. L'étude de Hunanyan et al. fait partie des rares études plaçant la bobine de la SEM directement au niveau de moelle spinale et non pas au niveau transcrânien. Cette étude a montré que la SEM au niveau de la moelle spinale induit une facilitation synaptique à long terme via l'activation du récepteur NMDA, dans un modèle d'hémisection latérale au niveau thoracique. Ceci a été confirmé par l'administration du MK-801, un antagoniste non compétitif du récepteur NMDA avant la SEM, qui a montré une inhibition de l'effet de la stimulation à induire la potentialisation [251].

Dans la plupart des études, les effets de la SEM dans le cadre des LMTs ont été explorés dans la phase aiguë de la lésion, en commençant les séances de stimulation directement dès la survenue de celle-ci. En revanche, Leydeker et al. ont confirmé cet effet bénéfique de la stimulation, à 15 Hz, tant au niveau histologique que fonctionnel, dans la phase aiguë et également chronique, en commençant le protocole de stimulation trois semaines après la lésion [252, 253].

Enfin, l'ensemble de ces analyses bibliographiques révélant les effets neurotrophiques, neuroprotecteurs, anti-apoptotiques, neuromodulateurs et régénératifs de la SEM, nous a incité à investiguer plus profondément l'effet de la rTSMS sur les différentes réponses des cellules endogènes de la moelle spinale. Nous nous sommes notamment intéressés aux mécanismes qui lui sont associées et à leurs implications sur la récupération des fonctions neurologiques perdues dans le cadre des LMTs.

Objectifs de Thèse

L'ensemble de mes travaux de Thèse a été réalisé au sein du laboratoire de chirurgie expérimentale composante du Groupe de Recherche sur le Handicap Ventilatoire, GRHV, Equipe d'Accueil 3830, sous la direction du Dr. Nicolas Guérout et codirigé par le Pr. Jean-Paul Marie.

Ce travail de recherche a été conçu dans la suite des travaux menés par le laboratoire, ayant pour objectif, de trouver de nouvelles thérapies capables de restaurer les fonctions neurologiques perdues suite aux lésions du système nerveux périphérique et central.

Depuis quelques années, le laboratoire s'est intéressé principalement à la thérapie cellulaire, à ses atouts et ses effets bénéfiques dans différents modèles expérimentaux de la lésion médullaire. Bien que la thérapie cellulaire soit une approche thérapeutique prometteuse dans le cadre des LMTs, de nombreux obstacles sont à prendre en considération afin de pouvoir l'appliquer chez l'homme d'une manière efficace et reproductible tel que, principalement, son caractère invasif.

A la vue de ces contraintes cliniques, nous avons décidé d'explorer un traitement non invasif connu pour ses effets neuroprotecteurs et neurotrophiques dans le SNC ; la stimulation magnétique répétitive trans-spinale (rTSMS).

Etonnement, peu d'études ont exploré cette thérapie dans le cadre des LMTs, et rare sont celles qui l'ont utilisé d'une manière focale, c'est à dire directement au niveau du site de la lésion. A ce jour, les mécanismes et les voies sous-jacentes de ces effets dans ce cadre restent toujours inconnus. C'est pourquoi nous avons entrepris de caractériser ces effets dans le cadre de mes travaux de Thèse. En effet, en premier lieu, nous avons évalué les effets de la rTSMS sur la réparation tissulaire, via la modulation de la cicatrice médullaire et de ces différentes composantes *in vivo*, ainsi que sur la récupération fonctionnelle dans différents paradigmes (aiguë et chronique) et à différents âges (juvénile, adulte et vieux) chez des souris WT ayant subi une transection complète de la moelle spinale. En second lieu, l'objectif était de décrire les mécanismes à l'origine des effets de la rTSMS. Pour ce faire, des analyses protéomiques ont été réalisées, puis nous avons évalué l'effet de la rTSMS sur la réactivité des cellules souches endogènes de la moelle, ainsi que, la contribution de ces dernières dans la mise en place de la cicatrice gliale *in vitro* et *in vivo* via un modèle de souris transgénique hFoxJ1-CreER^{T2}::tdTomato.

L'objectif global était d'étudier, pour la première fois, l'effet de la rTSMS sur la réponse des différentes composantes cellulaires résidentes de la moelle spinale, les mécanismes à l'origine

de ces effets, ainsi que la capacité à restaurer les fonctions motrices perdues suite à la lésion médullaire. Ce travail de thèse a fait l'objet d'une publication « The Regenerative Effect of Trans-spinal Magnetic Stimulation After Spinal Cord Injury : Mechanisms and Pathways Underlying the Effect. » dans le journal *Neurotherapeutics* dans laquelle, je suis première auteure.

Article de thèse

The Regenerative Effect of Trans-spinal Magnetic Stimulation After Spinal Cord Injury : Mechanisms and Pathways Underlying the Effect

**C. Chalfouh, C. Guillou, J. Hardouin, Q. Delarue, X. Li, C. Duclos, D. Schapman, J.-P.
Marie, P. Cosette, N. Guérout**

Neurotherapeutics. 2020 Aug 27. doi : 10.1007/s13311-020-00915-5.



The Regenerative Effect of Trans-spinal Magnetic Stimulation After Spinal Cord Injury: Mechanisms and Pathways Underlying the Effect

C. Chalfouh^{1,2} · C. Guillou^{3,4} · J. Hardouin^{3,4} · Q. Delarue^{1,2} · X. Li⁵ · C. Duclos^{1,2} · D. Schapman^{4,6} · J.-P. Marie^{1,2} · P. Cosette^{3,4} · N. Guérout^{1,2}

© The Author(s) 2020

Abstract

Spinal cord injury (SCI) leads to a loss of sensitive and motor functions. Currently, there is no therapeutic intervention offering a complete recovery. Here, we report that repetitive trans-spinal magnetic stimulation (rTSMS) can be a noninvasive SCI treatment that enhances tissue repair and functional recovery. Several techniques including immunohistochemical, behavioral, cells cultures, and proteomics have been performed. Moreover, different lesion paradigms, such as acute and chronic phase following SCI in wild-type and transgenic animals at different ages (juvenile, adult, and aged), have been used. We demonstrate that rTSMS modulates the lesion scar by decreasing fibrosis and inflammation and increases proliferation of spinal cord stem cells. Our results demonstrate also that rTSMS decreases demyelination, which contributes to axonal regrowth, neuronal survival, and locomotor recovery after SCI. This research provides evidence that rTSMS induces therapeutic effects in a preclinical rodent model and suggests possible translation to clinical application in humans.

Keywords Rehabilitation · spinal cord injury · glial scar · magnetic stimulation and neuroregeneration

Abbreviations

BDA	biotinylated dextran amine
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
GFAP	glial fibrillary acidic protein
Iba1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
MBP	myelin basic protein

PDGFR β	platelet-derived growth factor β
rMS	repetitive magnetic stimulation
rTSMS	repetitive trans-spinal magnetic stimulation
SCI	spinal cord injury
WT	wild type

✉ C. Chalfouh
chalfouhchaima@gmail.com

✉ N. Guérout
nicolas.guerout@univ-rouen.fr

- ¹ Normandie Univ, UNIROUEN, EA3830 GRHV, 76000 Rouen, France
- ² Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000 Rouen, France
- ³ PISSARO Proteomic Facility, Normandie Univ, UNIROUEN, 76821 Mont-Saint-Aignan, France
- ⁴ Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Mont-Saint-Aignan, France
- ⁵ Department of Neurobiology, Care sciences and Society, BioClinicum, Karolinska Institutet, 17164 Stockholm, Sweden
- ⁶ Normandie Univ, UNIROUEN, SFR IRIB, Plateau PRIMACEN, F-76821 Mont-Saint-Aignan, France

Background

Spinal cord injury (SCI) is an incurable disease which leads to a permanent loss of motor, sensation, and sensory functions below the injury level [1]. To date, no cure can be offered to paraplegic or tetraplegic patients. Thus, for many decades, researchers have conducted a substantial number of studies in order to understand the mechanisms responsible for the lack of recovery following SCI. Thereby, it has been reported that SCI induces multiple cellular and molecular responses as inflammation, neuronal death, demyelination, and scar formation [2], which lead to limited axonal regrowth and recovery. However, the distinct role of each cellular population in the spinal cord has been recently investigated and described after SCI [3]. Specifically, the scar which occurs after SCI [4], mainly described as an inhibitory glial scar, is formed by not only astrocytes but also fibroblasts with cell type-specific

contributions [5]. Indeed, the astrocytic scar exerts mainly protective effects by restricting the spread of inflammation and secreting permissive molecules constituting a bridge for axonal regrowth [6]. On the contrary, the fibrotic scar exerts inhibitory effects on axonal regrowth and functional recovery [7]. More recently, by using optogenetic tools, it has been demonstrated that the inhibition of the fibrotic scar formation promotes axonal regrowth and functional recovery after SCI [8]. Furthermore, it has been shown that the administration of specific growth factors, such as, osteopontin, insulin-like growth factor 1, and ciliary-derived neurotrophic factor, can induce axonal regrowth across the lesion core [9]. In addition, the endogenous neural stem cells in the spinal cord can also contribute to the scar formation, and secrete neurotrophic factors to prevent neuronal death [10]. These quiescent adult neural stem cells in the spinal cord can be activated after SCI, and differentiate into mostly astrocytes and migrate to the injury site to form the core of astrocytic scar [10, 11]. Therefore, ependymal cells have been proposed as a therapeutic target for endogenous regeneration after SCI [11, 12]. These recent discoveries have led to new starting points for innovative therapies based on the modulation of the cellular populations in the lesion scar. However, as most of the studies use cellular transplantations or genetic modulations of lesion scar for axonal regeneration and functional recovery, their administration protocols are complex for clinical context due to their invasiveness, endogenous genetic manipulation, potential side effects, and/or pre-injury characteristics [6, 7, 13]. Therefore, a noninvasive treatment combining the modulation of endogenous cell types is of high interest for SCI therapy.

Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) has been already used clinically to treat neuropsychiatric diseases [14] and is considered a promising future treatment for stroke [15], Parkinson's [16], or Alzheimer's diseases [17], despite that the mechanisms behind is not fully understood. It has been hypothesized that magnetic fields exert neuroprotective [18, 19] and remodeling effects on the tissues [20]. Although new *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that rTMS induces changes of gene expression related to **apoptosis** and **neurite** outgrowth [21, 22], very few studies have explored the benefit of the rTMS following SCI. In particular, none has so far used a focal and noninvasive repetitive trans-spinal magnetic stimulation (rTSMS) paradigm as treatment after SCI, neither are the cellular and molecular mechanisms elucidated.

In this study, we propose that a noninvasive treatment, the focal rTSMS, has neuroprotective and neuroregenerative effects on the injured spinal cord. By using wild-type (WT) and transgenic animals at different ages, *in vivo* and *in vitro* methods, and proteomics, we evaluated the recovery effects of this therapy, and investigated the modulation of the scar, and the cellular and molecular mechanisms. Our study

suggests that rTSMS can modulate the scar formation and support neuronal survival as well as promote regeneration. Therefore, we propose it as a potential noninvasive SCI therapy, for patients at different ages.

Methods

Experimental Design

An overview of the paradigms used in this study is presented in Figs. 1A, 2A, 5A, 6A, 7A, and 8A.

Briefly, in Figs. 1, 2, 3, 4, and 5, SCIs were performed on mice (day 0), then half of the mice has been treated using rTSMS during 2 weeks (from day 1 to day 14).

In Figs. 1, 4, and 5, at day 15, mice were fixed and immunohistological analyses were performed. In addition, in Fig. 1 at day 90, two other groups of mice were fixed and immunohistological analyses were performed.

In Fig. 2, at day 15 and day 30, functional recoveries were analyzed using locomotor test.

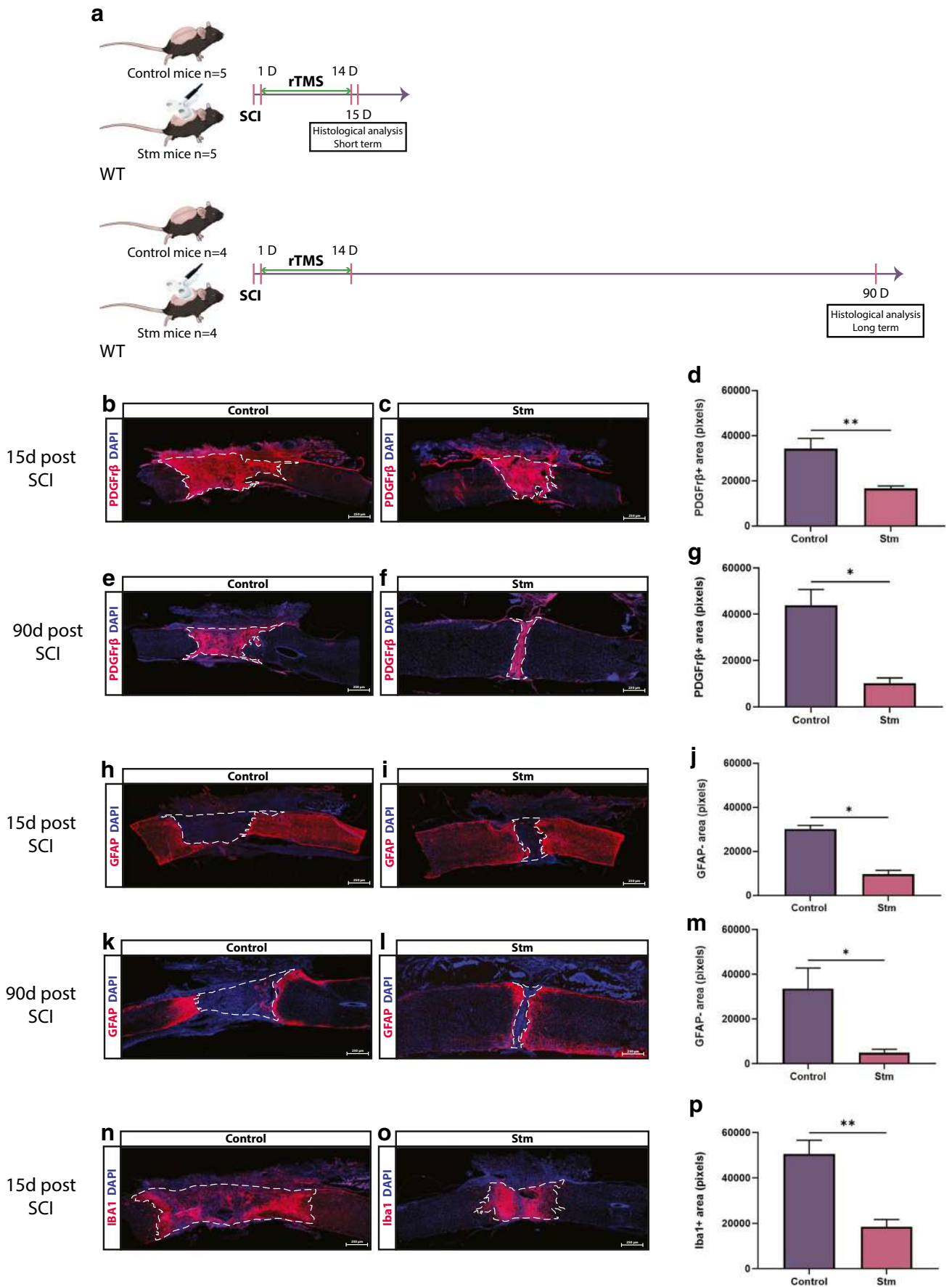
In Fig. 3, at day 15, mice were sacrificed, and proteomic analyses were performed.

In Figs. 6, 7, and 8, SCIs were performed on mice (day 0), then 11 days after, the same mice have been treated using rTSMS during 2 weeks (from day 11 to day 24). At day 25 and day 40, functional recoveries were analyzed using locomotor test. At day 90, mice were fixed and immunohistological analyses were performed.

Animal Care and Use Statement

The animal protocol was designed to minimize pain or discomfort to the animals. All experimental procedures were in accordance with the European Community guiding

Fig. 1 rTSMS-based treatment modulates spinal scar formation after SCI. **(A)** Experimental design, SCIs were performed on mice (day 0), then half of the mice has been treated using rTSMS during 2 weeks (from day 1 to day 14). At day 15 and day 90, mice were fixed and immunohistological analyses were performed. At day 15 (B–D, H–J, N–P) and day 90 (E–G, K–M), two groups of mice were fixed and immunohistological analyses were performed. (B, C, E, F, H, I, K, L, N, O) Representative pictures of sagittal spinal cord sections of (B, E, H, K, N) control (SCI) and (C, F, I, L, O) rTSMS treated animals 15 and 90 days after SCI. Sections were stained with (B, C, E, F) PDGFR β , (H, I, K, L) GFAP, (N, O) Iba1, and DAPI. (B–D, E–G) Fibrosis-positive area (PDGFR β +) and quantification of PDGFR β + area 15 and 90 days after SCI. (H–J, K–M) Astrocytic-negative area (GFAP $^-$) and quantification of GFAP $^-$ area 15 and 90 days after SCI. (N–P) Iba1-positive area (Iba1+) and quantification of Iba1+ area 15 days after SCI. Scale bars are 200 μ m. $N=5$ animals per group at 15 days and $N=4$ animals per group at 90 days. Quantifications are expressed as average \pm SEM. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$



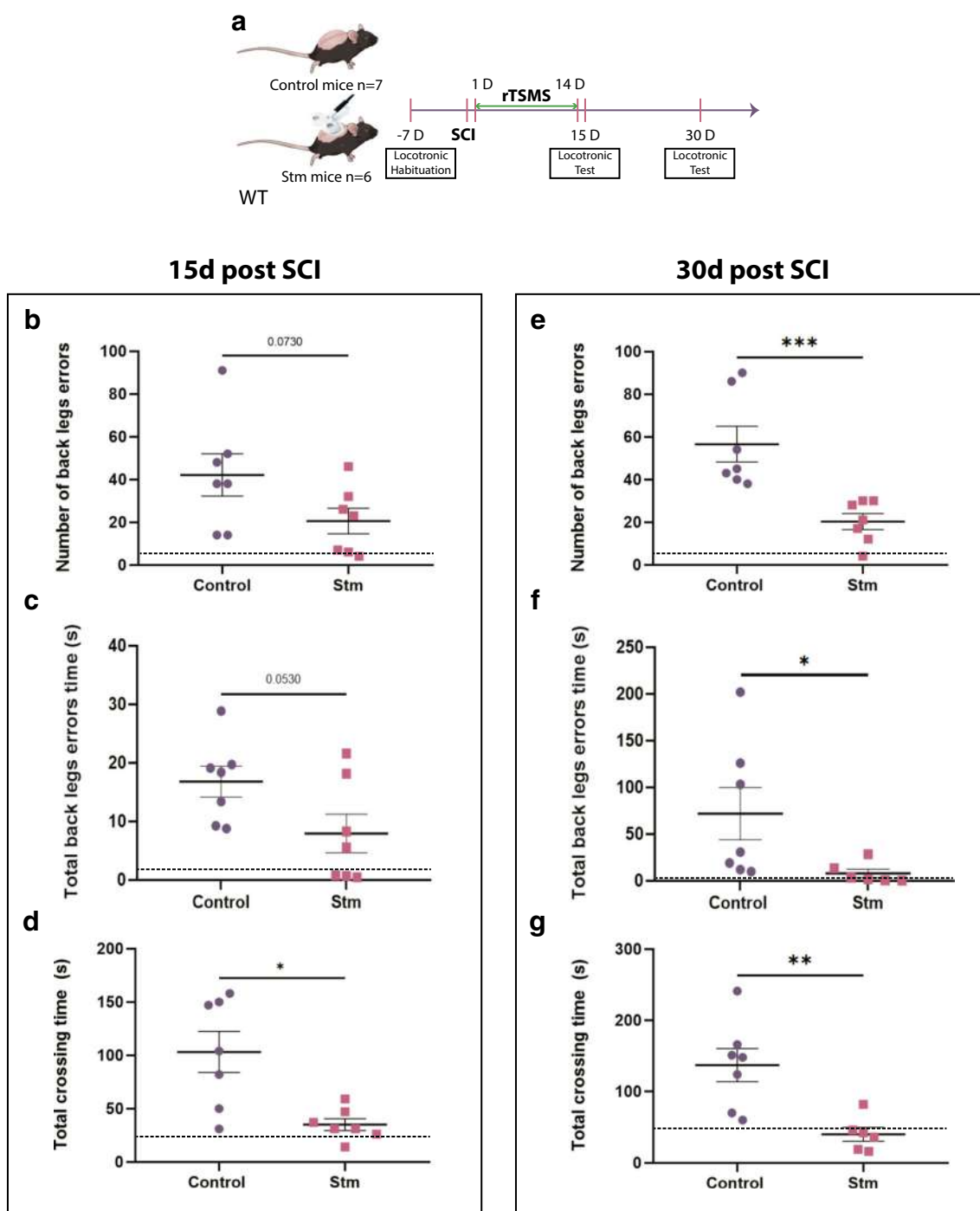


Fig. 2 rTSMs-based treatment enhances functional recovery. (A) Experimental design, SCIs were performed on mice (day 0), then half of the mice has been treated using rTSMs during 2 weeks (from day 1 to day 14). At day 15 and day 30, functional recovery was analyzed using locotronic test. (B–G) At days 15 and 30, functional recovery was analyzed for the two groups of mice using locotronic test. (B, E) Quantification of the number of back leg errors 15 and 30 days after

SCI. (C, F) Quantification of the total back leg error time 15 and 30 days after SCI. (D, G) Quantification of the total crossing time 15 and 30 days after SCI. $N = 6–7$ animals per group. Dashed lines correspond to the baseline parameters obtained during locotronic habituation (7 days before SCI). Quantifications are expressed as average \pm SEM. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$

principles on the care and use of animals (86/609/CEE; Official Journal of the European Communities no. L358; December 18, 1986), French Decree no. 97/748 of

October 19, 1987 (Journal Officiel de la République Française; October 20, 1987), and the recommendations of the Cenomexa ethics committee (#20458).

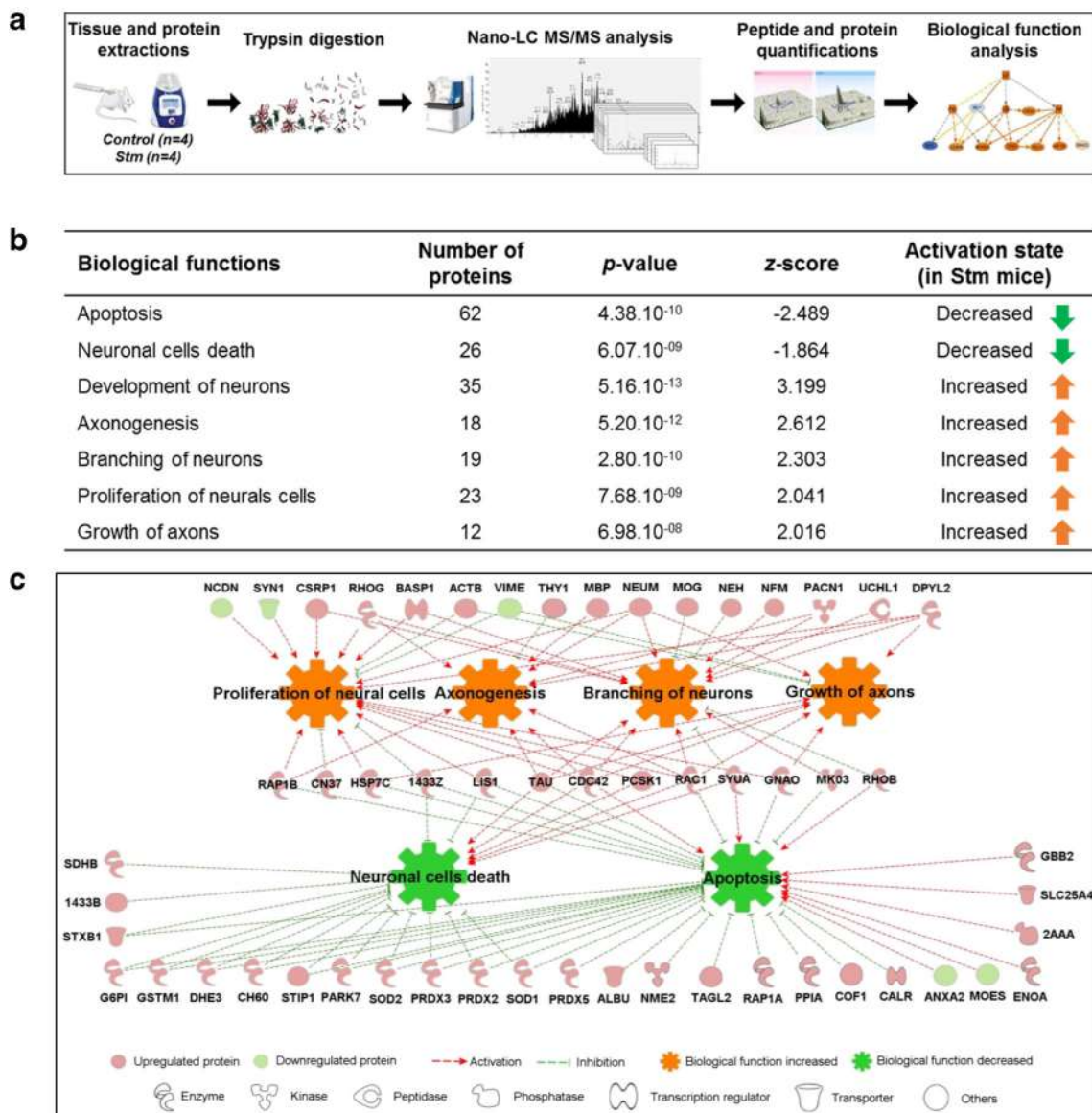


Fig. 3 rTSMS regulates functional protein synthesis and pathways. (A) Workflow for quantitative proteomics and data analyses of spinal cord tissue between stimulated (rTSMS treated) and control (SCI) mice. (B) Modulation of biological functions involved in neural development and cell death from differentially regulated proteins in stimulated mice compared to controls. Analysis was performed using Ingenuity Pathway

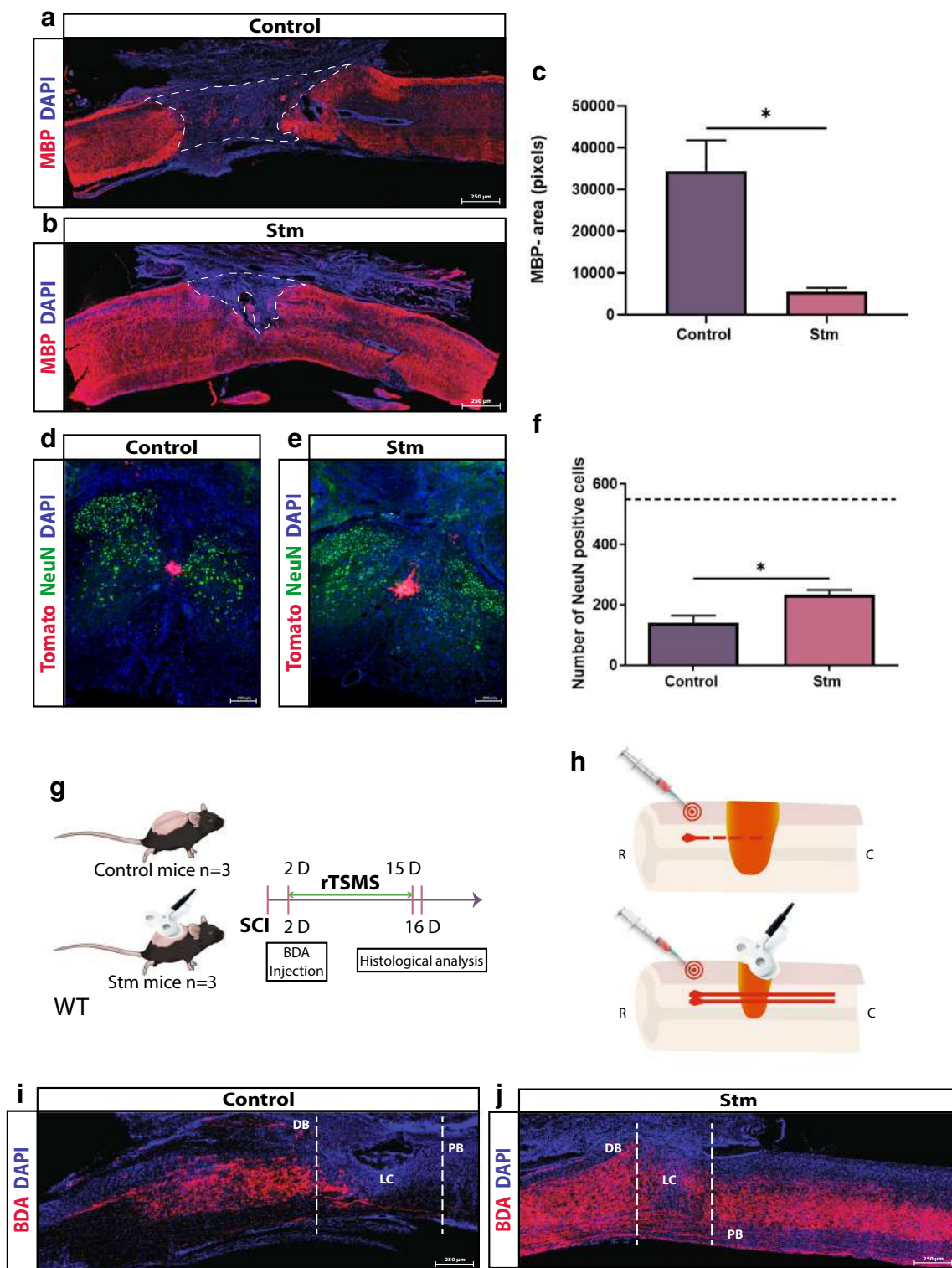
Analysis (IPA, Qiagen). Statistical significance is proposed through the calculation of *p* values and *z*-scores. (C) Functional regulatory effects of upregulated (red) or downregulated (green) proteins belonging to the different pathways associated to neural development and cell death (red arrows: activation; green arrows: inhibition; orange nut: gain of biological function; green nut: decrease of biological function)

Mice of either sex were group housed (two–five mice/cage, genders separated) in secure conventional rodent facilities on a 12-h light/dark cycle with constant access to food and water.

A total of 118 mice were included in this study (Supplement Table I). We used two mouse lines in this study (100 WT C57BL/6 mice and 18 hFoxJ1-CreER^{T2} mice), including randomized grouped male and female: (1) C57BL/6 WT mice and (2) tamoxifen-inducible hFoxJ1-CreER^{T2} transgenic mice with a C57BL/6 genetic background crossed with *Rosa26-tdTomato reporter* mice. For tamoxifen-inducible mouse line, recombination was induced by five daily intraperitoneal injections of 2 mg

tamoxifen (Sigma-Aldrich, 20 mg/ml in corn oil, Missouri, MO). Clearance of tamoxifen was allowed for 1 week before the start of the SCI experiments.

Experiments reported in Figs. 1, 2, 3, 4, 5, and 6 were performed on adult mice at 8–12 weeks of age (average weight 20 g for females and 25 g for males); experiments reported in Figs. 7 and 8 were performed on both: juvenile C57BL/6 mice on post-natal day (P)30 (average weight 15 g for females and 17 g for males) (Fig. 7) to correlate with teenagers and aged C57BL/6 mice at 18 months (average weight 41 g for females and 46 g for males) (Fig. 8) of age to correlate with elderly.



Surgical Procedure and Postoperative Care

To facilitate surgical procedure, stereotaxic frame was used. Mice were kept under anesthesia with 2% of isoflurane (Iso-Vet, Osalia, Paris, France) and the animal's body temperature has been kept steady at 37 °C with a heating pad during the

entire surgical intervention. After being shaved and disinfected with 70% EtOH, the dorsal skin of the mice was incised, the superficial fat gently shifted, and the muscle tissue dissected to expose laminae T9–T11. The posterior part of vertebrae was countersunk in order to create an ample space for lesion. After laminectomy, the dura mater was removed. A

◀ **Fig. 4** rTSMS inhibits demyelination and enhances neuronal survival and axonal regrowth. (A, B) Representative pictures of sagittal spinal cord sections of (A) control (SCI) and (B) Stm (rTSMS treated) animals 15 days after SCI. Sections were stained with MBP and DAPI. (C) Quantification of MBP-negative area (MBP⁻) 15 days after SCI. Scale bars are 200 μ m. $N=5-6$ animals per group. (D, E) Representative pictures of axial spinal cord sections of (D) control and (E) Stm animals 15 days after SCI. Sections were stained with NeuN and DAPI. (F) Quantification of NeuN⁺ cells 15 days after SCI. Scale bars are 200 μ m. Dashed line corresponds to the number of NeuN⁺ cells from non-injured spinal cord. $N=4$ animals per group. (G, H) Design of the BDA-labeled axons experiments. SCIs were performed on mice (day 0), 2 days after mice have been injected with BDA. Then, half of the mice has been treated using rTSMS during 2 weeks (from day 2 to day 15). At day 16, mice were fixed and immunohistological analyses were performed on control and Stm mice. (I, J) Representative pictures of sagittal spinal cord sections of (I) control and (J) Stm mice 16 days after SCI. Sections were stained with BDA and DAPI. Dashed lines demarcate proximal (PB) and distal (DB) borders around lesion core (LC). Images are representative of $n=3$ animals per group. Scale bars are 200 μ m. Quantifications are expressed as average \pm SEM. $*=p < 0.05$

complete spinal cord transection was performed with 25-gauge needle for WT mice. For the transgenic mice (hFoxJ1-CreER^{T2}), dorsal funiculus transection [12] was performed in order to let the central canal uninjured. After surgery, the animals received an intramuscular injection of nalbuphine hydrochloride (10 mg/mL, Mylan, Canonsburg, PA) and were placed back in their home cages. The mice were checked daily for general health, mobility within the cage, wounds, swelling, or infections.

rTSMS Treatment

rTSMS was delivered with a commercially available figure of eight double coil featuring an air cooling system connected to a Magstim rapid² stimulator used for focal cortical and peripheral stimulations (Magstim, Whitland, UK). The coil was positioned in close contact with the back of the animal at the site of injury. The size of the area stimulated has been defined according to the manufacturer's device manual. The area stimulated was 1.5 cm². The position of the coil was maintained using an articulated arm stand. The exact position of the coil was defined using the mark located in the middle of the coil.

rTSMS treatment was applied at a frequency of 10 Hz, 10 min per day during 14 days. Stimulation protocol consisted of 10-s stimulation followed by 20 s of rest. Mice were kept under anesthesia with 2% of isoflurane during stimulation; the equivalent anesthesia were used for untreated animals. Peak magnetic intensity at the experimental distance was 0.4 T.

Tissue Preparation and Sectioning

The animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (150 mg/kg body weight) and perfused transcardially with PBS followed by ice-cold 4% formaldehyde in PBS.

Dissected spinal cords were further post-fixed in 4% PFA in PBS at 4 °C overnight and cryoprotected in 30% sucrose (Life Technologies, Carlsbad, CA) for at least 48 h. After embedding in Tissue-Tek OCT compound (Sakura, Tokyo, Japan), the spinal cords were cut sagittally or axially to 20- μ m thickness. Sections were collected accordingly to stereological principles (five sections per slide for sagittal sections and 10 sections per slide for axial sections) and stored at -20 °C until further use.

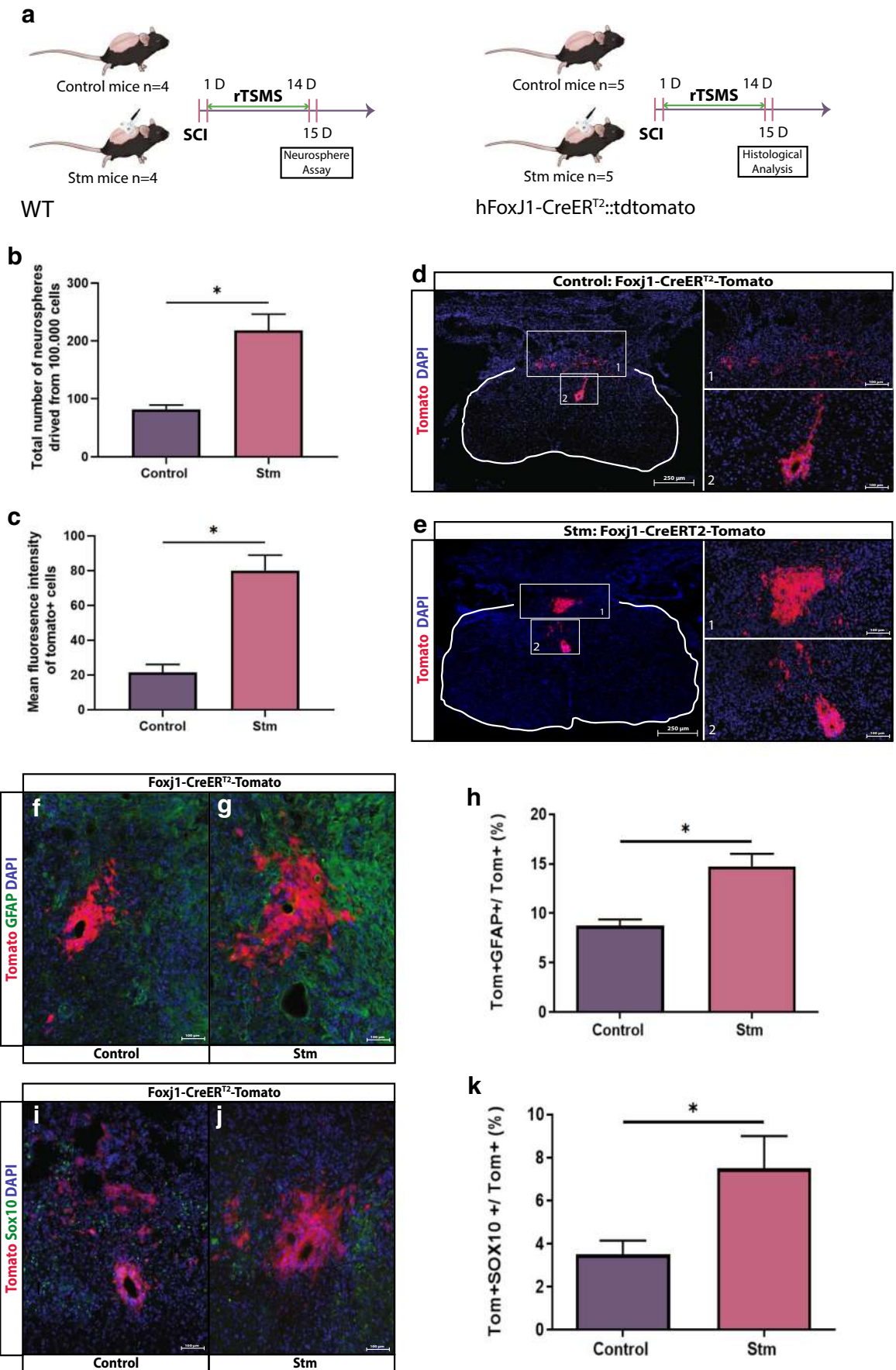
Immunohistochemistry

Spinal cord sections were blocked with 10% Normal Donkey serum (Jackson ImmunoResearch, Cambridge, UK), 0.3% Triton-X100 (Sigma-Aldrich) in PBS, then incubated overnight at room temperature in a humidified chamber with primary antibodies diluted in blocking solution. The following primary antibodies were used: Rabbit anti-Platelet-derived growth factor β (PDGFR β , Abcam, ab32570), Mouse anti-Glial fibrillary acidic protein (GFAP Cy3-conjugated Sigma-Aldrich, C9205 and GFAP unconjugated Sigma-Aldrich, G3893), Rabbit anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1, Wako, 019-19741, Osaka, Japan), Rat anti-Myelin basic protein (MBP, Millipore, MAB386), Mouse anti-NeuN (NeuN, Millipore, MAB377), and Goat anti-Sox10 (Sox10, R&D Systems, AF2864).

After washing, antibody staining was revealed using species-specific fluorescence-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch). Biotinylated dextran amine (BDA, Thermo Fisher Scientific, D1956, Waltham, MA) tract-tracing was visualized with Cy3-conjugated streptavidin antibody (Jackson ImmunoResearch). Sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI; 1 μ g/mL; Sigma-Aldrich) and coverslipped with Vectashield mounting media (Vector Labs, Burlingame, UK).

Image Acquisition Analysis

The representative images of quantification for immunohistochemically stained areas for sagittal sections were taken using the Zeiss Apotome2 microscope setup. Confocal images of the axial sections were performed using the Zeiss upright fixed-stage Leica TCS SP8 CFS confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with diode laser (Coherent) at 405 nm (15%) to excite DAPI and at 552 nm (1%) to excite Tomato-Cy3, a conventional scanner at 400 Hz and a motorized stage to realize tile scan imaging. Using a 40 \times (1.30, oil immersion) fluorescence, emission was sequentially detected through a hybrid detector (Leica Microsystems) in photon counting mode with a specific band from 425 to 475 nm for DAPI and 560 to 610 nm



◀ **Fig. 5** rTSMS increases proliferation and modulates differentiation of spinal cord stem cells. (A) Experimental design, SCIs were performed on mice (day 0), then half of the mice has been treated using rTSMS during 2 weeks (from day 1 to day 14). At day 15, mice were fixed and neurosphere assays (B) or immunohistological analyses (C–K) were performed. (B) Quantification of the total number of neurospheres derived from 100,000 cells from control (SCI) and Stm (rTSMS treated) mice 15 days after injury. $N = 4$ animals per group. (C) Quantification of mean fluorescence intensity of tomato+ cells 15 days after SCI. (D, E, F, G, I, J) Representative pictures of axial spinal cord sections of (D, F, I) control and (E, G, J) Stm animals 15 days after SCI. Sections were stained with tomato and DAPI (D, E). Scale bars are 250 μm . (F–K) Identification of cells derived from Tomato+ recombined ependymal cells were identified by GFAP (F, G) and Sox10 (I, J). (H, K) Quantification of double positive recombined cells in the spinal cord 15 days after SCI. Scale bars are 100 μm . $N = 5$ animals per group. Quantifications are expressed as average \pm SEM. * = $p < 0.05$

for Tomato-Cy3. The image processing and assembly was acquired with Image J software.

Quantification of Immunohistochemically Stained Areas

The areas of the sagittal sections were measured at the epicenter of the lesion and section rostral and caudal to the injury site; thus, a minimum of 3 sections (60 μm) per animal have been measured.

Locotronic Test: Foot Misplacement Apparatus

Experiments have been performed as described previously by [23] (Intellibio, Nancy, France). The equipment consists of a flat ladder on which the animal can move from the starting zone towards the arrival zone. On both sides of the ladder, infrared sensors allow the visualization and recording of the displacement of the animal. The location and precise length of time of all the errors are recorded, in distinguishing the errors from front legs, back legs, and tail. Based on all data recorded, number of back leg errors, total back leg error time, and total crossing time were provided by the software and compared between groups of animals.

All the mice were pre-trained on the ladder, twice, 1 week prior to injury and then assessed on the day before the surgery in acute context to provide baseline data. For chronic context paradigm experiments (Figs. 6, 7, and 8), animals were assessed also the day before the beginning of the rTSMS treatment (10 days after SCI) to correct for any spontaneous recovery (Supplement Fig 1).

Proteomic Analyses

The experimental design for proteomics analyses was the same as that for immunohistological experiments. SCIs were performed on mice (day 0), then half of the mice has been treated using rTSMS during 2 weeks (from day 1 to day 14).

At day 15, mice were perfused with cold PBS to remove the blood, then spinal cords (1 cm) were dissected on ice and directly frozen in tube at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Protein Extraction

Seven hundred microliters of solubilization buffer (urea 7 M, Sigma-Aldrich, thiourea 2 M, Sigma-Aldrich, DTT 20 mM, Sigma-Aldrich, CHAPS 2%, Sigma-Aldrich, C7BzO 0.5%, Sigma-Aldrich, Tributylphosphin 5 μL , FlukaChemika, Zurich, Switzerland) was added to each sample in Lysing Matrix D (Biorad, Hercules, CA). Samples were homogenized in the FastPrep® machine for 40 s at a speed of 6 m/s, after which they were centrifuged at 10000g for 8 min. This operation was repeated 3 times to grind the entire tissue. Supernatants were transferred to a clean 1.5-mL microcentrifuge tube and conserved at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Protein Concentration

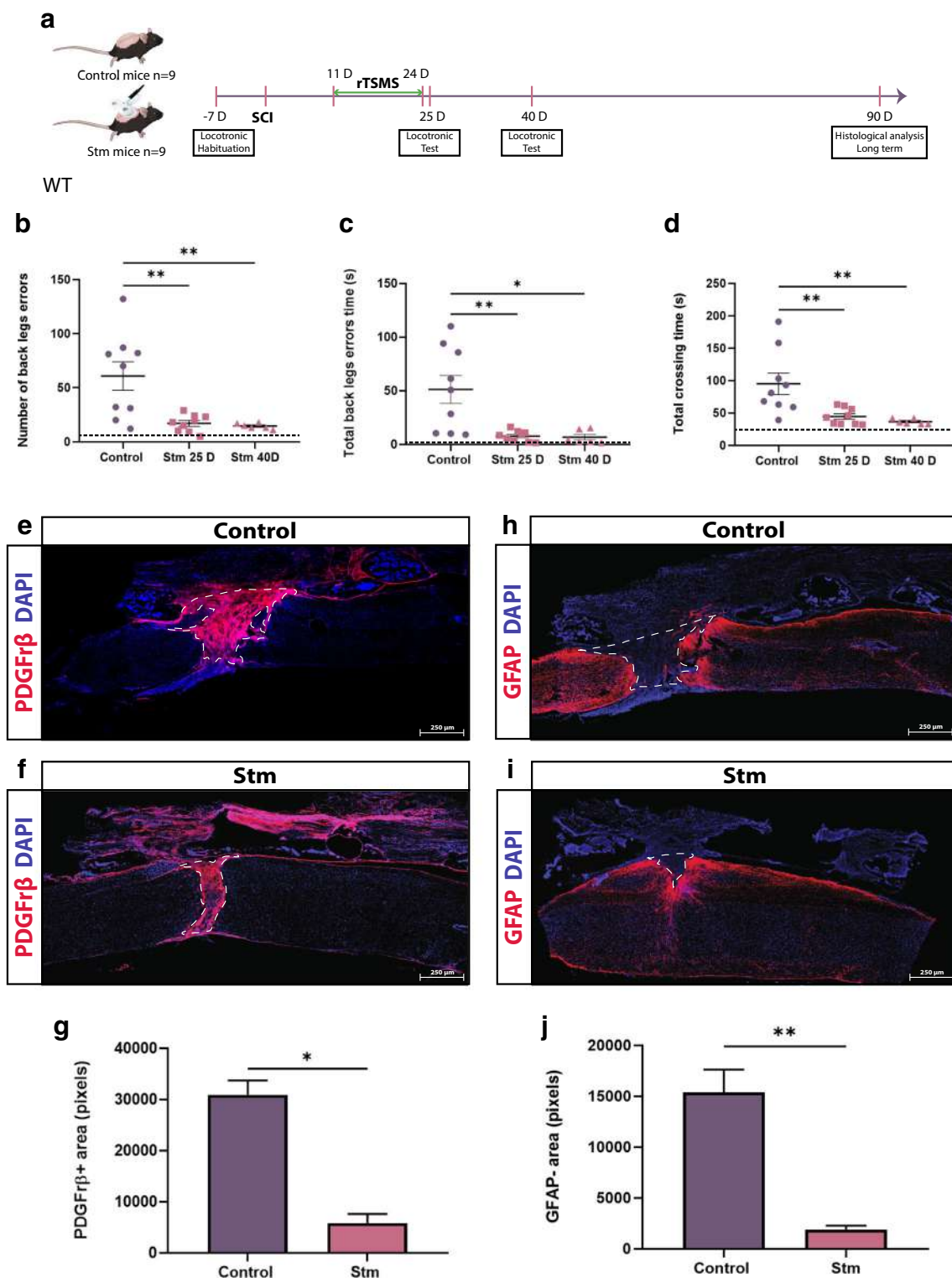
To estimate the injury site protein concentration for each extract, Bradford was performed according to the manufacturer's instructions (Biorad). The linear range for BSA standard was 0.1 to 1 mg/mL. The dilution of all samples was 1:20. Solubilization buffer was used as a negative control. Absorbance at 595 nm was measured with the Perkin Elmer Wallac 1420 Victor3™.

Enzymatic Digestion of Protein Extracts

For each extract, 25 μg of proteins was loaded into a 7% polyacrylamide gel (Acrylamide/Bis-Acrylamide 30% [29:1], Sigma-Aldrich) and a migration was performed for a short period (90 min at 10–20 mA/gel). After Coomassie blue staining, the revealed protein bands were excised and immersed for the first time in a reductive buffer (5 mM DTT, Sigma-Aldrich), and in a second time, in an alkylated buffer (20 mM iodoacetamide, Sigma-Aldrich). After washing steps, gel bands were submitted to protein digestion by 1 μg of trypsin (Promega, Madison, WI). After overnight incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$, several steps of peptide extraction were performed using acetonitrile (Fisher, Hampton, NH). Then, the peptide fractions were combined and dried.

NanoLC-MS/MS Analyses

All experiments were performed on an LTQ-Orbitrap Elite apparatus coupled to an Easy nLC II system (both from Thermo Scientific). Samples were injected onto an enrichment column (Acclaim PepMap100, Thermo Scientific). The separation was achieved with an analytical column needle (NTCC-360/100-5-153, Nikkyo Technos, Tokyo, Japan). The mobile phase consisted of $\text{H}_2\text{O}/\text{FA}$ 0.1% (buffer A) and $\text{CH}_3\text{CN}/\text{FA}$



0.1% (buffer B). Tryptic peptides were eluted at a flow rate of 300 nL/min using a three-step linear gradient: from 2 to 40% B over 75 min, from 40 to 80% B in 4 min, and at 80% B for 11 min. The mass spectrometer was operated in positive ionization mode with capillary voltage and source temperature set

at 1.5 kV and 275 °C, respectively. The samples were analyzed using CID (collision-induced dissociation) method. The first scan (MS spectra) was recorded in the Orbitrap analyzer ($R = 60,000$) with the mass range m/z 400–1800. Then, the 20 most intense ions were selected for MS2 experiments. Singly

Fig. 6 rTSMs-based treatment enhances functional recovery in a chronic condition. (A) Experimental design, SCIs were performed on mice (day 0), then 11 days after the same mice have been treated using rTSMs during 2 weeks (from day 11 to day 24). At days 25 and 40, functional recovery was analyzed using locomotor test. At day 90, mice were fixed and immunohistological analyses were performed. (B) Quantification of the number of back leg errors 25 days and 40 days after SCI. (C) Quantification of the total back leg error time 25 days and 40 days after SCI. (D) Quantification of the total crossing time 25 and 40 after SCI. $N=9$ animals at 25 days and $N=6$ animals at 40 days. Dashed lines correspond to the baseline parameters obtained during locomotor habituation (7 days before SCI). (E–J) At day 90, mice were fixed and immunohistological analyses were performed and Stm (rTSMs treated) animals were compared to control (SCI) mice. (E, F, H, I) Representative pictures of sagittal spinal cord sections of (E, H) control and (F and I) Stm mice 90 days after SCI. Sections were stained with (E, F) PDGFR β and (H, I) GFAP and DAPI. (E–G) Fibrosis-positive area (PDGFR β +) and quantification of PDGFR β + area 90 days after SCI. (H–J) Astrocytic-negative area (GFAP-) and quantification of GFAP- area 90 days after SCI. Scale bars are 200 μ m. $N=4$ animals per group. Quantifications are expressed as average \pm SEM. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$

charged species were excluded for MS2 experiments. Dynamic exclusion of already fragmented precursor ions was applied for 30 s, with a repeat count of two, a repeat duration of 30 s, and an exclusion mass width of ± 5 ppm. The precursor isolation width was 2 m/z . Fragmentation occurred in the linear ion trap analyzer with normalized collision energy of 35. All measurements in the Orbitrap analyzer were performed with on-the-fly internal recalibration (lock mass) at m/z 445.12002 (polydimethylcyclsiloxane).

Database Searches

Raw data files were processed using Proteome Discoverer 1.4 software (Thermo Scientific). Peak lists were searched using the Mascot search software (Matrix Science, version 2.2.04) against the database Uniprot with the taxonomy *Mus musculus*. Database searches were performed with the following parameters: two missed trypsin cleavage sites allowed; variable modifications: carbamidomethylation on cysteine, and oxidation on methionine. The parent-ion and daughter-ion tolerances were 10 ppm and 0.5 Da, respectively. False discovery rate (FDR) threshold for identifications was specified at 1% (for proteins and peptides).

Quantification

For protein quantification, a label-free experiment was performed as previously described by Kentache et al. [24]. Briefly, after MS analysis, raw data were imported in Progenesis LC-MS software (Nonlinear Dynamics, version 4.0.4441.29989, Newcastle, UK). For comparison, one sample was set as a reference and the retention times of all other samples within the experiment were

aligned. After alignment and normalization, statistical analysis was performed for one-way ANOVA calculations. For quantitation, peptide features presenting a p value and a q -value less than 0.05, and a power greater than 0.8, were retained. MS/MS spectra from selected peptides were exported for peptide identification with Mascot (Matrix Science, version 2.2.04). Database searches were performed with the following parameters: 1 missed trypsin cleavage site allowed; variable modifications: carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine. Mass tolerances for precursor and fragment ions were set at 5 ppm and 0.35 Da, respectively. False discovery rates were calculated using a decoy-fusion approach in Mascot (version 2.2.04). Identified peptide-spectrum matches with $-10\log P$ value of 13 or higher were kept, at a FDR threshold of 5%. Mascot search results were imported into Progenesis. For each growth condition, the total cumulative abundance of the protein was calculated by summing the abundances of peptides. Proteins identified with less than 2 peptides were discarded.

BDA Tract-Tracing

Tract-tracing of propriospinal neurons was performed by injection of BDA, 10% wt/vol in sterile saline injected 1 μ l, 4-mm rostral to the injury site, 2 days after SCI (Fig. 4H) as described by [9].

Neural Stem Cells Cultures

Animals were sacrificed 15 days after SCI. Spinal cord cells were dissociated and neurosphere cultures were established as described [25, 26]. All cells isolated from one spinal cord were plated in 75-cm² culture dishes. First, neurospheres were harvested after 2 weeks in culture and then were dissociated into single cells for passage. Approximately 100,000 cells per animal were plated in a 25-cm² culture dish for the next generation of neurospheres, and all the new neurospheres (second, third, and fourth generations) were harvested after 1 week in culture.

Quantification of Ependymal Cell Reactivity and Contribution to the Glial Scar

To quantify ependymal cell reactivity and contribution to the glial scar, the central canal and the dorsal part of the spinal cord have been defined. To do so, we used a characterized transgenic mouse line hFoxJ1-CreERT::tdTomato that expresses tdTomato in ependymal and ependymal-derived cell bodies allowing the quantification of mean fluorescence intensity of tomato+ cells between the control and Stm

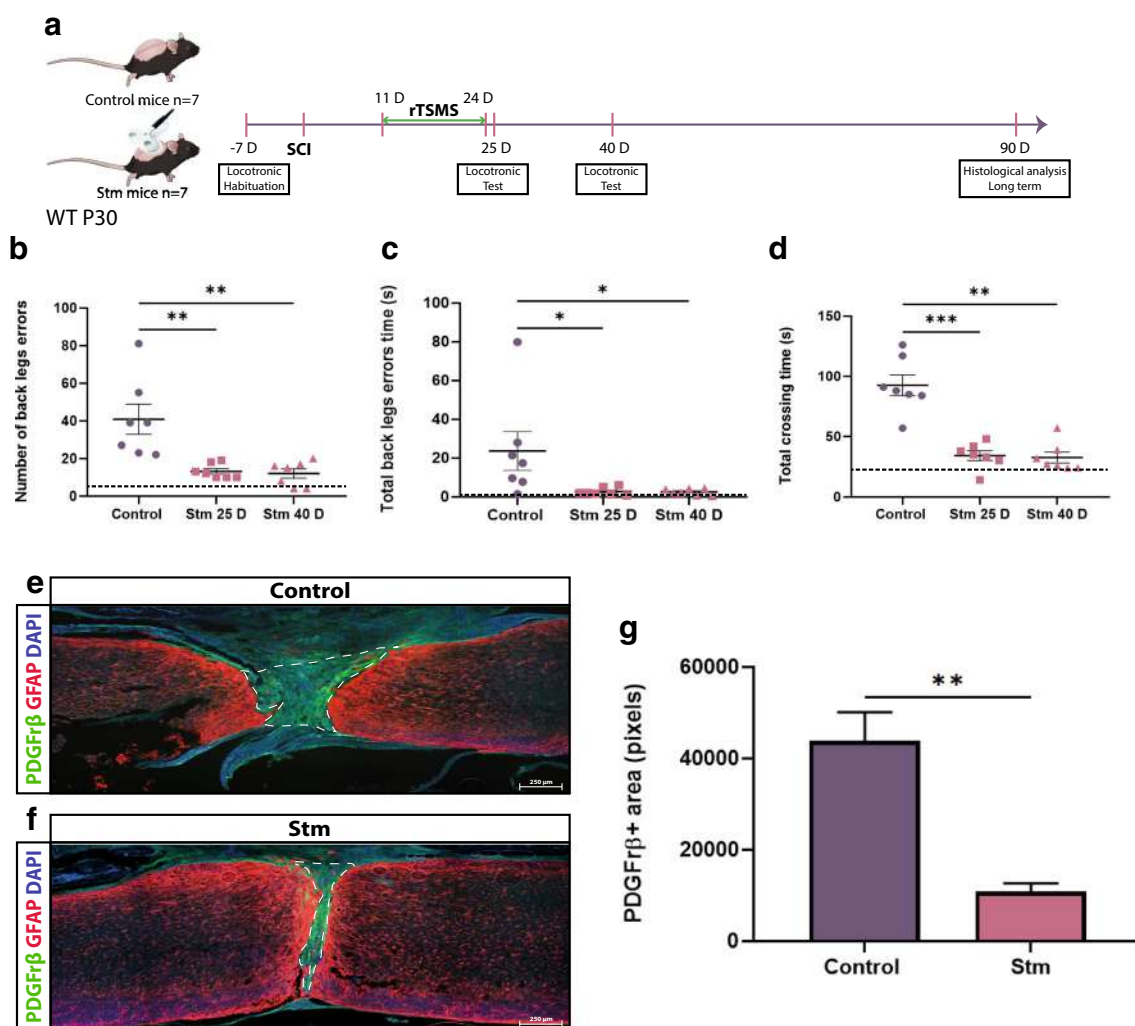


Fig. 7 rTSMs-based treatment enhances functional recovery and modulates scar formation in a chronic condition in juvenile mice. (A) Experimental design, SCIs were performed on mice (day 0), then 11 days after the same mice have been treated using rTSMs during 2 weeks (from day 11 to day 24). At day 25 and 40, functional recovery was analyzed using locotronic test. At day 90, mice were fixed and immunohistological analyses were performed. (B) Quantification of the number of back leg errors 25 days and 40 days after SCI. (C) Quantification of the total back leg error time 25 days and 40 days after SCI. (D) Quantification of the total crossing time 25 days and 40 days after SCI. $N = 7$ animals. Dashed

lines correspond to the baseline parameters obtained during locotronic habituation (7 days before SCI). (E–G) At day 90, juvenile mice were fixed and immunohistologic analyses were performed and Stm (rTSMs treated) animals were compared to control (SCI) mice. (E, F) Representative pictures of sagittal spinal cord sections of (E) control and (F) Stm juvenile mice 90 days after SCI. Sections were stained with PDGFR β , GFAP, and DAPI. (E–G) Fibrosis-positive area (PDGFR β +) and quantification of PDGFR β +/area 90 days after SCI. Scale bars are 200 μ m. $N = 5$ animals per group. Quantifications are expressed as average \pm SEM. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$

groups. A tile software was used to create images of axial sections at the epicenter of the lesion, then measurements of immunoreactivity in the defined areas were quantified using Image J software.

Statistical Analysis

All data are presented as means \pm standard error of the mean (SEM). Comparison of means were performed using two-tailed Mann-Whitney test for all the experiments except for proteomic analysis where one-way ANOVA test has been used. In all tests, $p < 0.05$ were considered statically

significant. Supplement Table II lists all tests performed, the comparison made, and the associated p values.

Results

rTSMs-Based Treatment Modulates Spinal Scar Formation After SCI

To investigate whether rTSMs can promote scar formation in both acute and chronic phases following SCI, we performed spinal cord transection in adult mice [27]. One day after SCI,

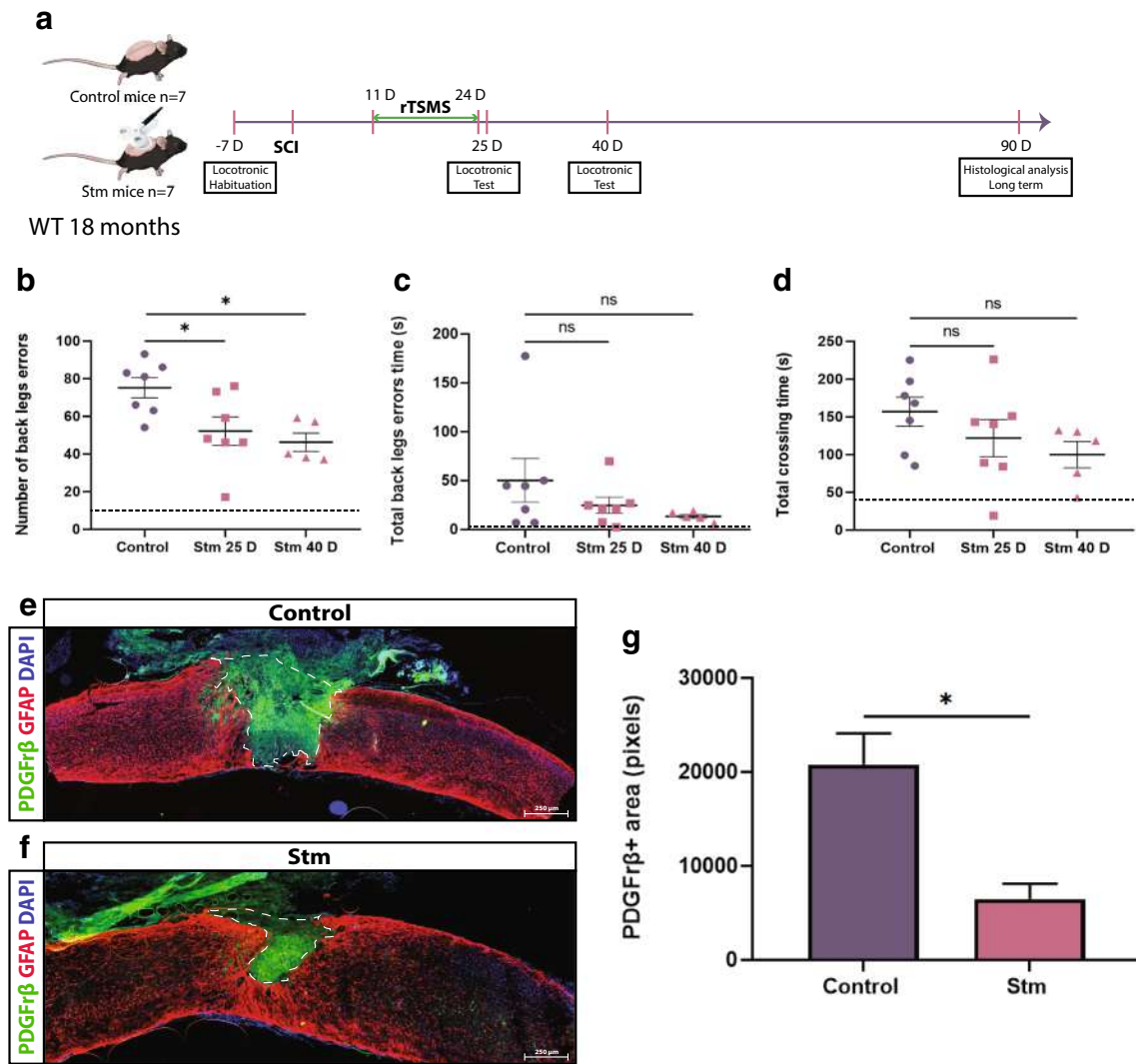


Fig. 8 rTSMs-based treatment enhances functional recovery and modulates scar formation in a chronic condition in aged mice. (A) Experimental design, SCIs were performed on mice (day 0), then 11 days after the same mice have been treated using rTSMs during 2 weeks (from day 11 to day 24). At days 25 and 40, functional recovery was analyzed using locotronic test. At day 90, mice were fixed and immunohistological analyses were performed. (B) Quantification of the number of back leg errors 25 days and 40 days after SCI. (C) Quantification of the total back leg error time 25 days and 40 days after SCI. (D) Quantification of the total crossing time 25 and 40 after SCI. $N = 7$ animals at 25 days and $N = 5$ animals at 40 days. Dashed lines correspond to the baseline parameters

obtained during locotronic habituation (7 days before SCI). (E–G) At day 90, aged mice were fixed and immunohistological analyses were performed and Stm (rTSMs treated) animals were compared to control (SCI) mice. (E, F) Representative pictures of sagittal spinal cord sections of (E) control and (F) Stm aged mice 90 days after SCI. Sections were stained with PDGFRβ, GFAP, and DAPI. (E–G) Fibrosis-positive area (PDGFRβ+) and quantification of PDGFRβ+ area 90 days after SCI. Scale bars are 200 μm. $N = 4$ animals per group. Quantifications are expressed as average ± SEM. ns = not significant * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$

mice were treated by rTSMs for 14 consecutive days, and were sacrificed on day 15 or 90 for analysis (Fig. 1A). As the lesion site can be subdivided into a lesion core infiltrated by mostly stromal-derived pericytes and the boarder where reactive astrocytes accumulate, we performed immunohistochemistry for these areas by PDGFRβ and GFAP markers respectively. Our data revealed that the PDGFRβ+ area is significantly reduced by 2 and 4 times in the rTSMs treatment group compared to control, 15 days, and 90 days after SCI respectively (Fig. 1B–D, E–G respectively). Similarly,

we compared the core of glial scar by GFAP-negative area and showed substantial reduction in the rTSMs animals in both short- and long-term conditions (Fig. 1H–J, K–M respectively). Additional comparisons have been performed in order to investigate the evaluation of the scar overtime. It appears that there is no significant difference between 15 and 90 days after SCI for PDGFRβ+ areas (Supplement Fig IIA) or GFAP-negative areas (Supplement Fig IIB) in both groups of animals (control and Stm groups) (Supplement Fig II).

In addition, we investigated Iba1 expression; Iba1 is a microglial and macrophage-specific marker involved with the membrane ruffling and phagocytosis in activated microglia. Our results showed that Iba1+ area in the rTSMS group is also significantly decreased by nearly 3 times (Fig. 1N–P), indicating that rTSMS treatment modulates spinal scar by reducing fibrosis and inflammation and by increasing astrocytic scar formation (GFAP+, quantified by GFAP-negative area). Moreover, rTSMS beneficial effects on scar formation are sustained even several months after the end of the treatment.

rTSMS-Based Treatment Enhances Functional Recovery

To further investigate whether rTSMS treatment can promote functional recovery, we conducted sensorimotor tests using a foot misplacement apparatus (Fig. 2A) [23]. We showed that the numbers of back leg errors and total back leg error time have already exhibited reduction trends (Fig. 2B, C) and the total crossing time was significantly reduced since 15 days after SCI in the rTSMS group (Fig. 2D) (see Movie SI and Movie SII). Moreover, all these sensorimotor parameters were significantly improved 30 days after SCI in the rTSMS group (Fig. 2E–G).

rTSMS Regulates Functional Protein Synthesis and Pathways

We described above that 14 days of rTSMS treatment favor tissue repair and functional recovery after SCI in mice. To gain insight on molecular basis of recovery, a proteomic analysis was designed to highlight the regulation of biological functions occurring under this stimulation. Accordingly, spinal cord tissues (1 cm) from stimulated and control mice were collected ($n = 4$ for both groups). After protein extraction, trypsin proteolysis was performed. Then, the resulting complex peptide mixtures were analyzed by nanoLC-MS/MS. Finally, from MS data, bioinformatics tools were used to quantify protein amounts, and then to analyze the pathways involved (Fig. 3A).

Differential proteomic analysis first revealed that the intragroup peptide ion intensities (nearly 50,000 distinct quantitative data) were associated with a good reproducibility (averaged regression coefficient of 0.91 for both groups). After quantitative analysis and identification, 156 proteins appeared differentially regulated between rTSMS-treated and control mice (Supplement Table III). Among them, 148 proteins were upregulated and 8 were downregulated in stimulated mice. As a whole, the abundance ratios were rather limited, although associated to statistical significance (Supplement Table III). All of these proteins were then integrated as inputs for functional analysis (IPA, Qiagen). It allowed to describe 37 biological functions increased in stimulated mice (z -score > 2)

and 7 decreased (z -score < -2). Among those, some were of particular interest in the context of this study, especially regarding both neural development and cell death (Fig. 3B). Thus, 62 and 26 proteins displaying a decreased abundance were involved in apoptosis and in neuronal cell death, respectively. Conversely, numerous functional pathways were promoted, namely development of neurons, branching and proliferation of neural cells, and axonogenesis. These functional regulatory effects are summarized in Fig. 3C, with a chart showing development of a complex protein network leading to neuronal survival after rTSMS treatment.

Although altogether all these single observations were highly convergent, we performed additional validation experiments by immunohistochemistry targeted on the above-described pathways.

rTSMS Inhibits Demyelination and Enhances Neuronal Survival and Axonal Regrowth

To further validate our proteomic data, we evaluated myelination, axon regeneration, and neuronal death in rTSMS and control mice 15 days after SCI (Fig. 1A). We first analyzed the demyelination after SCI by using MBP staining in WT mice. We found that non-myelinating area (MBP-negative area) is reduced by almost 4 times in rTSMS-treated group following SCI (Fig. 4A–C). We further investigated the effects of rTSMS treatment on neuronal survival using NeuN-positive cell quantification in hFoxJ1-CreERT::tdTomato mice. We quantified axial sections 40 μ m rostrally or caudally to the epicenter, and showed that average survived neurons significantly increased from 139/section (control) to 233/section (rTSMS) (Fig. 4D–F). To further study whether there is also better axonal regrowth or axon survival in rTSMS-treated group, we performed BDA tract-tracing experiments (Fig. 4G–H). After injecting BDA dye 2 days following SCI in both groups, we performed stimulations in the rTSMS group for 2 weeks and sacrificed all the mice on the 16th day for longitudinal sectioning and analysis (Fig. 4G–H). Our data showed that there is a substantial infiltration of BDA+ axons into the lesion site, while very few signals are shown in the control group, suggesting that rTSMS treatment induces axonal regrowth/axon survival into the lesion core (Fig. 4I, J). Altogether, these results show that rTSMS decreases demyelination and increases neuronal survival and axonal regrowth/axon survival.

rTSMS Increases Proliferation and Modulates Differentiation of Spinal Cord Stem Cells

As our proteomic data suggest that rTSMS promotes development of neurons and proliferation of neural cells (Fig. 3), we

wonder whether spinal cord neural stem cells can be activated by rTSMS and contribute to regeneration. Therefore, we used both *in vitro* neurosphere assays and *in vivo* analysis to study ependymal cells and spinal cord stem cells, and to analyze their reactivity following SCI (Fig. 5A) [10–12]. First, we sacrificed the mice from control and rTSMS, 15 days after SCI, and performed neurosphere assay to study the self-renewal potential of ependymal cells. We found that rTSMS treatment increases the self-renewal potential of spinal cord stem cells by 2-fold *in vitro* (Fig. 5B). To further study ependymal cells' reactivity *in vivo*, we took advantage of the inducible transgenic hFoxJ1-CreERT::tdTomato mouse line [25]. Ependymal cell reactivity was evaluated around the central canal and in the lesion site by quantifying mean fluorescence intensity of tdTomato-positive cells (Fig. 5C). This reveals that rTSMS increases reactivity of spinal cord stem cells and their contribution to the scar (Fig. 5D, E).

Then, we investigated the effects of rTSMS on the fate of ependymal-derived cells after SCI (Fig. 5F–K). Fifteen days after SCI, we observed that the ependymal progeny gives rise to 9% of GFAP+ cells in the control group; in comparison, we found that there was almost two times more Tomato+GFAP+ cells (15%) in the rTSMS group (Fig. 5F–H). Moreover, based on Sox10 staining, we observed that there is a significant increase in the number of Tomato+Sox10+ cells (7.5%) in the rTSMS group in comparison to the control group (3.5%) (Fig. 5I–K).

These results indicate that rTSMS induces more ependymal cells to differentiate into astrocytes and oligodendrocytes.

rTSMS-Based Treatment Enhances Functional Recovery in a Chronic Condition

Acute rTSMS stimulation (the day following SCI) cannot be used for most SCI-affected patient following traffic accidents, falls, and violence [28]. From the therapeutic perspective, we thus tested rTSMS in a chronic condition. We began rTSMS treatment 10 days after SCI for a 14-day period as described above (Fig. 6A). We measured functional recoveries and tissue repair on the same animals throughout the experiments. Our results show that 25 days and 40 days after SCI, rTSMS treatment in this paradigm significantly enhances sensorimotor recoveries, including back leg errors (5 times reduction), back leg error time (10 times reduction), and total crossing time (2 times reduction) (Fig. 6B–D). On these animals, histological analyses reveal that rTSMS modulates scar formation by decreasing the fibrotic (PDGFR β +) and increasing the astrocytic (GFAP+, quantified by GFAP-negative area) scar 90 days after SCI (Fig. 6E–G, H–J respectively).

rTSMS-Based Treatment Enhances Functional Recovery and Modulates Scar Formation in a Chronic Condition in Juvenile and Aged Mice

Epidemiology of the SCI evolved overtime; currently, in developed countries, two categories of persons are more concerned by SCI, teenagers and the elderly [17]. We further investigate whether this rTSMS treatment is applicable in SCI animals at different age. Using the same study design (Figs. 7A and 8A), we tested the effects of rTSMS on juvenile (P30) (Fig. 7) and aged (18 months) (Fig. 8) animals.

In juvenile mice, locomotor experiments show that rTSMS treatment induces sensorimotor recovery 25 days and 40 days after SCI (Fig. 7B–D). On these animals, histological analyses reveal that rTSMS treatment reduces the fibrotic scar 90 days after SCI (Fig. 7E–G).

In aged mice, locomotor experiments show that rTSMS treatment induces a moderate sensorimotor recovery 25 days and 40 days after SCI (Fig. 8B–D). Indeed, for all parameters tested, only the number of back leg errors is significantly improved 25 and 40 days after SCI (Fig. 8B). On the other hand, as previously described for adult and juvenile animals, histological analyses reveal that rTSMS treatment reduces the fibrotic scar 90 days after SCI (Fig. 8E–G).

Discussion

rTMS is a safe and noninvasive form of CNS stimulation that applies focal magnetic field to generate electric currents [29]. rTMS can modulate CNS activity depending on frequency and coil position [30, 31].

This therapy is being evaluated in a number of clinical contexts for the treatment of stroke [32], tinnitus [33], and major depressive disorders [14], as well as for the management of neurodegenerative disorders such as Parkinson's [34] or Alzheimer's diseases [17].

Different studies described the applications of noninvasive neuromodulatory techniques after SCI such as transcutaneous electric stimulation [35], direct current stimulation [36], or magnetic stimulation [37]; all are new therapeutic tools which can be used for experimental and clinical research. Both transcutaneous electric stimulation and direct current stimulation are designed to mainly stimulate individual group of neurons, whereas figure of eight double coil-based TMS delivers a focal magnetic field stimulating neural tissue structure (0.5 mm² to 2 cm² according to the size of the coils) [38, 39]. In our study, one of the main objectives was to modulate noninvasively the lesion site after SCI that is why rTSMS has been chosen.

For SCI, very few experimental and clinical investigations have explored the benefit of the rTMS following SCI, by using full-body or brain stimulation [40–43]. However, full-body stimulations may activate cells from other regions, such

as the brain, and therefore might have an impact on the specificity of the rTMS effects on the spinal cord. Moreover, the cellular and the molecular changes that underpin the effect outcomes are largely unknown.

Although some previously published studies described the use of rTMS after SCI, their stimulation coils and protocols are different from ours. Indeed, the study by Petrosyan et al. explores the use of focal rTMS after SCI on a rat model [44]. However, the protocol is based on a low frequency (0.2 Hz) and very high intensity (2.8 T) stimulation during 5 weeks. Moreover, the protocol was composed of one train of stimulation during 35 min. More importantly, in this study, there was no difference between rTMS treated and untreated animals. Another study by Leydeker et al. used a non-focal stimulation protocol. Indeed, they used a circular coil of 5 cm which implied full-body stimulations [42].

Therefore, we used a focal rTMS paradigm as treatment after SCI, to avoid side effects. We explored the feasibility of the rTMS, evaluated its effects on tissue repair and functional recoveries, and we characterized the cellular and molecular mechanisms induced by rTMS after SCI. As a proof of concept, we used our established rTMS protocol at a frequency of 10 Hz, 10 min per day for 2 weeks. We chose these parameters in accordance with other protocols previously described [22, 45].

SCI causes massive cell death and inflammation, leading to free radical and cytokine production which exacerbates neurons and oligodendrocyte apoptosis at the lesion site and axonal degeneration above the injury [46, 47]. Following SCI, a scar is formed which is composed of a fibrotic and a glial component. The fibrotic component is constituted by a subset of perivascular cells, termed type A pericytes, which creates a scar core of fibroblast-like cells and dense extracellular matrix [5, 10]. Newly, Dias et al. report that significantly more descending axons can grow through the lesion site after SCI when this fibrotic lesion core is reduced [7]. On the other hand, the glial component is generated by astrocytes derived from resident astrocytes and by ependymal cell-derived astrocytes [11, 25]. The resident astrocytes increase their proliferation after SCI and up-regulate the expression of GFAP near the lesion site and in the surrounding area. The glial component prevents inflammation and immune cells and fibroblast-like cell infiltration. Recently, by using transgenic loss-of-function mouse model to ablate scar-forming astrocytes, it has been demonstrated that astrocytes express axon-growth-supporting molecules which aid axonal regeneration after SCI [6].

These studies suggest the fibrotic and astrocyte scar modulation as a potential target to promote axonal regeneration after SCI. In this regard, we investigated if rTMS can modulate fibrotic and astrocyte scars upon SCI. Our results show that rTMS has the ability to modulate scar formation 15 days after SCI and that these effects are sustained 90 days after SCI. In fact, similar to what was described in previous studies, fibrotic scar represents a major barrier for axonal regrowth

and inhibition of it using rTMS increases in turn astrogliosis and decreases inflammation [6, 10, 48].

We further investigated if rTMS treatment can promote functional recovery. To this purpose, we used a foot misplacement apparatus (locotronic test) and we demonstrated that rTMS-based treatment enhances sensorimotor functions after SCI by decreasing the number of back leg errors, total back leg error time, and total crossing time. These results are in agreement with a previously published study in rats showing that magnetic field promotes the restoration of locomotor function after SCI [43].

Then, to obtain more profound molecular knowledge about these effects, we performed proteomic analysis which revealed that 156 proteins are differentially regulated after rTMS. Ingenuity Pathway Analysis of these proteins shows that rTMS increased 37 biological functions and decreased 7 functions. Within these candidates, the targets for improving neurological recovery following SCI are mostly directed to limit the diverse cellular, molecular, and biochemical changes that self-destruct spinal cord tissue and impede neurological recovery following SCI. To this end, we focused on 6 key biological processes modulated after rTMS which are directly related to these secondary injury events. We found 4 biological processes underwent upregulation upon stimulation: (1) proliferation of neural cells, (2) axonogenesis, (3) branching of neurons, and (4) growth of axons. Among these 4 families, we validated them in 2 aspects: (a) axonal regrowth and neuronal branching; (b) neural cell proliferation. Interestingly, proteomic analysis reveals that a high number of myelin and microtubule proteins is upregulated in stimulated group such as MBP, MAPT, MOG, CNP, and Nefm.

It is known that myelination is regulated by many intrinsic and extrinsic factors like neuronal activity [49, 50]. It can be hypothesized that rTMS have a cell extrinsic role via neuronal activity such as promoting the maturation of oligodendrocyte precursor cells or their survival and enhances their myelination potential [19, 51] which could be the cause underlying our findings.

Proteomic analysis also reveals that rTMS upregulates proteins related to neural cell proliferation and cell migration such as SYN1, NCDN, GAP43, PAFAH1, and RHOG. Likewise, we found two important biological functions down-regulated after stimulation in accordance with previous functions—apoptosis and neural cell death—with expression of specific proteins including SOD1/2, PRDX, MAPK3, Cdc42, and SNCA.

In order to validate our proteomic analysis results, we investigated the effect of rTMS on neuronal survival, axonal regeneration, and remyelination. Indeed, after injury, the axonal skeleton disintegrates, and the axonal membrane breaks, which leads to axonal degeneration and release of myelin debris, one of the main causes of axonal regeneration inhibition [46, 52]. This accumulation of myelin debris in turn leads

to the apoptosis of neurons and oligodendrocytes, and further contributes to the failure of remyelination and regeneration [53]. We report that rTSMS after SCI decreases the demyelination process and enhances neuronal survival objectified respectively by the reduction of the MBP-negative area and by the augmentation of the number of NeuN-positive cells. Then, we performed BDA tract-tracing experiments to analyze axonal regrowth/axon survival because tract-tracing is considered the gold standard for studying new growth from axonal systems [54]. It appears that rTSMS treatment induces axonal regrowth/axon survival into the lesion core compared to control (SCI) animals.

Since the tissue regeneration promoted by rTSMS is also partly due to activation of neural cell proliferation, suggested by the proteomics, we further investigate the effects of rTSMS on stem cell proliferation.

Ependymal cells, astrocytes, and OPC are highly proliferative after SCI and display different cellular responses [55, 56]. Each glial cell type has the ability to respond to electrical activity directly or indirectly making them likely cellular effectors of rTSMS [20].

During adulthood, the spinal cord stem cell potential is restricted to ependymal cells. Indeed, we and others previously showed that ependymal cells are the only neural stem cell source in the spinal cord since early postnatal stage throughout adulthood [12]. Moreover, ependymal cells can be activated by SCI, by showing high proliferation, glial differentiation, and massive migration to the injury site for scar formation, as well as secretion of neurotrophic factors for neuronal survival [10, 11]. First, to investigate the effects of rTSMS on ependymal cell reactivity after SCI, we took advantage of the inducible hFoxJ1-CreERT::tdTomato mouse line, to specifically fate map ependymal cells. Our results show that rTSMS after SCI can enhance proliferation of ependymal cells in vitro and their reactivity in vivo compared to the control group. In a second time, we studied the effects of rTSMS on the progeny of ependymal cells. To do so, we analyzed ependymal-derived cells 15 days after SCI. Our data demonstrate that rTSMS enhances differentiation of ependymal cells to oligodendrocyte and astrocyte lineages.

Our results are in line with the finding of a previous study that assessed the effects of rTMS on neural stem cell and progenitor cell (NS/PCs) proliferation and differentiation. Indeed, Abbasnia et al. showed that rTMS increases the number and the size of the neurospheres obtained from adult mouse subventricular zone [57].

Our findings have strengthened the theories from previous studies that rTMS influences a wide variety of cells without direct activations of neuronal firing [58] including glial cells [20]. Indeed, Cullen et al. showed that rTMS increases the number of newborn oligodendrocytes in the adult mouse cortex and their survival and enhances myelination [51]. Moreover, several studies demonstrate that rTMS increase cell

differentiation and proliferation; Guo et al. indicate that the application of 10-Hz rTMS significantly increases the proliferation of adult neural stem cells (NSCs) in the subventricular zone [52]. Menghu et al. showed that rTMS after intracerebral hemorrhage in a mouse model enhances the proliferation and neuronal differentiation of NSCs through the MAPK signaling pathway [59]. It has been also shown that rTMS decreases apoptosis; indeed, Gao et al., using a mouse model of transient ischemia, report that rTMS reduces the number of caspase-3-positive cells [18].

Finally, it is well described that rTMS influences neuronal functions; in particular, it increases their neurotrophic factors production and release. Several studies described that rTMS enhances BDNF and VEGF expression [21, 60].

Lastly, we investigated whether rTSMS can be applied in a more clinical-related context, when the treatment can only begin 10 days after SCI. Indeed, in most of the cases, SCI is due to traffic accidents; these patients could be benefited of the rTSMS-based treatment only when they are stabilized and there is no longer any vital issue. Mainly, these patients stay 10–14 days in the intensive care unit after their accident; that is why we have tested rTSMS during 14 consecutive days, starting the treatment 10 days after SCI. In this paradigm, it appears that rTSMS induced functional recovery and tissue repair in adult mice. Moreover, the incidence of the SCI is higher in two populations of patients, the teenagers and the elderly [61]. We tested whether rTSMS can be potentially applied on patients within these categories. Our results demonstrate that rTSMS induce functional recovery and tissue repair in both juvenile and aged mice. We note in accord with the literature that aged mice have considerably less efficient outcomes than juvenile mice probably due to age-related physiological changes [62]. To further investigate the respective effects of SCI and rTSMS according to the age of mice, we performed additional comparisons of the locomotor performance between adult and juvenile mice and between adult and aged mice (Supplement Fig III). These analyses compare the data obtained 10 days after SCI (1 day before the beginning of rTSMS treatment—control) and 25 and 40 days after SCI (15 days and 30 days respectively after the beginning of rTSMS treatment). Our results show that there is no main difference 10 days after SCI (Control) between adult and juvenile mice (Supplement Fig IIIA-C), except for the total back leg error time. More interestingly, it appears that there is no difference 25 and 40 days after SCI between adult and juvenile mice (Supplement Fig IIIA-C). These results suggest that SCI and also rTSMS have the same impact on locomotor functions in adult and juvenile mice. In the same way, our results show that there is no main difference 10 days after SCI (control) between adult and aged mice (Supplement Fig IIID-F), except for the total crossing time, suggesting that SCI induces the same motor deficits in both adult and aged mice. At the opposite, it appears that 25 and 40 days after SCI, the

locomotor functions are much worse in aged mice in comparison to adult ones (Supplement Fig III D-F), indicating that rTSMS induces better functional recovery in adult mice in comparison to aged mice.

Mice models of rTSMS with different paradigms at different ages play a crucial role in aiding the understanding of the cellular and molecular mechanisms underlying rTSMS effects after SCI. However, one of the main limitations to rodent models of rTMS is the lack of rodent-specific TMS stimulator coils [63]. In all study including ours, commercial human coils which are large are used, inducing a lack of focality. In our study, the area stimulated was 1.5 cm², meaning that 3–4 vertebral segments have been stimulated. For a better translation to clinical, there is a need to develop a rodent-specific coil that can deliver rTMS at high intensity while maintaining a good degree of focality.

Various animal and SCI models have been employed to understand the pathophysiology of SCI and to develop therapeutic strategies [64]. In our study, we used a complete transection model due to the fact that it is highly reproducible and allow to specifically study axonal regeneration and recovery of locomotion [27]. However, to a clinical point of view, this model is less relevant. Indeed, clinically, the most common form of injury is a contusion injury. Nevertheless, the cellular responses which follow injury are similar between contusion and transection [65]. Indeed, after contusion, the scar is composed of a fibrotic scar associated with hematogenous macrophages and of an astroglial scar occupied by microglia [66]. Moreover, it is described that after SCI, mice show some regeneration and spontaneous recovery [67], in particular after contusive injury. In our study, we performed a complete transection; as shown in Supplement Fig III, there is no tissue repair in control mice which induces physical deterioration overtime in this group (Fig. 2).

Conclusion

Altogether, our findings report that rTSMS induces therapeutic effects in juvenile, adult, and aged rodent models following SCI by modulating the scar formation, increasing proliferation and differentiation of spinal cord stem cells to glial cells, and promoting remyelination, which lead to axonal regrowth, neuronal survival, and locomotor recovery. Our result suggests that rTSMS could be a promising therapy following SCI and pave the way for preclinical translation.

Acknowledgments Behavioral studies and processing were conducted with the support of equipment from the Behavioural Analysis Platform SCAC (University of Rouen Normandy, France).

Required Author Forms [Disclosure forms](#) provided by the authors are available with the online version of this article.

Authors' Contributions N.G. conceptualized the project. C.C. and N.G. designed the experiments. C.C., J.H., C.G., Q.D., X.L., C.D., and D.S. performed the experiments. C.C., J.H., C.G., P.C., and N.G. analyzed the results. P.C. and J.P.M. provided techniques and scientific input. C.C., Q.D., X.L., and N.G. wrote the article.

All authors read and approved the final manuscript.

Funding Information This research was supported by the ADIR association and IRME association. CC and NG are supported by the European Union and Normandie Regional Council. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Funds (ERDF).

Data Availability The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and its Supplement material.

Compliance with Ethical Standards

Competing Interests The authors declare that they have no competing interests.

Consent for Publication All authors have read the manuscript and indicated consent for publication

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Wilson JR, Cadotte DW, Fehlings MG. Clinical predictors of neurological outcome, functional status, and survival after traumatic spinal cord injury: a systematic review. *J Neurosurg Spine*. 2012;17:11–26.
2. Siddiqui AM, Khazaei M, Fehlings MG. Translating mechanisms of neuroprotection, regeneration, and repair to treatment of spinal cord injury. *Progress in Brain Research*; 2015 218. p. 15–54.
3. Tran A et al. The Biology of Regeneration Failure and Success After Spinal Cord Injury. *Physiol Rev*. 2018;98(2):881–917.
4. Cregg JM, DePaul MA, Filous AR, et al. Functional regeneration beyond the glial scar. *Experimental Neurology*. 2014;253:197–207.
5. Goritz C, Dias DO, Tomilin N, et al. A Pericyte Origin of Spinal Cord Scar Tissue. *Science*. 2011;333:238–242.
6. Anderson MA, Burda JE, Ren Y, et al. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*. 2016;532:195–200.
7. Dias DO, Kim H, Holl D, et al. Reducing Pericyte-Derived Scarring Promotes Recovery after Spinal Cord Injury. *Cell*. 2018;173:153–165.e22.
8. Dias DO, Görzitz C. Fibrotic scarring following lesions to the central nervous system. *Matrix Biol*. 2018;68–69:561–570.

9. Anderson MA, O'Shea TM, Burda JE, et al. Required growth facilitators propel axon regeneration across complete spinal cord injury. *Nature*. 2018;561:396–400.
10. Sabelström H, Stenudd M, Réu P, et al. Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science*. 2013;342:637–640.
11. Barnabé-Heider F, Göritz C, Sabelström H, et al. Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell*. 2010;7:470–482.
12. Li X, Floriddia EM, Toskas K, et al. Regenerative Potential of Ependymal Cells for Spinal Cord Injuries Over Time. *EBioMedicine*. 2016;13:55–65.
13. Garbossa D, Boido M, Fontanella M, et al. Recent therapeutic strategies for spinal cord injury treatment: possible role of stem cells. *Neurosurg Rev*. 2012;35:293–311.
14. Becker JE, Shultz EKB, Maley CT. Transcranial Magnetic Stimulation in Conditions Other than Major Depressive Disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 2019;28:45–52.
15. Khedr EM, Etraby AE, Hemeda M, et al. Long-term effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on motor function recovery after acute ischemic stroke. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2010;121:30–37.
16. Ba F, Zhou Y, Zhou J, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation protects mice against 6-OHDA-induced Parkinson's disease symptoms by regulating brain amyloid β 1-42 level. *Mol Cell Biochem*. 2019;458:71–78.
17. Rabey JM, Dobronevsky E. Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) combined with cognitive training is a safe and effective modality for the treatment of Alzheimer's disease: clinical experience. *J Neural Transm*. 2016;123:1449–1455.
18. Gao F, Wang S, Guo Y, et al. Protective effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in a rat model of transient cerebral ischaemia: a microPET study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010;37:954–961.
19. Prasad A, Teh DBL, Blasiak A, et al. Static Magnetic Field Stimulation Enhances Oligodendrocyte Differentiation and Secretion of Neurotrophic Factors. *Scientific Reports*. 2017;7: 6743.
20. Cullen CL, Young KM. How Does Transcranial Magnetic Stimulation Influence Glial Cells in the Central Nervous System? *Frontiers in Neural Circuits*. 2016;10:26.
21. Grehl S, Viola HM, Fuller-Carter PI, et al. Cellular and Molecular Changes to Cortical Neurons Following Low Intensity Repetitive Magnetic Stimulation at Different Frequencies. *Brain Stimulation*. 2015;8:114–123.
22. Makowiecki K, Harvey AR, Sherrard RM, et al. Low-intensity repetitive transcranial magnetic stimulation improves abnormal visual cortical circuit topography and upregulates BDNF in mice. *J Neurosci*. 2014;34:10780–10792.
23. Chort A, Alves S, Marinello M, et al. Interferon β induces clearance of mutant ataxin 7 and improves locomotion in SCA7 knock-in mice. *Brain*. 2013;136:1732–1745.
24. Kentache T, Abdelkrim AB, Jouenne T, et al. Global Dynamic Proteome Study of a Pellicle-forming *Acinetobacter baumannii* Strain. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2017;16:100–112.
25. Meletis K, Barnabé-Heider F, Carlén M, et al. Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol*. 2008;6:e182.
26. Li X, Floriddia EM, Toskas K, et al. FoxJ1 regulates spinal cord development and is required for the maintenance of spinal cord stem cell potential. *Experimental Cell Research*. 2018;368:84–100.
27. Cheriyan T, Ryan DJ, Weinreb JH, et al. Spinal cord injury models: a review. *Spinal Cord*. 2014;52:588–595.
28. Weidner N, Rupp R, Tansey K, editors. *Neurological Aspects of Spinal Cord Injury*. Springer International Publishing; 2017.
29. Barker AT, Jalinous R, Freeston IL. Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. *Lancet*. 1985;1:1106–1107.
30. Hoppenrath K, Härtig W, Funke K. Intermittent Theta-Burst Transcranial Magnetic Stimulation Alters Electrical Properties of Fast-Spiking Neocortical Interneurons in an Age-Dependent Fashion. *Front Neural Circuits*. 2016;10:22.
31. Tang A, Thickbroom G, Rodger J. Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation of the Brain: Mechanisms from Animal and Experimental Models. *Neuroscientist*. 2017;23:82–94.
32. Dionísio A, Duarte IC, Patrício M, et al. The Use of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation for Stroke Rehabilitation: A Systematic Review. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018;27:1–31.
33. Mulders WHAM, Vooys V, Makowiecki K, et al. The effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in an animal model of tinnitus. *Scientific Reports*. 2016;6.
34. Torres F, Villalon E, Poblete P, et al. Retrospective Evaluation of Deep Transcranial Magnetic Stimulation as Add-On Treatment for Parkinson's Disease. *Front Neurol*. 2015;6:210.
35. Rejc E, Angeli CA. Spinal Cord Epidural Stimulation for Lower Limb Motor Function Recovery in Individuals with Motor Complete Spinal Cord Injury. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2019;30:337–354.
36. Song W, Martin JH. Spinal cord direct current stimulation differentially modulates neuronal activity in the dorsal and ventral spinal cord. *J Neurophysiol*. 2017;117:1143–1155.
37. Hunanyan AS, Petrosyan HA, Alessi V, et al. Repetitive spinal electromagnetic stimulation opens a window of synaptic plasticity in damaged spinal cord: role of NMDA receptors. *J Neurophysiol*. 2012;107:3027–3039.
38. Müller-Dahlhaus F, Vlachos A. Unraveling the cellular and molecular mechanisms of repetitive magnetic stimulation. *Front Mol Neurosci*. 2013;6.
39. Opitz A, Windhoff M, Heidemann RM, et al. How the brain tissue shapes the electric field induced by transcranial magnetic stimulation. *Neuroimage*. 2011;58:849–859.
40. Nakanishi T, Fujita Y, Tanaka T, et al. Anti-repulsive guidance molecule-a antibody treatment and repetitive transcranial magnetic stimulation have synergistic effects on motor recovery after spinal cord injury. *Neurosci Lett*. 2019;709:134329.
41. Niu T, Bennett CJ, Keller TL, et al. A Proof-of-Concept Study of Transcutaneous Magnetic Spinal Cord Stimulation for Neurogenic Bladder. *Sci Rep*. 2018;8:12549.
42. Leydeker M, Delva S, Tserlyuk I, et al. The effects of 15 Hz trans-spinal magnetic stimulation on locomotor control in mice with chronic contusive spinal cord injury. *Electromagnetic Biology and Medicine*. 2013;32:155–164.
43. Li Z, Yao F, Cheng L, et al. Low frequency pulsed electromagnetic field promotes the recovery of neurological function after spinal cord injury in rats. *J Orthop Res*. 2019;37:449–456.
44. Petrosyan HA, Alessi V, Hunanyan AS, et al. Spinal electromagnetic stimulation combined with transgene delivery of neurotrophin NT-3 and exercise: novel combination therapy for spinal contusion injury. *Journal of Neurophysiology*. 2015;jn.00480.2015.
45. Guo F, Han X, Zhang J, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation promotes neural stem cell proliferation via the regulation of MiR-25 in a rat model of focal cerebral ischemia. *PLoS ONE*. 2014;9:e109267.
46. Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Front Neurol*. 2019;10.
47. Ahuja CS, Wilson JR, Nori S, et al. Traumatic spinal cord injury. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3:17018.
48. Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, et al. Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury. *J Neurosci*. 2004;24:2143–2155.

49. Bechler ME, Swire M, Ffrench-Constant C. Intrinsic and adaptive myelination-A sequential mechanism for smart wiring in the brain. *Dev Neurobiol.* 2018;78:68–79.
50. Hines JH, Ravanelli AM, Schwandt R, et al. Neuronal activity biases axon selection for myelination in vivo. *Nat Neurosci.* 2015;18:683–689.
51. Cullen CL, Senesi M, Tang AD, et al. Low-intensity transcranial magnetic stimulation promotes the survival and maturation of newborn oligodendrocytes in the adult mouse brain. *Glia.* 2019;67:1462–1477.
52. Filbin MT. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4:703–713.
53. Pukos N, Goodus MT, Sahinkaya FR, et al. Myelin status and oligodendrocyte lineage cells over time after spinal cord injury: What do we know and what still needs to be unwrapped? *Glia.* 2019;67:2178–2202.
54. Tuszynski MH, Steward O. Concepts and Methods for the Study of Axonal Regeneration in the CNS. *Neuron.* 2012;74:777–791.
55. O'Shea TM, Burda JE, Sofroniew MV. Cell biology of spinal cord injury and repair. *J Clin Invest.* 2017;127:3259–3270.
56. Gaudet AD, Fonken LK. Glial Cells Shape Pathology and Repair After Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics.* 2018;15:554–577.
57. Abbasnia K, Ghanbari A, Abedian M, et al. The effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on proliferation and differentiation of neural stem cells. *Anatomy & Cell Biology.* 2015;48:104.
58. Dufor T, Grehl S, Tang AD, et al. Neural circuit repair by low-intensity magnetic stimulation requires cellular magnetoreceptors and specific stimulation patterns. *Sci Adv.* 2019;5:eaav9847.
59. Cui M, Ge H, Zeng H, et al. Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Promotes Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation after Intracerebral Hemorrhage in Mice. *Cell Transplant.* 2019;28:568–584.
60. Zhang Z-C, Luan F, Xie C-Y, et al. Low-frequency transcranial magnetic stimulation is beneficial for enhancing synaptic plasticity in the aging brain. *Neural Regen Res.* 2015;10:916–924.
61. Stein DM, Pineda JA, Roddy V, et al. Emergency Neurological Life Support: Traumatic Spine Injury. *Neurocrit Care.* 2015;23 Suppl 2: S155-164.
62. Hachem LD, Ahuja CS, Fehlings MG. Assessment and management of acute spinal cord injury: From point of injury to rehabilitation. *The Journal of Spinal Cord Medicine.* 2017;40:665–675.
63. Seewoo BJ, Etherington SJ, Feindel KW, et al. Combined rTMS/fMRI Studies: An Overlooked Resource in Animal Models. *Front Neurosci.* 2018;12:180.
64. Nardone R, Florea C, Höller Y, et al. Rodent, large animal and non-human primate models of spinal cord injury. *Zoology (Jena).* 2017;123:101–114.
65. Soderblom C, Luo X, Blumenthal E, et al. Perivascular Fibroblasts Form the Fibrotic Scar after Contusive Spinal Cord Injury. *J Neurosci.* 2013;33:13882–13887.
66. Zhu Y, Soderblom C, Krishnan V, et al. Hematogenous macrophage depletion reduces the fibrotic scar and increases axonal growth after spinal cord injury. *Neurobiol Dis.* 2015;74:114–125.
67. Duncan GJ, Plemel JR, Assinck P, et al. Locomotor recovery following contusive spinal cord injury does not require oligodendrocyte remyelination. *Nat Commun.* 2018; 3;9(1):3066.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Publications et discussions

6.2 Préambule

En plus de mes travaux de Thèse portant sur les effets de la rTSMS, j'ai pu travailler sur plusieurs projets internes, au sein de notre laboratoire, et externes, en collaboration avec le département de neurosciences du Karolinska Institutet, Stockholm, Suède.

Ces projets s'inscrivent dans le contexte des recherches fondamentales et cliniques de la moelle spinale.

Premièrement nous avons étudié la cartographie des cellules épendymaires au cours du développement, ainsi que l'implication du facteur de transcription FoxJ1 dans les mécanismes de gliogenèse et dans le maintien du potentiel souche endogène de la moelle à la suite d'une lésion médullaire (Article 1). Nous nous sommes également intéressés à la physiopathologie de cette lésion traumatique en explorant les mécanismes de fonctionnement des cellules gliales olfactives (CGO) en tant que thérapie cellulaire (Article 2). Enfin, nous avons évalué les effets de la transplantation des CGO sur les réponses cellulaires endogènes de la moelle spinale à la suite de la lésion et en particulier sur la réactivité des cellules souches endogènes médullaires (Article 3).

6.3 Article I

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

Xiaofei Li, Elisa M. Floriddiaa, Konstantinos Toskas, Chaima Chalfouh, Axel Honore, Anne Aumont, Nicolas Vallières, Steve Lacroix, Karl J.L. Fernandes, Nicolas Guérout*, Fanie Barnabé-Heider*

Experimental Cell Research 2018 Jul 1 ;368(1) :84-100. doi : 10.1016/j.yexcr.2018.04.017.

Ce projet de recherche s'intéresse au rôle du facteur de transcription FoxJ1 au cours du développement de la moelle spinale ainsi que dans le maintien du potentiel souche des cellules épendymaires après lésion chez l'adulte. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le département de neurosciences du Karolinska institutet, Stockholm, Suède, dans le cadre de la Thèse du Dr. Xiaofei Li. Forkhead box protein J1 (FoxJ1) est un facteur de transcription souvent décrit comme le facteur principal impliqué dans la ciliogenèse et le marqueur spécifique de cellules multiciliées chez les mammifères, telles que les cellules du plexus choroïde, les cellules de l'épithélium pulmonaire et les cellules épendymaires du SNC.

Plusieurs études ont montré l'implication du FoxJ1 dans la différenciation des cellules de la glie radiaire en cellules épendymaires et en sous-populations astrocytaires au niveau cérébral [59, 254].

En se basant sur ces études, nous avons émis l'hypothèse que le FoxJ1 ne soit pas uniquement impliqué dans le processus de ciliogenèse, mais qu'il joue probablement un rôle important durant le développement, particulièrement lors de la neurogenèse et de la gliogenèse de la moelle spinale.

Le premier objectif de cette étude, était de caractériser la distribution spatio-temporelle de l'expression du FoxJ1 au niveau de la moelle spinale durant les différents stades de développement. En premier lieu, et en tirant avantage de la lignée transgénique non inductible hFoxJ1::EGFP et de la lignée inductible hFoxJ1-CreER^{T2}::YFP, des analyses immunohistologiques ont été réalisées. L'utilisation de ces deux modèles a permis de montrer, que les cellules GFP⁺ expriment le FoxJ1 ainsi que la présence de ce dernier dès le stade E10.5, avant même l'apparition des cellules épendymaires à E15.5.

Ensuite, la cartographie de la distribution de l'expression de FoxJ1 selon l'axe dorso-ventral de la moelle durant le développement de E10.5 jusqu'à P10 a été établie et a démontré que la distribution spatio-temporelle des cellules GFP⁺ (exprimant le FoxJ1) est divisée en quatre stades :

- De E10.5 à E14.5 : Expression du FoxJ1 au niveau de la substance grise et au niveau du plancher (floor-plate)
- De E15.5 à E16.5 : Cette période correspond à la première apparition des cellules épendymaires, l'expression du FoxJ1 est retrouvée au niveau de la zone ventriculaire, au niveau du plancher et au niveau de la corne ventrale latérale de la substance grise.

- À E17.5 : A ce stade il peut être remarqué une augmentation du nombre de cellules GFP⁺, l'expression est alors au niveau du cordon dorsal de la substance blanche.
- Dès la naissance et de P2 à P10 : A P2, nous pouvons remarquer une diminution importante de ces cellules dans toutes les régions sauf au niveau du canal central. A P10, l'expression du FoxJ1 est limitée uniquement aux cellules bordant le canal central.

Par la suite, nous avons identifié les progéniteurs exprimant le FoxJ1 durant le développement. Pour ce faire, le même modèle hFoxJ1-creER^{T2}::YFP a été utilisé *in vivo*. En se basant sur les co-marquages de ces cellules GFP⁺ et sur un panel de marqueurs spécifiques des différentes cellules du tube neural, nous avons pu montrer que les cellules exprimant FoxJ1, à ce stade, sont des sous types d'interneurones (V1 et V2) coexprimant les marqueurs GFP⁺, Pax2⁺ et chx10⁺ et ce, de E10.5 à E13.5 et des sous populations d'astrocytes dorsaux-latéraux (GFP⁺, sox9⁺ et vimentine⁺). Le pic d'expression de ces dernières se situe entre E15.5 et E17.5, coïncidant avec la gliogenèse.

Afin de déterminer le rôle du FoxJ1 durant le développement et après la naissance, nous avons utilisé une autre lignée transgénique FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato. Cette lignée Knock-in provoque une délétion du gène *FoxJ1*, tout en conservant l'insertion d'un rapporteur TdTomato au niveau du locus Rosa26. Cette lignée a permis l'utilisation du promoteur endogène du FoxJ1 comme initiateur de la transcription de CreER^{T2}. D'après les analyses faites sur ces souris FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato, hétérozygotes, homozygotes et sauvages, nous avons pu constater une restriction de l'expression du FoxJ1 uniquement au niveau du canal central et dans le plancher à E17.5, ainsi qu'une diminution du nombre de cellules recombinées cinq fois inférieur au nombre de celles recombinées dans les autres modèles, de même pour leur taux de prolifération.

Le deuxième objectif consistait à évaluer l'effet de l'altération de l'expression du FoxJ1 sur le potentiel souche endogène de la moelle spinale, saine et lésée, dans deux de ces modèles de souris ; FoxJ1-KI-CreER^{T2} hétérozygotes et FoxJ1-CreER^{T2}::YFP, et ce à deux âges différents ; P10 et adulte. En premier lieu, nous avons mené des études *in vitro* basées sur des cultures de neurosphères. Ces études ont permis de démontrer que, chez les souris FoxJ1-KI-CreER^{T2}, le nombre de neurosphères obtenues est significativement inférieur à celui obtenu chez des souris FoxJ1-CreER^{T2}::YFP et chez des souris WT. De plus, ces études *in vitro* ont montré que le taux de recombinaison des neurosphères est nettement inférieur chez les souris FoxJ1-KI-CreER^{T2} en comparaison à celui observé chez les souris FoxJ1-CreER^{T2}::YFP. Nous pouvons ainsi en

déduire que l'expression du FoxJ1 est indispensable au maintien du potentiel d'auto-renouvellement des cellules souches endogènes de la moelle spinale dans les conditions physiologiques et pathologiques *in vitro*.

Concernant la différenciation des premières neurosphères, *in vitro*, nous avons remarqué une différence de proportions quant aux types de cellules générées. En effet, plus de neurones et moins d'oligodendrocytes et d'astrocytes ont été obtenus à partir des neurosphères issues des souris FoxJ1-KI-CreER^{T2} en comparaison à la différenciation des neurosphères obtenues à partir des souris FoxJ1-CreER^{T2}::YFP ou WT. Nous avons pu en conclure alors que l'expression du FoxJ1 influence la détermination des voies de différenciation empruntées par les cellules souches de la moelle spinale. Enfin, nous nous sommes intéressés, dans un cadre lésionnel, à l'effet de l'absence d'expression du FoxJ1 sur la capacité migratoire des cellules souches du canal central vers le site de la lésion, deux semaines après LMT. Nous avons ainsi pu observer une diminution significative *in vivo* du nombre de cellules recombinaées migrant vers le site de la lésion chez les souris FoxJ1-KI-CreER^{T2}.

En conclusion, ce projet nous a confirmé que l'expression du FoxJ1 précède l'apparition des cellules épendymaires durant le développement, son expression transitoire étant très importante au cours de la neurogenèse et de la gliogenèse dans la moelle spinale. Également, cette expression est indispensable pour la prolifération, la migration et le maintien du potentiel souche des cellules souches endogènes de la moelle spinale dans les conditions physiologiques et pathologiques. Cette étude souligne donc l'intérêt de ce facteur de transcription comme une cible thérapeutique intéressante à explorer.

Ce travail a fait l'objet d'une publication « FoxJ1 regulates spinal cord development and is required for the maintenance of spinal cord stem cell potential » dans le journal *Experimental Cell Research* dans laquelle je suis middle auteure.



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

Xiaofei Li^{a,1}, Elisa M. Floriddia^{a,1,2}, Konstantinos Toskas^{a,3}, Chaima Chalfouh^{b,c}, Axel Honore^{b,c}, Anne Aumont^d, Nicolas Vallières^{e,f}, Steve Lacroix^{e,f}, Karl J.L. Fernandes^d, Nicolas Guérout^{a,b,c,*}, Fanie Barnabé-Heider^{a,**}

^a Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, 17177 Stockholm, Sweden

^b Normandie Univ, UNIROUEN, EA3830, GRHV, 76000 Rouen, France

^c Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000 Rouen, France

^d Department of Neurosciences, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3C3J7

^e Centre de recherche du Centre hospitalier universitaire (CHU) de Québec–Université Laval, Québec, QC, Canada G1R2J6

^f Département de médecine moléculaire, Faculté de médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada G1V0A6

ARTICLE INFO

Keywords:

Neural progenitors
Astrocyte subtypes
Ependymal cells
Self-renewal
Differentiation
Spinal cord injury

ABSTRACT

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

1. Introduction

The spinal cord comprises the caudal region of the central nervous system (CNS) and is responsible for conveying motor and sensory information between the brain and the periphery, as well as for elaborating reflexes. During development, spinal cord progenitor cells surrounding the ventricular zone, the nascent central canal, are subjected to their cell fate determination mainly by gradients of dorsal and ventral morphogens, such as BMPs, Wnt, and Shh [5]. The diffusion of these different morphogens activates or represses a number of transcription factor families, giving rise to spatially segregated progenitor domains along the dorsal-ventral axis, marked by sets of transcription factors including Olig2, Pax2, Chox10, among others [10]. These progenitor domains will later produce waves of distinct subtypes of neurons and glial cells [11,31], which migrate from their homeodomains of

origin to their final locations in the spinal cord and engage in distinct circuits [1,14,2,28,38,9]. We have a good understanding of neurogenesis and the type of neurons that originate from each ventricular domain during development, on the other hand our understanding of the complex developmental origin of glial cells (astrocytes, oligodendrocytes, and ependymal cells), their fate specification, and consequent heterogeneity is more limited [12,18,41,8]. Several subtypes of astrocytes are generated in a similar spatial manner around the ventricular zone, and migrate horizontally into the lateral regions [15], however gliogenesis in the dorsal spinal cord has not been studied in detail yet [12]. Ependymal cells appear around the ventricular zone at E15.5 in mice. Their differentiation is dependent on Shh signaling pathway and the expression of the transcription factor FoxJ1 [20,38]. In contrast to newly born astrocytes, ependymal cells that appear around E15.5 do not migrate away from the central canal, as they are involved in the

* Corresponding author at: Normandie Univ, UNIROUEN, EA3830, GRHV, 76000 Rouen, France.

** Corresponding author.

E-mail addresses: nicolas.guerout@univ-rouen.fr (N. Guérout), fanie.barnabe-heider@ki.se, faniebh@gmail.com (F. Barnabé-Heider).

¹ Equal contribution.

² Current address: Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, 17177 Stockholm, Sweden.

³ Current address: Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institutet, 17177 Stockholm, Sweden.

production and regulation of cerebrospinal fluid, remaining proliferative and continuously expressing FoxJ1 during embryonic development and throughout adulthood [20,23]. The heterogeneity of progenitor subtypes during development is reflected in the neural cell type variety generated and present later on in adulthood [19,36,40,4].

Ependymal cells can easily be identified by FoxJ1 expression, a transcription factor classically involved in ciliogenesis and expressed by diverse multi-ciliated cells, including cells in the choroid plexus, lung epithelium, oviduct and testis [13,25,35,39,7]. Therefore, in the CNS, FoxJ1 is mostly considered a specific marker for ependymal cells. However, FoxJ1 is also expressed by subsets of progenitor cells. Indeed, some radial glial cells along the brain ventricles express it as well and its expression is required for proper differentiation into ependymal cells and a subset of astrocytes [17]. A subset of progenitors also require FoxJ1 expression during the embryonic-to-postnatal transition in olfactory bulb neurogenesis [16]. These studies suggest that FoxJ1 is important not only in ciliogenesis, but also in cell fate specification of certain progenitor subtypes during development. However, its role during neurogenesis and gliogenesis in the developing spinal cord is still unknown.

Here, using three transgenic models, we report that FoxJ1 is transiently expressed not only by ependymal cells but also by earlier progenitors of other neural cell types during spinal cord development, including the progenitors of subsets of V1 and V2 interneurons and by progenitors of astrocytes of unknown origin. We also observed that FoxJ1 is involved in the regulation of progenitor cell proliferation during development, and maintenance of the ependymal cells stem cell potential from development to adulthood. In addition, we investigated the role of FoxJ1 in adult ependymal cells activated by spinal cord injury and found that FoxJ1 is required for their migration towards the lesion site. In summary, we propose that FoxJ1 has novel roles in the developing and adult spinal cord, beyond ciliogenesis, paving the way for further studies on its roles in spinal cord development and repair following SCI.

2. Materials and methods

2.1. Mice

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

We used three mice lines in this study, including randomized grouped male and females (Fig. 2). 1) Non-inducible FOXJ1::EGFP [27] (where the human FoxJ1 promoter driving EGFP expression were used for tissue collection at E10.5-E17.5 and P0-P10). 2) Tamoxifen-inducible FOXJ1-CreER^{T2} transgenic mice were crossed with Rosa26-YFP mice [23,27]. 3) FoxJ1-KI-CreER^{T2}:Tomato mouse line for the study of FoxJ1 gene deletion effects, which was generated by crossing a knock-in mouse line with FoxJ1 deletion [26] with ROSA26-CAG-tdTomato reporter mice (The Jackson Laboratory stock #007908) for lineage tracing. The mouse lines were bred with C57Bl6/J so that the same genetic background allowed us to safely compare the different conditions. For tamoxifen-induced recombination in line 2 and 3, we injected the dams intraperitoneally with 60 mg/kg of body weight or gavaged mice 50 mg/kg daily for 2 days or 5 days in embryonic and postnatal stage, respectively. These animals were sacrificed one day after the last tamoxifen administration, as indicated on the Figures.

2.2. Tissue preparation and sectioning

At the end of the survival period, the adult animals (P60-P120) were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (150 mg/kg body weight) and perfused transcardially with 0.1 M PBS, pH 7.4%, and 4% PFA in PBS, pH 7.4. Spinal cords from embryonic or early postnatal

stages were dissected quickly on ice cold PBS after dams were sacrificed. Pups (P0-P10) were sacrificed by cervical dislocation and spinal cords were dissected on ice cold PBS. Dissected spinal cords were further post-fixed in 4% PFA in PBS at 4 °C overnight and cryoprotected in 30% sucrose for at least 48 h. After embedding in Tissue-Tek OCT compound, the spinal cords were cut to 16 µm-thick sagittal or coronal sections using a cryostat. Sections were collected 1:12 accordingly to stereological principles and stored at – 20 °C until further use.

2.3. Tissue processing

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

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

2.4. Surgical procedure and postoperative care

Dorsal funiculus transection was performed to mice at T10 level in the spinal cord. The surgical procedure and postoperative care was previously described in detail [20]. Briefly, the skin was incised at thoracic level and laminectomy performed to expose the spinal cord at T9–10 level. The spinal cord was transected with a micro knife (Fine Scientific Tools) in order to damage the dorsal finiculi. The central canal is left untouched by the procedure. The mice were checked daily for signs of distress and to monitor the physiological recovery of functions after injury.

2.5. Tissue preparation and sectioning

At the end of the survival period, the animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (APL) (150 mg/kg body weight) and perfused transcardially with 0.1 M PBS, pH 7.4%, and 4% PFA in PBS, pH 7.4 (Life Technologies). Dissected spinal cords were further postfixed in 4% PFA in PBS at 4 °C overnight and cryoprotected in 30% sucrose (Life Technologies) for at least 48 h. After embedding in Tissue-Tek OCT compound (Sakura), the spinal cords were cut sagittally or coronally to 16–20 µm thickness. Sections were collected 1:10 accordingly to stereological principles and stored at – 80 °C until further use.

2.6. Immunohistochemistry

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

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

Antibody	Species	Dilution	Company (Catalog number)
GFP	Chicken	1:500	Aves (GFP-1020)
FoxJ1	Goat	1:200	R&D Systems (AF3619)
EVX1	Guinea pig	1:200	Gift from Dr. Alessandra Pierani
Pax2	Rabbit	1:300	Life technologies (71–6000)
Chx10	Sheep	1:300	Millipore (AB9016)
Vimentin	Chicken	1:1000	Millipore (AB5733)
Reelin	Mouse	1:200	Millipore (MAB5364)
Sox9	Goat	1:500	R&D Systems (AF3075)
Ki-67	Rabbit	1:500	ThermoScientific (RM-9106)
GFAP	Rabbit	1:500	Millipore (AB5804)
Sox10	Goat	1:500	R&D Systems (AF2864)
NG2	Rabbit	1:500	Millipore (AB5320)
CNPase	Mouse	1:200	Millipore (MAB326R)
Tuj1	Mouse	1:500	Covance (MMS435P)
DAPI		1:10000	Sigma (D9542)
Anti-rabbit cy3 secondary antibody	Donkey	1:500	Jackson Immuno Research (711-166-152)
Anti-mouse cy3 secondary antibody	Donkey	1:500	Jackson Immuno Research (715-165-140)
Anti-chicken Alexa 488 secondary antibody	Donkey	1:500	Jackson Immuno Research (703-545-155)

of the primary antibodies used are reported in Table 1.

2.7. Neural stem cell cultures

2.7.1. Culture

Animals were sacrificed for control culture or one week after SCI. Spinal cord cells were dissociated and neurosphere cultures were established as described before [20,23]. After counting, cells isolated from one spinal cord were plated in T25 flasks. Primary neurospheres were harvested after 12 days in culture then were dissociated into single cells for passage or differentiation. Approximately 100,000 cells per animal were plated in T25 flasks for the next generation of neurospheres, and all the new neurospheres (second and third generation) were harvested after one week in culture. Dissociated primary neurospheres, approximately 70,000 cells/well, were plated in poly-L-lysine-coated chamber slides (Sigma) for differentiation with growth factor-free medium supplemented with 1% fetal bovine serum.

2.7.2. Immunocytochemistry

In order to assess the recombination rate after 12 days *in vitro*, approximately 100–200 recombined primary neurospheres were plated in poly-L-lysine-coated chamber slides for one day, followed by fixation with 4% PFA (20 min at room temperature) and immunocytochemistry for quantification of recombined neurospheres with either an anti-GFP or anti-TdTomato antibody. For differentiation assay, after 10 days in growth factor-free differentiation condition, immunocytochemistry was performed as described above. Full details of the primary antibodies used are reported in Table 1.

2.7.3. Cell culture analysis

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

2.8. Image acquisition and tissue analysis

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

2.9. Experimental design and statistical analysis

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

3. Results

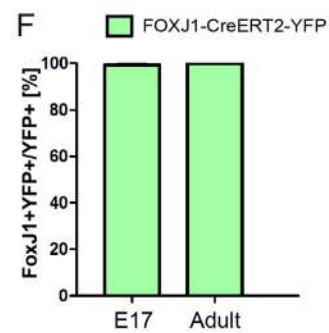
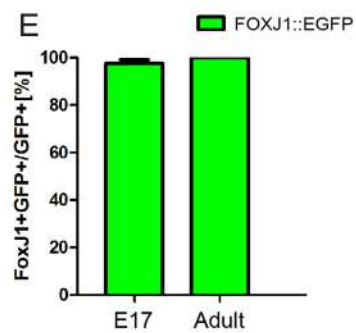
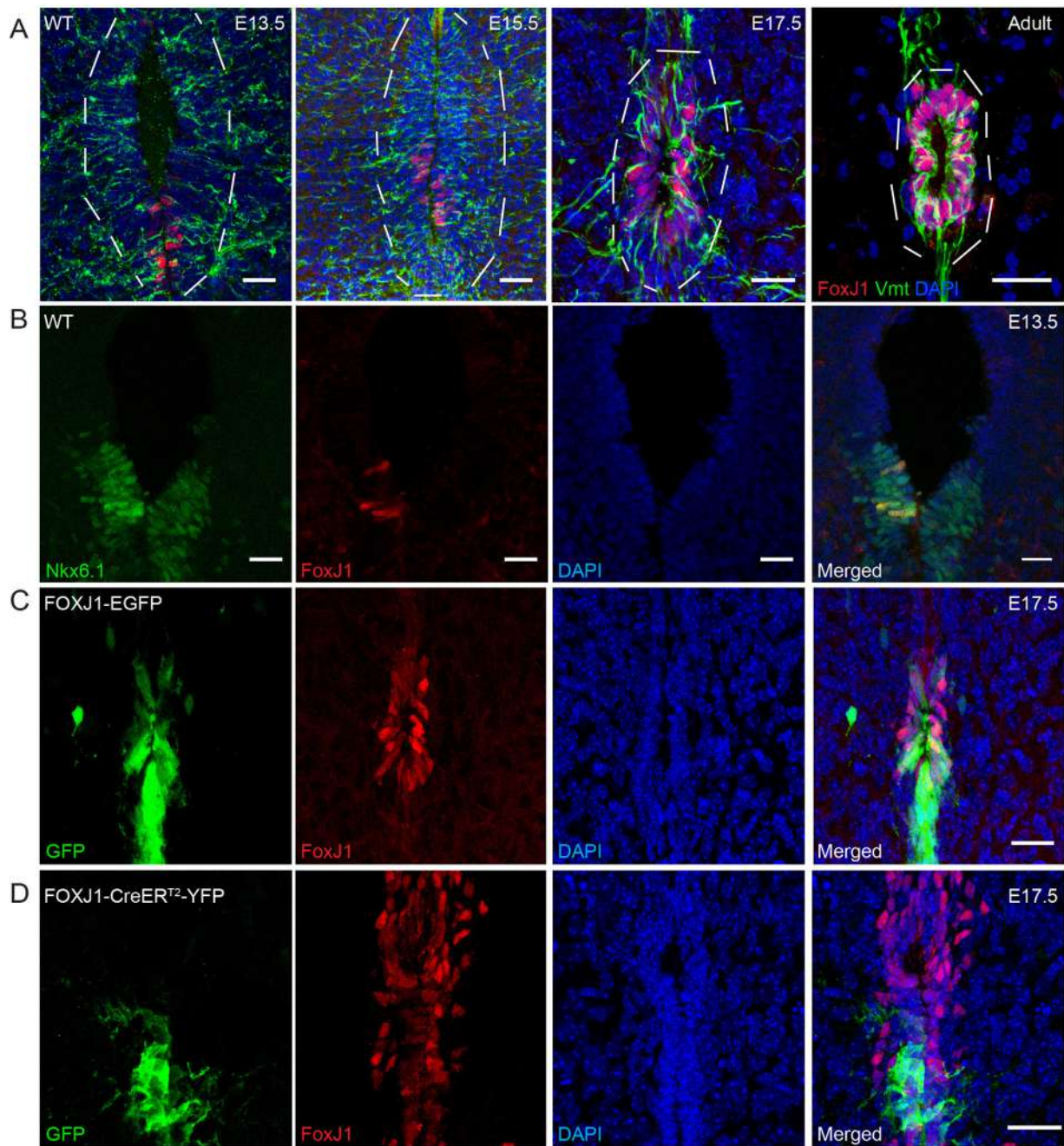
3.1. Spatiotemporal distribution of FoxJ1 lineage cells in the developing spinal cord

FoxJ1 transcription factor is specifically expressed in cells with motile cilia, including ependymal cells, which first appear at E15.5 in the developing spinal cord [20,23,3]. Surprisingly, we performed immunostaining for FoxJ1 protein, and found that E13 progenitor cells surrounding the ventricular zone express detectable levels of FoxJ1, several days prior to the appearance of the first ependymal cells at E15 [20]. These early FoxJ1⁺ cells included neuronal progenitors, as they are Nkx6.1 positive (Fig. 1B).

To examine the progeny of the unexpected FoxJ1⁺ progenitors during development, we first used FOXJ1::EGFP transgenic mice (Fig. 2A), in which the human FoxJ1 promoter drives expression of enhanced green fluorescence protein that can be used as a short-term lineage tracing tool due to the relatively longer half-life of EGFP than FoxJ1 [27]. We confirmed that the progenitors expressing EGFP⁺ from the human FoxJ1 promoter do indeed express FoxJ1 protein (Fig. 1C-F). Subsets of EGFP⁺ FoxJ1 lineage cells were observed in the grey matter and floor plate during early development (E10.5–E14.5) and were found in the ventricular zone, floor plate, and ventral-lateral grey matter between E15.5 and E16.5, when ependymal cells first originate in the spinal cord [20]. EGFP⁺ cells reached their highest number during late gestation (E17.5), when they also appeared in the dorsal white matter. Early postnatally (P2), the number of EGFP⁺ cells decreased dramatically in all regions except for the central canal, which is then surrounded by mature ependymal cells. By P10, EGFP expression was strictly limited to central canal ependymal cells (Fig. 3A). Quantification of EGFP⁺ cells confirmed these observations (Fig. 3B-E), and further revealed heterogeneity in the distribution of FoxJ1 lineage cells along the rostral-caudal axis of the spinal cord (cervical, thoracic and lumbar regions) (Fig. 3B-E). We summarize the spatiotemporal distribution of EGFP⁺ cells in the developing spinal cord of the FOXJ1::EGFP mice in the schematic (Fig. 3F).

3.1.1. FoxJ1⁺ progenitors give rise to a subset of V1 and V2 interneurons during neurogenesis in the spinal cord

We next identified and quantified the cell types showing FoxJ1 promoter activity by immunofluorescence. During early development (E10.5–E13.5), EGFP signal was detected in interneurons expressing the pan-interneuron marker PAX2 (Fig. 4A-C). Interneurons express subtype-specific markers in the medial-lateral homeodomains at the ventricle of the spinal cord during early development [1]. In FOXJ1::EGFP



(caption on next page)

Fig. 1. Endogenous FoxJ1 is expressed by neural progenitor cells during development. A) Representative confocal images of coronal sections of the developing spinal cord from WT mice at the indicated embryonic and postnatal developmental stages. Endogenous FoxJ1 is observed by IHC beginning at E13 around the ventricular zone and gradually restricted to the central canal during development. Dashed lines indicate the ventricular zone/central canal, coupled with the Vmt + cells in the circled area. B) Representative confocal images of coronal sections of E13 spinal cord from WT mice. All endogenous FoxJ1 expressing cells are co-labeled with interneuron progenitor marker Nkx6.1 during spinal cord neurogenesis. C-D) Representative confocal images of coronal sections of E17 spinal cord from the FOXJ1::EGFP (C) and FOXJ1-CreER^{T2}-YFP mice (D). E-F) All human FoxJ1 promoter active cells around the ventricular zone are positive for endogenous FoxJ1 staining. Scale bars: 25 μ m. E = Embryonic day after coitum. GFP indicates GFP staining for either EGFP+ cell or YFP+ cells in FOXJ1::EGFP (C) and FOXJ1-CreER^{T2}-YFP mice respectively.

mice, we found that EGFP was absent from V0 interneurons (EVX1 +), present in a limited number of V2 interneurons (Chx10 +) (Fig. 4D-F), and absent from the Olig2-expressing motor neuron (pMN) domain (Fig. 4G). EGFP + interneurons are already post-mitotic at E10.5 and in our experimental paradigm we observed that they did not express the proliferation marker Ki67 (Fig. 4H). Thus, we conclude that most progeny of FoxJ1 + progenitors are V1 interneurons and a small subset are V2 interneurons.

3.1.2. FoxJ1 + progenitors give rise to subpopulations of dorsal and lateral astrocytes but not to oligodendrocytes during gliogenesis in the developing spinal cord

We further characterized the EGFP⁺ cells in the dorsal and lateral areas of the spinal cord (Fig. 5A). Immunostaining showed that subsets of lateral and dorsal EGFP + cells expressed astrocyte progenitor markers such as Vimentin, Sox9 and GFAP, (Fig. 5B-E, N-Q, R, U), suggesting that they are derived from FoxJ1 + progenitors during the peak of the gliogenesis period (E15.5–E17.5). There is little knowledge about the developmental origin of spinal cord astrocytes, but previous studies have shown that astrocytes derived from lateral ventricular zone progenitors migrate horizontally towards the lateral white matter [15]. In agreement, we found a similar pattern of localization of EGFP + astrocytes in the lateral white matter. As early as E13.5, a small subset (around 20%) of EGFP + lateral astrocytes expressed Reelin and Pax6, and this co-expression increased later on (reaching around 40%) (Fig. 5 F-G, J-K, R-S).

Interestingly, we found that another subset of EGFP + astrocytes

migrates from the dorsal apical domain of the ventricular zone to the dorsal funiculi of the spinal cord. EGFP + lateral astrocytes appear at E13.5, while the EGFP + dorsal astrocytes appear at E15.5. The dorsal population is smaller than the lateral astrocyte population (Fig. 5H-I, L-M, T-U). EGFP + astrocytes were no longer detectable postnatally (Fig. 5S-T). EGFP + cells did not co-stain with oligodendrocyte lineage markers such as Olig2 and Sox10 at late developmental stages E17.5 (Fig. 5V-Y). Together, our observations indicate that FoxJ1 is expressed in progenitors that later give rise to astrocytes, suggesting a potential role in the development and/or migration of specific astrocyte populations during embryogenesis.

3.1.3. FoxJ1 + progenitors give rise to ependymal cells and floor plate progenitors

EGFP + cells were observed surrounding the central canal and in the floor plate. Consistent with our previous study [20], we found that the first EGFP + ependymal cells appeared at E15.5 and highly expressed Vimentin and Sox9. The co-expression of these markers with GFP increased during development and reached almost 100% postnatally around the central canal (Fig. 6B,C,F,G). On the other hand, EGFP + at the floor plate cells displayed a high expression of progenitor markers, such as Vimentin, and an oscillating Sox9 expression pattern (Fig. 6D,E,H,I). Interestingly, FoxJ1 lineage cells showed differing levels of proliferation in these regions of the developing spinal cord (Fig. 6J-M).

Together, our data indicate that the FoxJ1 + progenitors give rise to multiple neural cell types during the neurogenic and gliogenic periods

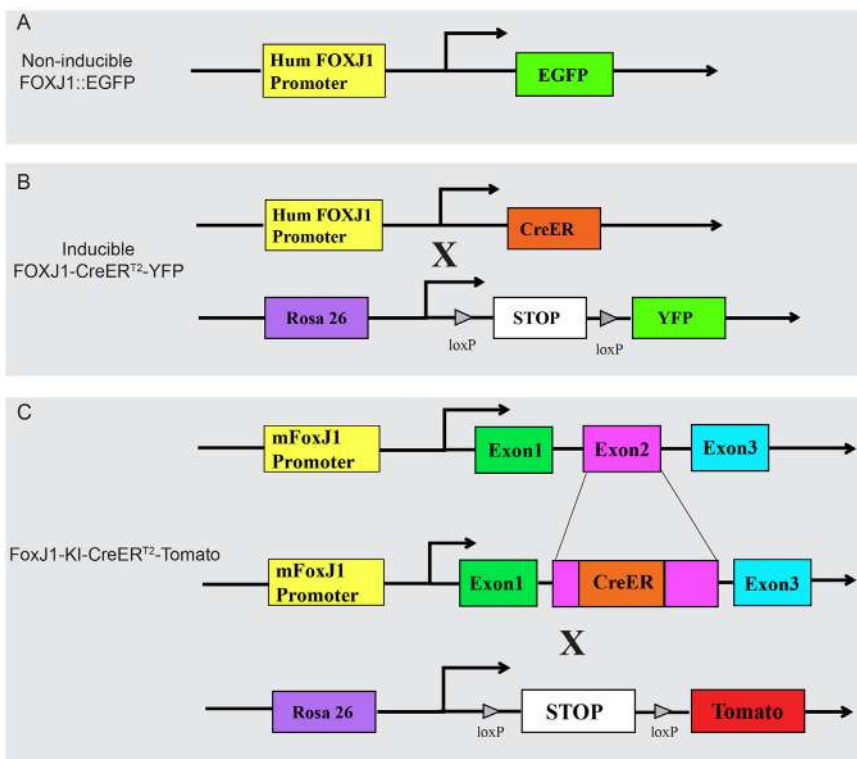


Fig. 2. Schematic summary of transgenic lines used in this study. Schematic illustration of the three different transgenic mouse models used, including A) non-inducible FOXJ1::EGFP [27] for short-time lineage tracing, B) tamoxifen-inducible FOXJ1-CreER^{T2}-YFP [23] for long-term lineage tracing and C) FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato mice. In the latter model (C), the CreER sequence is knocked into the FoxJ1 locus resulting in loss of expression of the interrupted FoxJ1 gene (knock in -KI) [26].

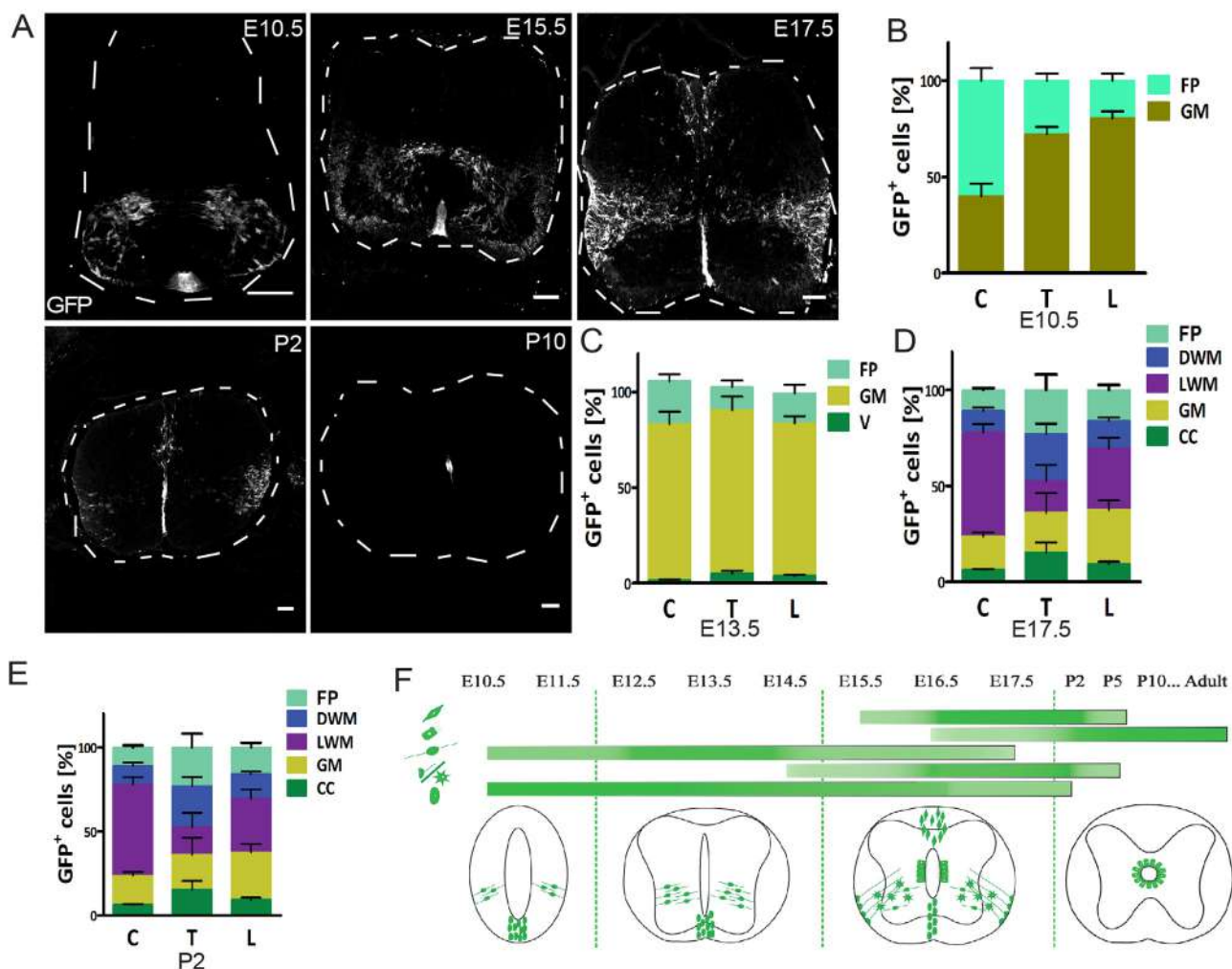


Fig. 3. Spatiotemporal distribution of FoxJ1 lineage cells in the developing spinal cord. A) Representative confocal images of coronal sections of the developing spinal cord from the FOXJ1::EGFP mice at the indicated embryonic and postnatal developmental stages. B-E) Quantification of GFP⁺ cells at E10.5 (B), E13.5 (C), E17.5 (D), and P2 (E) by region of interest. F) Summary schematic of the spatio-temporal distribution of GFP⁺ cells in the embryonic and postnatal developing spinal cord. GFP indicates GFP staining for either EGFP⁺ cell or YFP⁺ cells in FOXJ1::EGFP (C) and FOXJ1-CreER^{T2}-YFP mice respectively. Dashed lines indicate the outline of the spinal cords. Scale bars: 50 μ m. Quantifications are reported as percentage and ratio between the analyzed regions. Quantification are reported as average + SEM. N = 3–4 animals per developmental stage. E = Embryonic day after coitum; P = Postnatal day after birth; FP = Floor Plate; GM = Grey Matter; V = Ventricle; DWM = Dorsal White Matter; LWM = Lateral White Matter; CC = Central Canal; C = Cervical spinal cord; T = Thoracic spinal cord; L = Lumbar spinal cord.

of spinal cord development (summarized in Fig. 11), representing a potentially useful marker and tool for further study of the developmental origin and function of these cell types.

3.2. FoxJ1 is involved in progenitor proliferation in the developing spinal cord

To shed light on the functional roles of FoxJ1 during spinal cord development, we took advantage of two additional mouse lines. First, FOXJ1-CreER^{T2}-YFP transgenic mice, in which the same human FOXJ1 promoter is used to drive expression of CreER^{T2} in these mice, both alleles of the endogenous mouse FoxJ1 gene are intact. Second, FoxJ1 knock-in (KI) mice, in which an exon of the endogenous mouse FoxJ1 gene has been replaced by CreER^{T2}, effectively knocking out the FoxJ1 allele (FoxJ1-KI-CreER^{T2}, Fig. 2C); upon crossing these FoxJ1-KI-CreER^{T2} mice with a floxed reporter strain (in this case, ROSA26-CAG-TdTomato reporter mice), the fate of cells in which at least one of the FoxJ1 alleles has been knocked out can be mapped [26]. Notably, immunostaining for the FoxJ1 protein showed that 100% of reporter-expressing ventricular zone/ central canal cells in all three mouse lines

expressed FoxJ1, indicating that the human FOXJ1 promoter is not ectopically expressed in this area (Fig. 1C-D, Fig. 7B).

Tamoxifen was administered to pregnant FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato mice at either E10.5, E11.5, E13.5 or E15.5 for two days, and the embryos analyzed one day later. Immunostaining for endogenous FoxJ1 protein revealed that endogenous FoxJ1⁺ cells decreased dramatically in both the FoxJ1^{+/+} and FoxJ1^{-/-} offspring (Fig. 7B-E), indicating that FoxJ1 protein levels are not compensated in FoxJ1^{+/+} cells by the remaining allele. Importantly, we observed that the distribution of the TdTomato⁺ FoxJ1 lineage cells was markedly altered, with recombined cells found only surrounding the central canal and floor plate, but not within the parenchyma (Fig. 7F-I). In contrast, when this experiment was repeated using the FOXJ1-CreER^{T2} transgenic mouse line crossed with YFP reporter mice (FOXJ1-CreER^{T2}-YFP mice), in which both of the foxj1 alleles are intact, we found that tamoxifen-induced recombination closely mirrored what had been seen in FOXJ1::EGFP mice (Fig. 7F-G). Since the genetic background and the tamoxifen treatments are identical between the FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato and the FOXJ1-CreER^{T2}-YFP mouse lines used in this study, the more than five-fold difference observed in the number of recombined

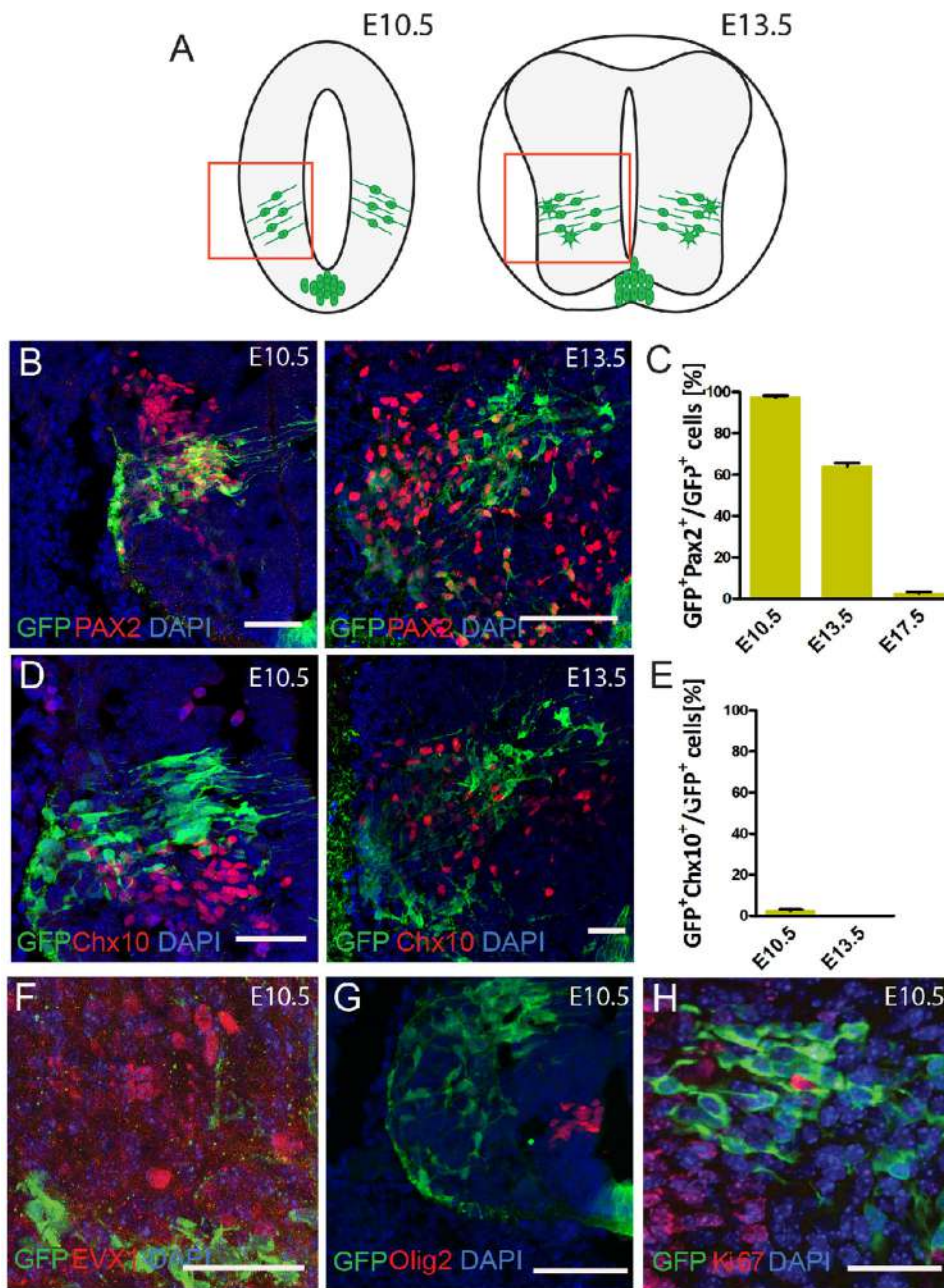


Fig. 4. Subtypes of interneurons are derived from FoxJ1 + progenitors in the developing spinal cord during the neurogenesis period. A) Schematics of the embryonic developing spinal cord at the indicated stages. Red squares highlight the analyzed regions of interest. B, D, F-H) Representative confocal images of coronal sections of the developing spinal cord from the FOXJ1::EGFP mice immunostained for PAX2 (B), Chx10 (D), EVX1 (F), Olig2 (G) or Ki67 (H) at the indicated embryonic developmental stages. Scale bars: 25 μ m. C, E) Quantification of double positive GFP⁺ cells in the analyzed regions of the spinal cord at the developmental stages indicated in the graphs. Quantifications are expressed as average + SEM. N = 3 animals per analyzed time point and per marker staining. GFP indicates GFP staining for either EGFP + cell or YFP + cells in FOXJ1::EGFP (C) and FOXJ1-CreER^{T2}-YFP mice respectively.

cells around the developing central canal appears to be due to differences in the behavior of the recombined cells (Fig. 7G-H, I).

Comparison of Ki67 expression in FOXJ1-CreER^{T2}-YFP (i.e., FoxJ1^{+/+}) and FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato (i.e., FoxJ1^{+/-} and FoxJ1^{-/-}) mice further showed a significantly reduced proliferation of reporter + cells in mice deficient in FoxJ1 expression. Analysis of Ki67 expression during the neurogenic E13.5 period showed that the ratio of FoxJ1 lineage cells with proliferation capacity is significantly lower in both FoxJ1^{+/-} and FoxJ1^{-/-} embryos. However, by the mid-late embryonic gliogenic period, FoxJ1 lineage cells no longer showed a significant difference in proliferation between groups (Fig. 7M), suggesting that FoxJ1 is more implicated in proliferation of the earlier progenitor population. Thus, consistent with a previous study showing the involvement of FoxJ1 in progenitor proliferation and differentiation in the developing brain [16,17], we suggest that FoxJ1 is required for the proliferation and subsequent migration of at least a portion of FoxJ1 + progenitors during spinal cord development (Figs. 11–12).

3.3. FoxJ1 is required for maintaining the progenitor properties of spinal cord progenitors

It has been shown that FoxJ1 is required for ependymal cell differentiation in the developing brain [16,17]. To further characterize the role of FoxJ1 during cell fate specification in the developing spinal cord, we quantified the ratio of various markers expressed by reporter-positive cells in both FOXJ1-CreER^{T2}-YFP and FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato mice. This revealed that FoxJ1 deletion was associated with a statistically significant (more than three-fold) reduction in reporter-positive cells expressing the progenitor markers Sox9 and Vimentin around the central canal (Fig. 8 A-C, F-G). These FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato cells showed a significant upregulation of the pan-interneuron marker Pax2 (Fig. 8 D and H), but did not express astrocytic or oligodendrocytic markers (Fig. 8J-L). Interestingly, despite upregulating Pax2, these cells did not co-express other neuronal marker such as Chx 10 (Fig. 8I) or the mature neuronal marker NeuN (Fig. 8E). These results suggest that the deletion of FoxJ1 (one or both alleles) in

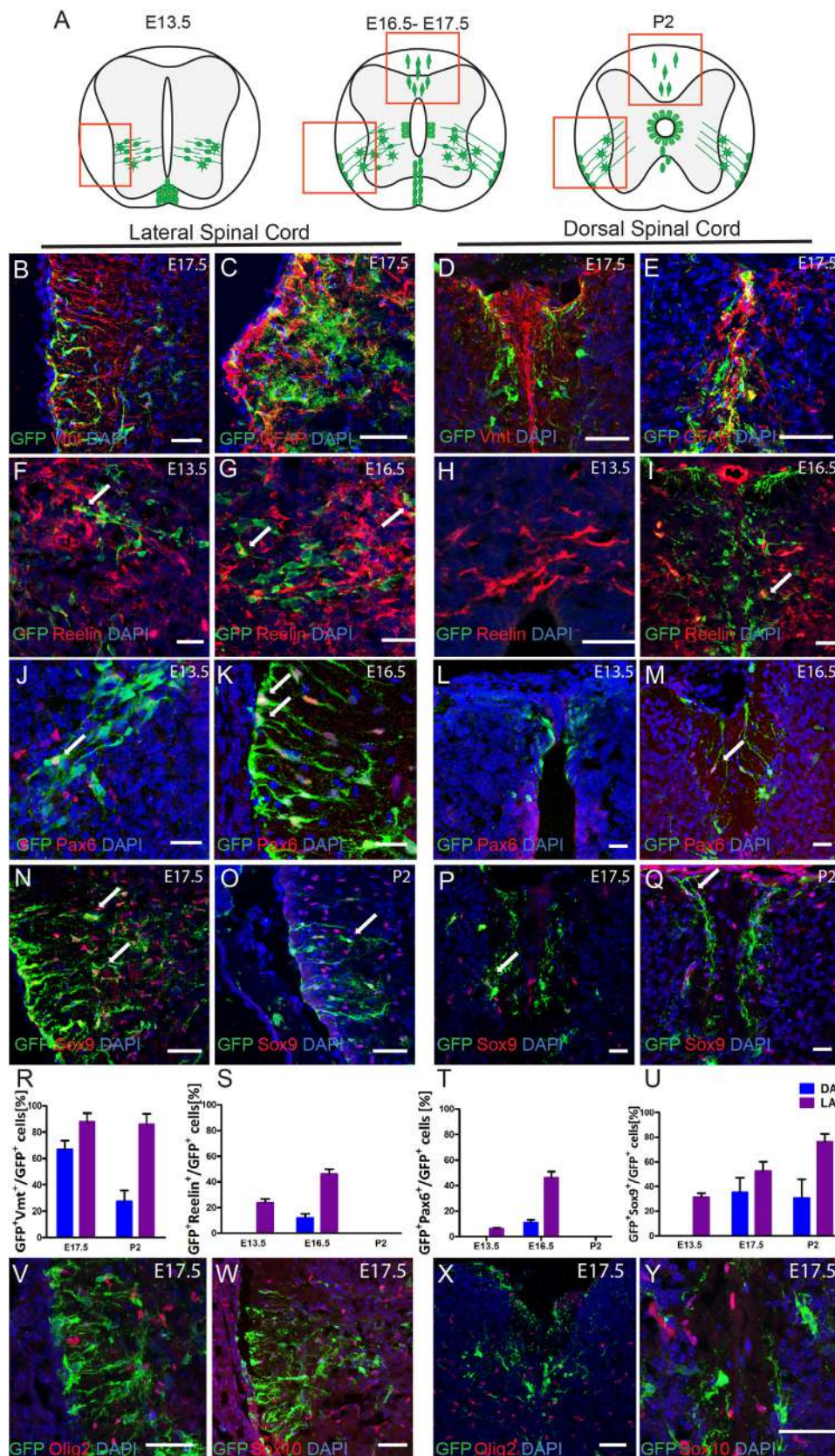


Fig. 5. FoxJ1 lineage cells contribute to heterogeneous populations of astrocytes during gliogenesis in the developing spinal cord. A) Schematics of the embryonic and postnatal developing spinal cord at the indicated stages. Red squares highlight the analyzed regions of interest. B-Q) Representative confocal images of coronal sections of the developing spinal cord from the FOXJ1::EGFP mice immunostained for Vimentin (B, D), GFAP (C, E), reelin (F-I), Pax6 (J-M) or Sox9 (N-Q) at the indicated embryonic and postnatal developmental stages. Scale bar: 25 μ m. R-U) Quantification of double positive GFP⁺ cells in the regions of interest of the spinal cord at the developmental stages indicated in the graphs, including Vimentin, reelin, Pax6 or Sox9. GFP indicates GFP staining for either EGFP⁺ cell or YFP⁺ cells in FOXJ1::EGFP (C) and FOXJ1-CreER^{T2}-YFP mice respectively. V-Y) Representative confocal images of coronal sections of the developing spinal cord from the FOXJ1::EGFP mice immunostained for Olig2 (V, X) and Sox10 (W, Y) in the lateral and dorsal area at E17. Quantifications are expressed as average + SEM. N = 3 animals per analyzed time point and marker staining. DA = Dorsal Astrocytes; LA = Lateral Astrocytes; Vmt = Vimentin.

progenitor cells leads these cells to prematurely exit from their proliferating phase, increases their neurogenic lineage specification, but is not sufficient to allow them to mature or terminally differentiate.

Since previous studies indicate that at least a subpopulation of

spinal cord ependymal cells retain stem/progenitor properties during adulthood ([23]; Barnabe-Heider et al. [3]; [20]), we further studied whether FoxJ1 gene deletion impacts these properties. Neurospheres are self-renewing and multipotent colonies that illustrate the presence

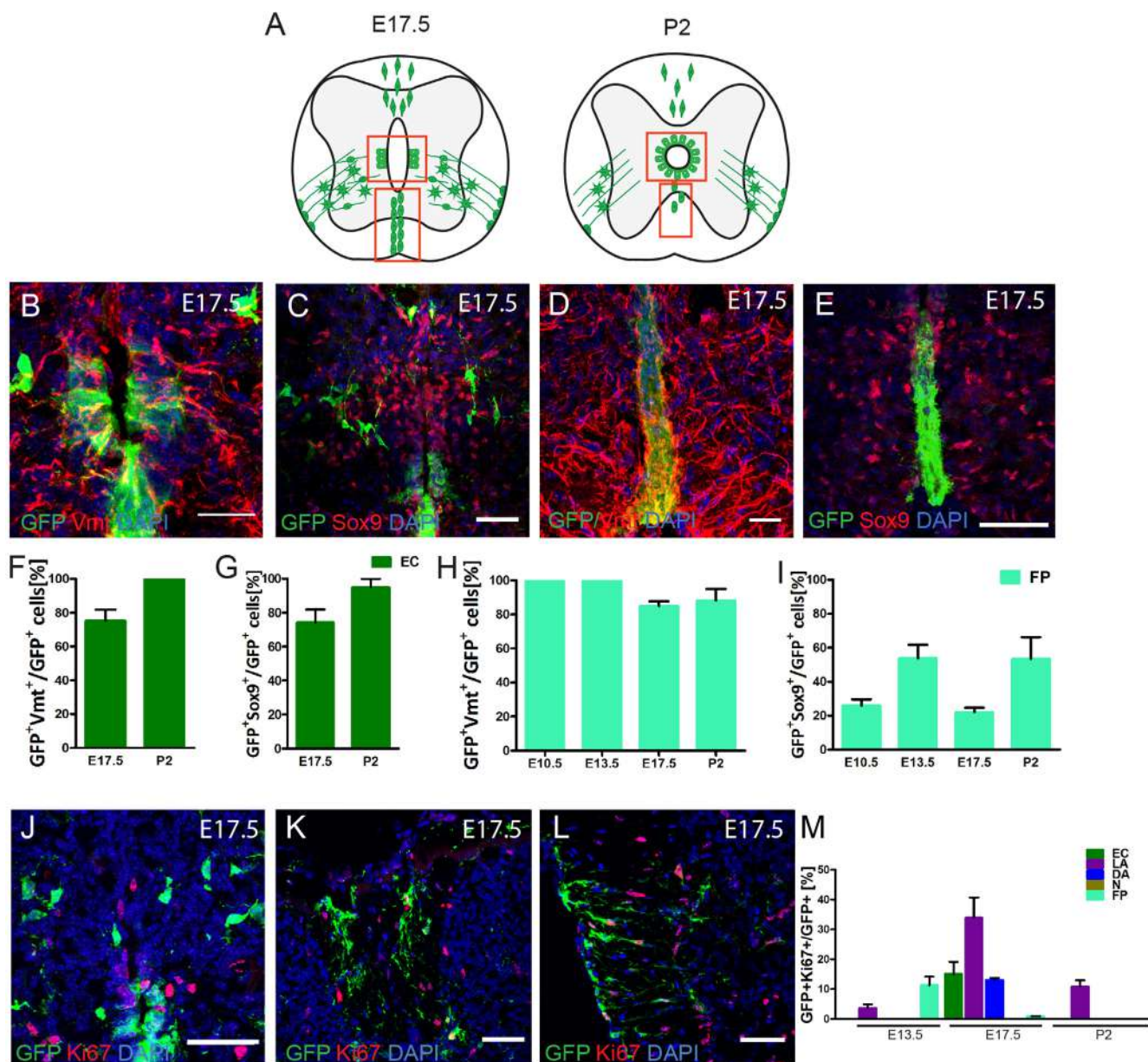


Fig. 6. Ependymal and floor plate cells but not oligodendrocytes are derived from FoxJ1 progenitors and have varying proliferation levels in the developing spinal cord. A) Schematics of the embryonic developing spinal cord at the indicated stages. Red squares highlight the analyzed regions of interest. B-E) Representative confocal images of coronal sections of the developing spinal cord from the FOXJ1::EGFP mice immunostained for Vimentin (B, D), or Sox9 (C, E) at the indicated embryonic stages. Scale bars: 25 μ m. F-I) Quantification of double positive GFP⁺ cells in the regions of interest at the developmental stages indicated in the graphs. J-L) Representative confocal images of coronal sections of the developing spinal cord from the FOXJ1::EGFP mice immunostained for Ki67 in central canal, dorsal funiculus white matter and lateral white matter respectively. Scale bars: 25 μ m. M) Quantification of proliferating GFP⁺ cells in different regions the spinal cord at the developmental stages indicated in the graphs. GFP indicates GFP staining for either EGFP⁺ cell or YFP⁺ cells in FOXJ1::EGFP (C) and FOXJ1-CreER^{T2}-YFP mice respectively. Quantifications are expressed as average + SEM. N = 3–4 animals per analyzed time point and immunostaining. E = Embryonic day; P = Postnatal day after birth; EC = Ependymal cells; FP = Floor Plate.

of cells having stem/progenitor potential, and by P10, neurosphere formation from the spinal cord is restricted to FoxJ1-expressing cells [20]. After tamoxifen administration to dams of FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTtomato and FOXJ1-CreER^{T2}-YFP pups (P5-P9), pups were sacrificed at P10 and their spinal cords dissociated to generate primary neurosphere cultures (Fig. 9A). Since homozygous FoxJ1 knockout leads to perinatal lethality [26], only FoxJ1^{+/-} P10 pups could be obtained for this set of experiments. For each animal, we compared the ratio of neurospheres that were recombined *in vitro* to the ratio of central canal ependymal cells that were recombined *in vivo*. Consistent with our previous study [20], this ratio was approximately equal in FOXJ1-CreER^{T2}-YFP mice, indicating that all recombined ependymal cells *in*

in vivo can give rise to recombined neurospheres. In the FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTTomato mice, however, this significantly declined (Fig. 9A-B). Performing the same experiment with adult spinal cords, we observed similar results (Fig. 9C). These data suggest that the loss of one copy gene of FoxJ1 diminishes the stem/progenitor potential of ependymal cells, but did not promote a new stem cell niche as all the neurospheres that survived during passages were still derived from FoxJ1 lineage (Fig. 9D-E). Notably, examination of the total numbers of neurospheres (recombined and non-recombined) in WT (FoxJ1^{+/+}), FOXJ1-CreER^{T2}-YFP (FoxJ1^{+/+}) mice, and FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTTomato mice (FoxJ1^{+/-}) at P10 supports that this diminished potential is unrelated to differences in recombination-related factors (Fig. 9F). While WT and

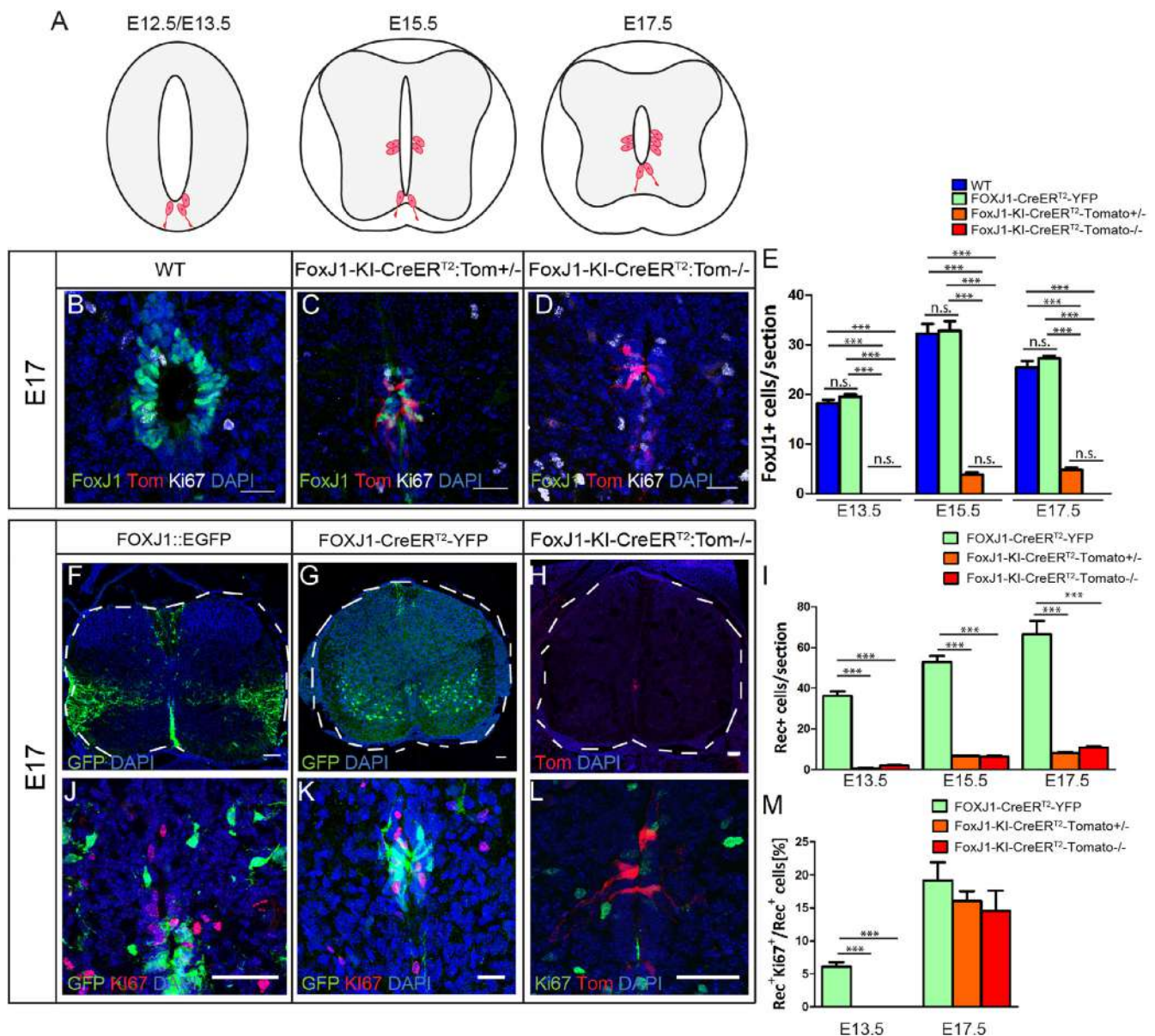


Fig. 7. FoxJ1 is required for normal proliferation of FoxJ1 lineage cells in the developing spinal cord. A) Schematics of the FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato embryos during spinal cord development at the indicated stages. B-D) Representative confocal images of coronal sections of the developing spinal cord from indicated genotypes of FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato embryos immunostained for FoxJ1 antibody at E17.5. E) Quantification of endogenous FoxJ1+ cells around the ventricular zone/central canal in the spinal cord at the developmental stages in WT, heterogeneous and homogenous knock-in mice of FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato line. F-H) Representative confocal images of coronal sections of FoxJ1 lineage cells in the developing spinal cord from indicated mouse lines at E17.5. I) Quantification of the ratio of the total number of reporter+ cells in FOXJ1-CreER^{T2}-YFP compared to FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato mice. J-L) Representative confocal images of coronal sections of embryonic spinal cord stained for Ki67. M) Quantification of the ratio of the total number of reporter+ Ki67+ cells in FOXJ1-CreER^{T2}-YFP compared to FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato mice. Dash lines indicate the coronal sectioned spinal cord. Scale bars: 25 μ m. n.s. = no significance. Quantifications are expressed as average + SEM. N = 3–4 animals per analyzed time point and marker staining.

FOXJ1-CreER^{T2}-YFP cultures generated equal numbers of total neurospheres, FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato cultures yielded significantly fewer neurospheres, and this decrease was maintained during passaging.

Differentiation of the P10 and adult primary neurospheres obtained in the above experiments also revealed that the FoxJ1^{+/-} neurospheres generated from FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato mice have an altered differentiation potential, producing significantly more neurons (Tuj1⁺) and fewer oligodendrocytes (CNPase⁺) and astrocytes (Sox9⁺) compared to both WT and FOXJ1-CreER^{T2}-YFP mice. This is consistent with our *in vivo* quantifications that indicated that FoxJ1 deletion promotes cell fate specification towards the neurogenic lineage (Fig. 9 G-I).

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

Using the FOXJ1-CreER^{T2} lineage-tracing model, ependymal cells have been shown to be the source of neurosphere-forming stem cells in the adult spinal cord, and to respond robustly following spinal cord injury (SCI) [20,23,3,32]. However, the contribution of ependymal cells to SCI has been recently challenged in a study using the FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato lineage tracing model [30]. Since we observed here that both alleles of the FoxJ1 gene are required for the normal proliferation of progenitor cells, maintenance of stem/progenitor potential, and cell fate determination under normal physiological conditions (Figs. 7–9), we performed a side-by-side comparison of the ependymal

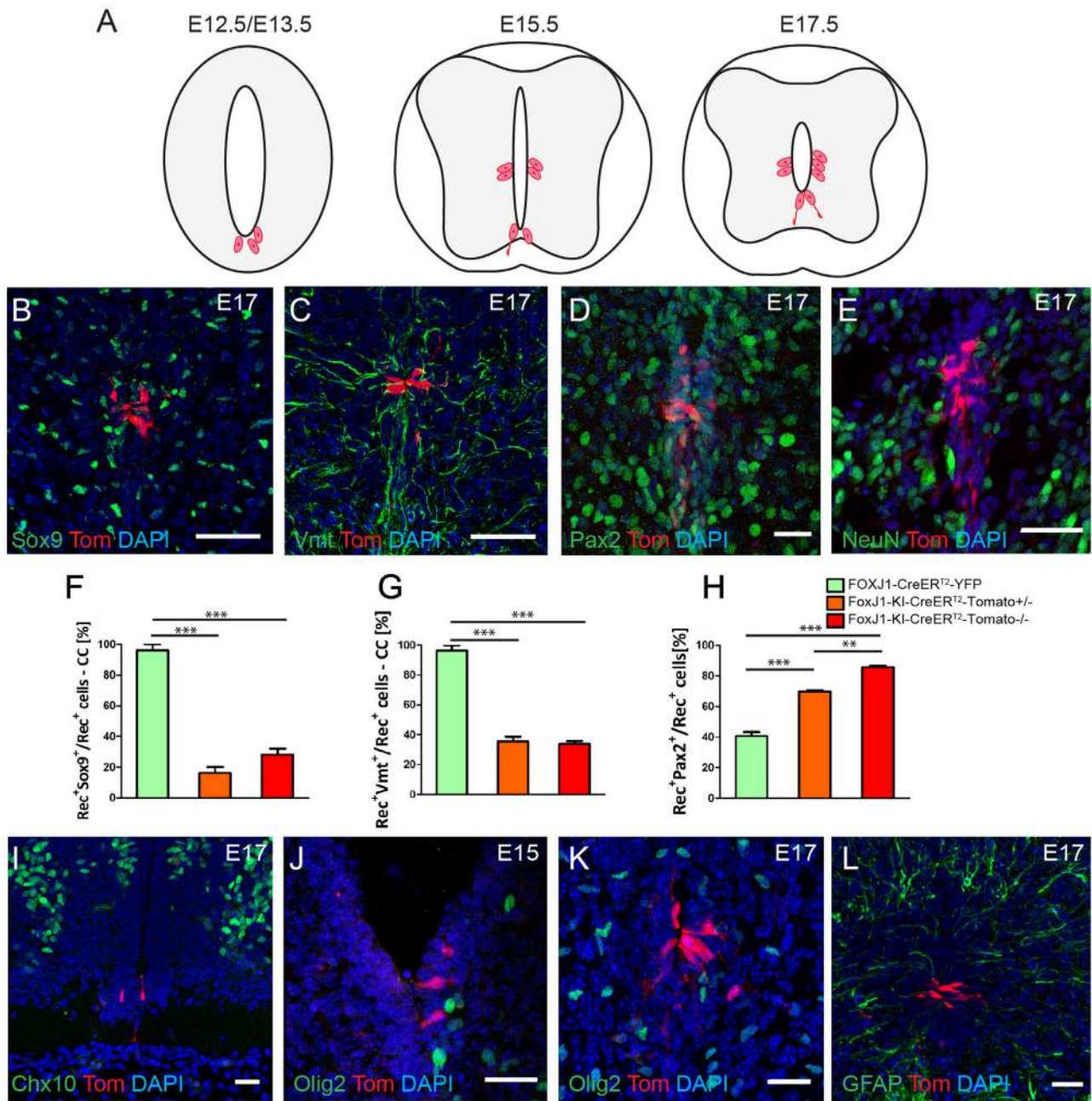


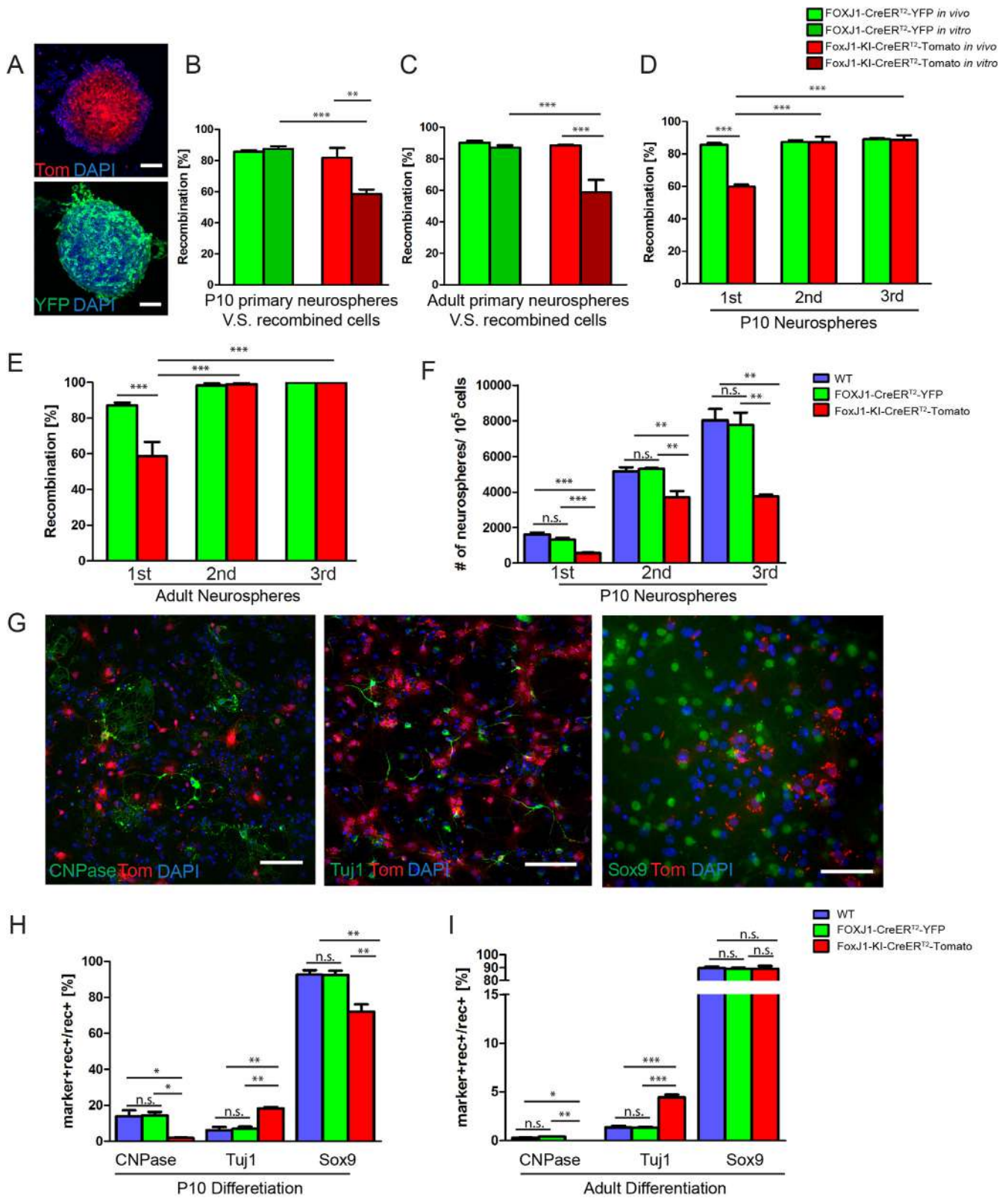
Fig. 8. FoxJ1 is required for the maintenance and differentiation of FoxJ1 progenitors in the developing spinal cord. A) Schematics of the FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomo embryos during spinal cord development at the indicated stages. B-E) Representative confocal images of FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomo ventricular zone of E17.5 spinal cord immunostained for Sox9 (B), Vimentin (C), Pax2 (D) or NeuN (E). F-H) Quantification of marker and reporter double positive progenitor cells around the central canal or the spinal cord in FOXJ1-CreER^{T2}-YFP and FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomo mice at the developmental stages indicated in the graphs, for the markers Sox9 (F), Vimentin (G), or Pax2 (H). I-L) Representative confocal images of FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomo ventricular zone of spinal cord at indicated timepoints immunostained but not co-labeled with reporter⁺ cells for Chx10 (I), Olig2 (J-K), or GFAP (L). CC = central canal. Tom = TdTomo. Vmt = Vimentin. Quantifications are expressed as average + SEM. N = 3–4 animals per analyzed time point and marker staining.

cell response to spinal cord injury (SCI) in the FOXJ1-CreER^{T2}-YFP and FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomo mouse models [20,23,30,3,32].

Adult FOXJ1-CreER^{T2}-YFP and FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomo mice received tamoxifen injections for 5 days to pre-label the central canal ependymal cells, and after an additional 7-day clearing period, were subjected to a mild dorsal funiculus lesion (Fig. 10A). One week after SCI, ependymal cells were found to have migrated to the lesion site in FOXJ1-CreER^{T2}-YFP mice while only few ependymal cells migrated in FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomo mice (43% versus 18%, respectively; Fig. 10 B-C), which is consistent with the divergent findings of previous studies [23,30,3]. Quantification of the *in vivo* and *in vitro*

recombination rates in FOXJ1-CreER^{T2}-YFP and FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomo mice showed that, as in the absence of injury, the FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomo mice had a reduced proportion of recombined ependymal cells that were capable of neurosphere formation (Fig. 10 D). Moreover, neurospheres from FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomo mice exhibited lower oligodendrocytic and higher neurogenic differentiation potential compared to WT and FOXJ1-CreER^{T2}-YFP cultures (Fig. 10 E-J). These findings indicate that FoxJ1 is critical for normal ependymal self-renewal capacity, glial-neuronal differentiation potential, and migration under both physiological conditions and after SCI.

Notably, FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomo mice showed a striking defect



(caption on next page)

Fig. 9. FoxJ1 is required for maintaining stem cell potential of the spinal cord.

A) Representative confocal images of neurospheres derived from FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato (FoxJ1^{+/-}, upper panel) and FOXJ1-CreER^{T2}-YFP P10 spinal cords (lower panel). B-C) Quantification of *in vivo* recombined FoxJ1⁺ cells and *in vitro* recombined neurospheres from FOXJ1-CreER^{T2}-YFP and FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato mice generated from P10 (B) and adult mice (C). D-E) Quantification of the percentage of recombined neurospheres over passages from FOXJ1-CreER^{T2}-YFP and FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato from P10 (D) and adult mice (E). F) Quantification of the total number of neurospheres derived from 100,000 cells over passages from WT mice, FOXJ1-CreER^{T2}-YFP and FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato mice at P10, regardless of recombination. G) Representative confocal images of differentiated cells derived from neurospheres from FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato P10 mice. H-I) Quantification of differentiated cells generated from primary neurospheres of P10 (H) and adult (I) FOXJ1-CreER^{T2}-YFP and FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato mice. Scale bars: 100 μm. TdTom = TdTomato. CNPase = 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase. TuJ1 = beta III Tubulin. Quantifications are expressed as average + SEM. n.s. = no significance. N = 3–4 animals per analyzed time point and marker staining, where at least two batches of independent culture experiments were performed.

in injury-induced spinal cord stem/progenitor activity that was independent of recombination-associated factors. When we quantified the total numbers of neurospheres (both recombined and non-recombined) in these mouse models, WT and FOXJ1-CreER^{T2}-YFP mice showed SCI-induced increases in neurosphere numbers while the FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato mice with one less copy of FoxJ1 had significantly fewer neurospheres under both control and SCI conditions, and failed to exhibit any SCI-induced increase (Fig. 10 K). We conclude that even though FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato mice could be useful to lineage trace FoxJ1-expressing cells in other organs without causing a phenotype [26], both copies of FoxJ1 are required for the full expression of stem cell properties in the spinal cord after SCI.

4. Discussion

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

FoxJ1 has been widely studied for its role in ciliogenesis and has been regarded as one of the key transcription factors for cilium biogenesis [6]. In the adult spinal cord, FoxJ1 is specifically expressed by ependymal cells and is used as a specific marker for this cell population [23,3]. We have previously reported that the first FoxJ1⁺ ependymal cells appear at E15.5 in the mouse spinal cord [20].

Here we report that FoxJ1 is also transiently expressed in progenitors of other cell types in the developing spinal cord (summarized in Fig. 11). In the spinal cord, FoxJ1 progenitors appear earlier than ependymal cells, and give rise to V1 and a subset of V2 interneurons, and also subpopulations of astrocytes in the lateral white matter and the dorsal funiculus, as well as to ependymal cells around the central canal. Astrocytes constitute one of the most abundant cell populations in the spinal cord and are functionally heterogeneous [36], however our current understanding of their developmental origin is quite limited. A very elegant study reported that astrocyte progenitor cells migrate horizontally from the ventricular zone to the lateral white matter [15]. In accordance with and complementary to these findings, we observed a subset of astrocytes derived from FoxJ1 progenitors that migrate horizontally from a lateral domain and dorsally from the apical domain of the ventricular zone to the ventrolateral white matter and the dorsal funiculus, respectively. We suggest that FoxJ1 might be used as a novel marker for future study of different neural cell subtypes in the developing spinal cord (Fig. 12).

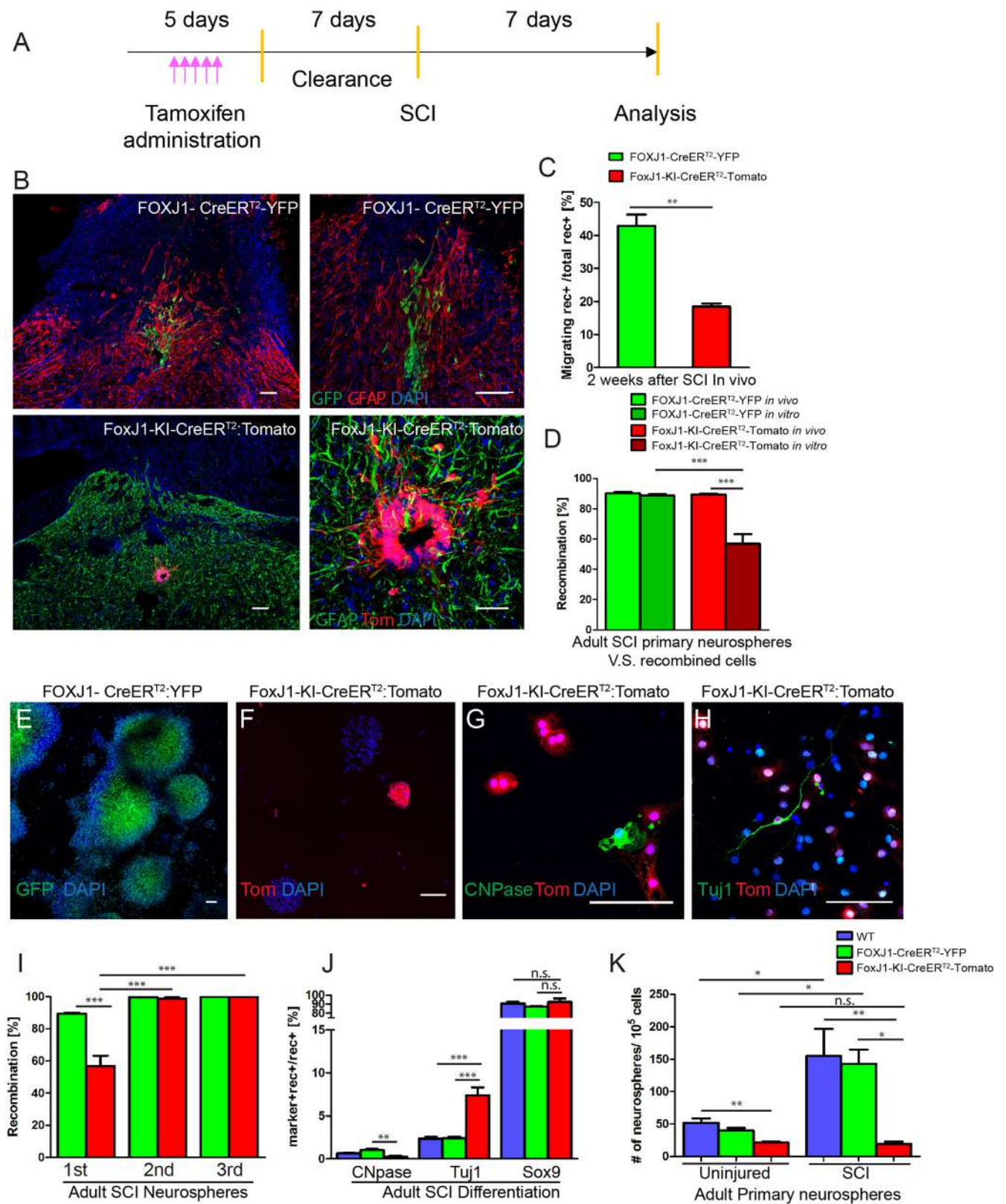
During development of the brain, FoxJ1 is involved in the migration and differentiation of progenitor cells towards the olfactory bulbs [16]. We observed that FoxJ1 might also be involved in migration of progenitor or stem cells in the developing spinal cord. Indeed, when we

deleted only one allele of FoxJ1, we observed a very limited number of FoxJ1^{+/-} cells that were all restricted to the ventricular zone/central canal.

After SCI, the progeny of FoxJ1^{+/-} ependymal cells also failed to migrate to the injury site. Therefore, the absence of FoxJ1 appears to prevent migration and proliferation of some progenitor cells, without development of major physiological impairments, such as hydrocephalous or dysplasia. Moreover, it has been shown that FoxJ1 is required for embryonic-to-postnatal transition during olfactory bulb neurogenesis [16]. As Pax2 has been used as an immature neuron/neuronal precursor marker [21,29,34], while NeuN is a specific marker for mature neurons maturation [22,24,37], we used these markers for immunostaining and found that deletion of FoxJ1 leads to a higher ratio of the PAX2⁺ interneurons from FoxJ1 lineage cells but decreased expression of the mature neuron marker NeuN. These results suggest that the deletion of FoxJ1 enhances the neurogenic potential of FoxJ1⁺ progenitors towards an interneuron fate, with reduced differentiation into fully mature neurons. Altogether, we suggest that FoxJ1 is involved in the regulation of proliferation and differentiation of different types of progenitor cells in the whole CNS. Interestingly, this is consistent with a recent study that showed similarly unexpected results after deletion of the transcription factor Prdm16, which is involved in neural stem cell maintenance and ciliogenesis. Prdm16 deletion at postnatal developmental stage results in no effect on ciliogenesis, but leads to down-regulation of FoxJ1 expression and upregulation of genes associated with neuronal differentiation that interfere with ependymal cell differentiation potential [33].

FoxJ1 has not been considered a pivotal transcription factor in stem cells, but we observed that FoxJ1 is important to preserve the stem cell potential of spinal cord ependymal cells. Indeed, we cultured FoxJ1^{+/+} and FoxJ1^{+/-} cells from P10 and adult mice, and in both ages and conditions, we observed that the loss of a single copy of the FoxJ1 gene leads to significantly reduced self-renewal of ependymal cells and fewer neurospheres. Previously, we described that the injury of the spinal cord enhances the self-renewal potential of spinal cord ependymal cells [20,23,3]. To test whether the injury could rescue the phenotype of the FoxJ1^{+/-} neurospheres, we put them in culture from the adult injured spinal cord, and again observed reduced self-renewal potential and diminished ability to generate neurospheres in culture, regardless of recombination, indicating a perturbed phenotype of stem and progenitor cell potential when one copy of FoxJ1 is lost. Thus, FoxJ1 is a key transcription factor for the maintenance of stem cell potential by spinal cord ependymal cells. Moreover, this is consistent with our *in vivo* data showing that the deletion of one FoxJ1 allele leads to failure of FoxJ1⁺ progenitor cell proliferation.

Our findings also shed light on a recent controversy regarding the contribution of ependymal cells to the glial response following SCI [30]. In that study, the authors used the FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato mouse model as a lineage-tracing tool for FoxJ1-expressing ependymal cells. Here, we likewise observed that ependymal cells in the FoxJ1-KI model are largely unresponsive to SCI, in marked contrast to ependymal cells in the FOXJ1-CreER^{T2}-YFP model used here and in our previous studies [20,23,30,3,32]. Importantly, here we show that the deletion of even one allele of the FoxJ1 gene leads to substantial effects on progenitor cell specification, maintenance of stem cell properties, and



(caption on next page)

Fig. 10. FoxJ1 is involved in the regulation of ependymal stem cell potential.

A) Schematics of tamoxifen administration and SCI to mice for analysis. B) Representative confocal images of adult spinal cord 2 weeks after SCI from FOXJ1-CreER^{T2}-YFP and FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato mice. C) Quantification of migrating recombined cells *in vivo* 2 weeks after SCI. D) Quantification of *in vivo* recombined reporter⁺ cells and *in vitro* recombined neurospheres from FOXJ1-CreER^{T2}-YFP and FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato adult injured mice. E-F) Representative confocal images of primary cultured recombined neurospheres from FOXJ1-CreER^{T2}-YFP and FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato adult injured mice. G-H) Representative confocal images of differentiated cells derived from recombined neurospheres from FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato adult injured mice. I) Quantification of the percentage of recombined neurospheres over passages from FOXJ1-CreER^{T2}-YFP and FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato adult mice after SCI. J) Quantification of differentiated cells generated from primary neurospheres of adult WT mice, recombined FOXJ1-CreER^{T2}-YFP mice and recombined FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato mice after SCI. K) Quantification of the number of primary neurospheres derived from 100,000 cells from WT mice and FOXJ1-CreER^{T2}-YFP and FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato adult mice after SCI, regardless of recombination. Scale bars: 200 μm (A) and 100 μm (E-H). Dashed lines indicate the lesion area. n.s. = no significance. TdTom = TdTomato. CNPase = 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase. TuJ1 = beta III Tubulin. Quantifications are expressed as average + SEM. N = 3–4 animals per analysis including at least two independent culture experiments were performed.

differentiation potential of ependymal cells compared to both WT and FOXJ1-CreER^{T2}-YFP neurospheres [20,3]. Given its use of the endogenous FoxJ1 promoter, the FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato mouse model has proven a useful tool to lineage trace FoxJ1-expressing cells in other organs [26]. Although we did not observe phenotypic changes in terms of breeding and behavior in the FoxJ1^{+/-} mice, our results

suggest that at least in the spinal cord, this model is sub-optimal for fate mapping aimed at characterizing the behavior of normal ependymal cells in physiological or pathological conditions.

In conclusion, we show that FoxJ1 is transiently expressed by progenitors of subsets of interneurons, astrocytes, ependymal, and floor plate cells of the developing spinal cord. Moreover, we report that

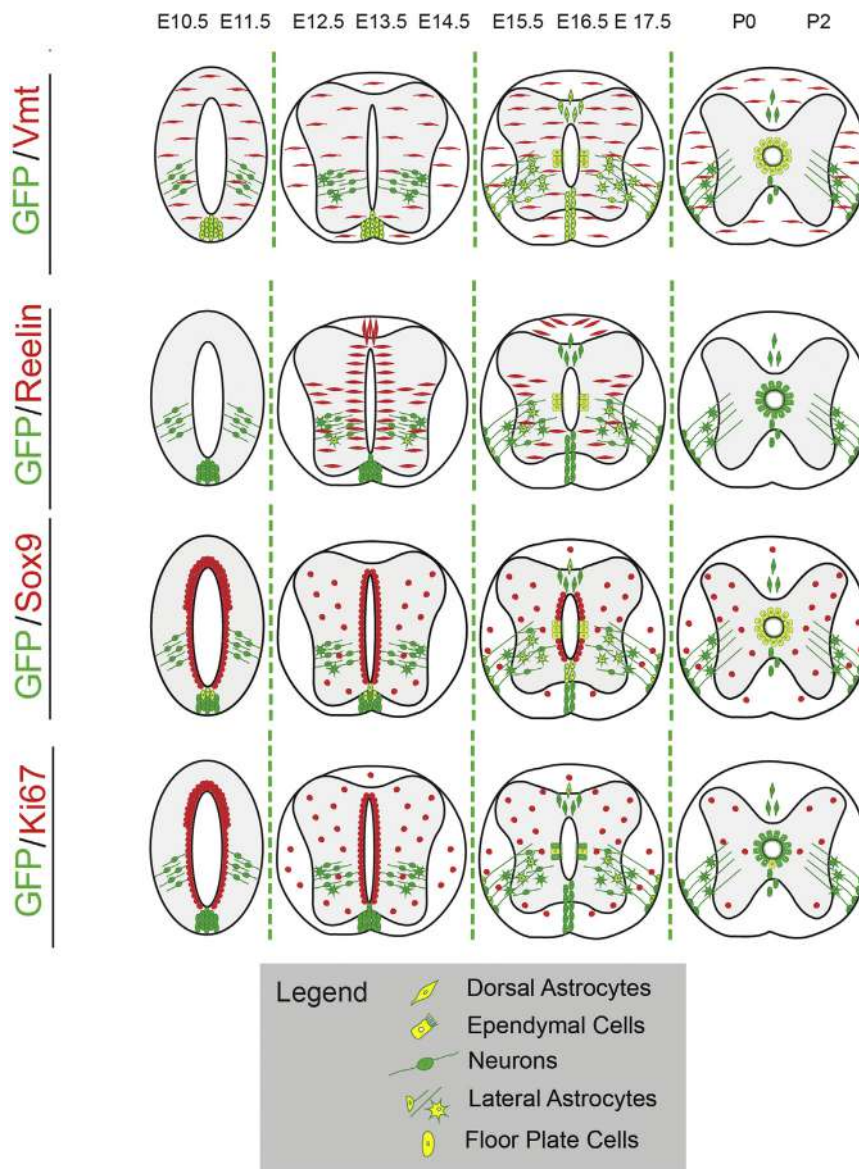


Fig. 11. Summary of distribution of FoxJ1 lineage cells during spinal cord development. Schematics of distribution of FoxJ1 lineage cells from E10.5 to P2 during development. Markers are used to co-label FoxJ1 lineage cells as progenitors (Vimentin and Sox9), a subset of astrocytes (Reelin) and proliferating cells (Ki67). Green cells = FoxJ1⁺ cells; red cells = marker⁺ cells; yellow cells = co-labeled cells.

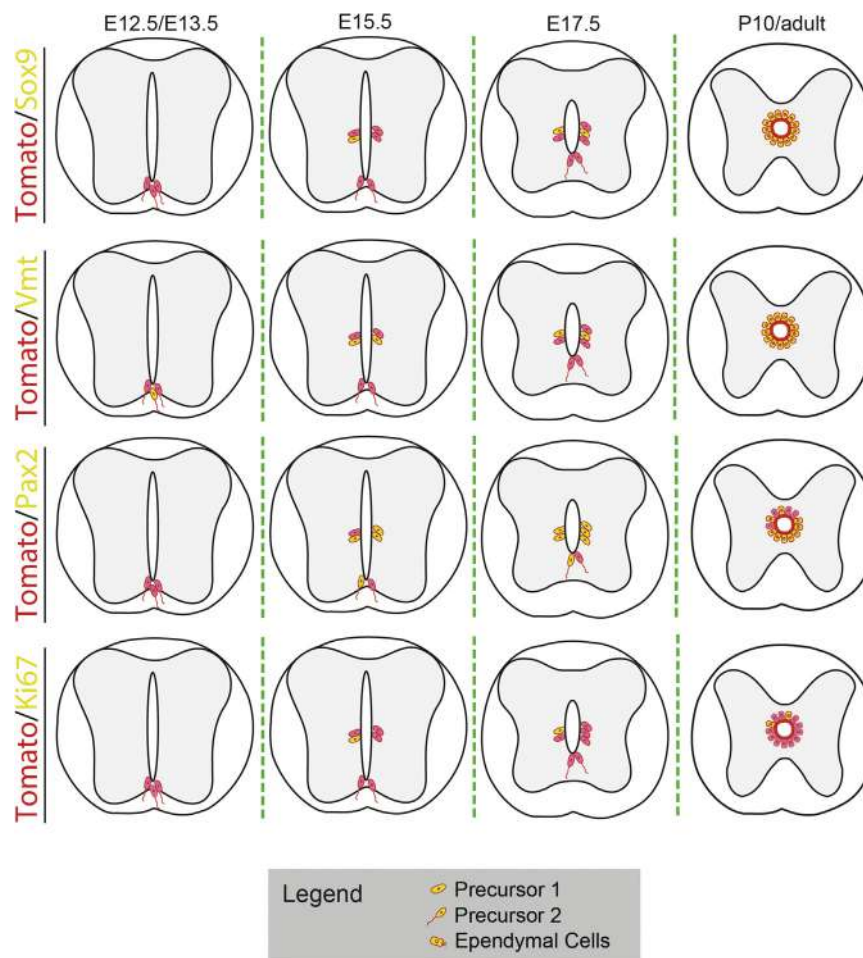


Fig. 12. Summary of distribution of FoxJ1 lineage cells with the deletion effects of FoxJ1 during spinal cord development. Schematics of the distribution of FoxJ1 lineage cells in FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato mice during development and the FoxJ1 knockout effects in this mouse line that leads to a dramatic reduction of FoxJ1⁺ cells and different cell fate of progenitors. Markers are used to label FoxJ1 lineage cells as progenitors (Vimentin and Sox9), interneurons (Pax2), and proliferating cells (Ki67). Red cells = Tomato⁺ cells; yellow cells = co-labeled cells.

FoxJ1 is not only involved in ciliogenesis, but also in proliferation and cell fate determination of distinct progenitor and stem cells and it is required for the maintenance of stem cell properties in ependymal cells during development, adulthood and after injury. Thus, our study expands our understanding of the role of FoxJ1 in the spinal cord. This paves the way for further studies on developmental and stem cell biology and the investigation of FoxJ1 as a potential therapeutic target.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Jonas Frisén for sharing the FOXJ1-CreER^{T2}-YFP transgenic mice line, Dr. H. Troy Ghashghaei for sharing the FoxJ1-KI-CreER^{T2}-TdTomato knock-in mouse line, Dr. Julien Bouvier for intellectual discussion and technical support, Dr. Alessandra Pierani for EVX1 antibody, Ms. Celia Duclos for technical support, and Dr. David Vaudry and Dr. Magali Basille for microdissection and qPCR trials and discussion.

Significance statement

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

cell type in the spinal cord retaining stem cell properties during adulthood and after spinal cord injury.

Funding sources

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

Conflicts of interest

We declare no conflict of interest.

Author contributions

F.B.H. and N.G. conceptualized the project. X.L., E.M.F., N.G., and F.B.H. designed the experiments.

X.L., E.M.F., K.T., A.A., C.C., A.X., N.V., and N.G. performed the experiments.

X.L., E.M.F., N.G. and F.B.H. analyzed the results.

S.L. and K.J.F. provided reagents, techniques and scientific input.

X.L., E.M.F., K.J.F., N.G. and F.B.H. wrote the article.

References

- [1] W.A. Alaynick, T.M. Jessell, S.L. Pfaff, SnapShot: spinal cord development, *Cell* 146 (2011) 178–178.e1.
- [2] M.A. Anderson, Y. Ao, M.V. Sofroniew, Heterogeneity of reactive astrocytes, *Neurosci. Lett.* 565 (2014) 23–29.
- [3] F. Barnabé-Heider, C. Göritz, H. Sabelström, H. Takebayashi, F.W. Pfrieger, K. Meletis, J. Frisén, Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord, *Cell Stem Cell* 7 (2010) 470–482.
- [4] O.A. Bayraktar, L.C. Fuentealba, A. Alvarez-Buylla, D.H. Rowitch, Astrocyte development and heterogeneity, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7 (2014) a020362.
- [5] F. Charron, M. Tessier-Lavigne, Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance, *Dev. Camb. Engl.* 132 (2005) 2251–2262.
- [6] S.P. Choksi, D. Babu, D. Lau, X. Yu, S. Roy, Systematic discovery of novel ciliary genes through functional genomics in the zebrafish, *Dev. Camb. Engl.* 141 (2014) 3410–3419.
- [7] D.E. Clevidence, D.G. Overdurf, R.S. Peterson, A. Porcella, H. Ye, K.E. Paulson, R.H. Costa, Members of the HNF-3/forkhead family of transcription factors exhibit distinct cellular expression patterns in lung and regulate the surfactant protein B promoter, *Dev. Biol.* 166 (1994) 195–209.
- [8] B. Deneen, R. Ho, A. Lukaszewicz, C.J. Hochstim, R.M. Gronostajski, D.J. Anderson, The transcription factor NFIA controls the onset of gliogenesis in the developing spinal cord, *Neuron* 52 (2006) 953–968.
- [9] E. Dessaud, A.P. McMahon, J. Briscoe, Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network, *Dev. Camb. Engl.* 135 (2008) 2489–2503.
- [10] R. Diez del Corral, K.G. Storey, Markers in vertebrate neurogenesis, *Nat. Rev. Neurosci.* 2 (2001) 835–839.
- [11] M. Goulding, Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction, *Nat. Rev. Neurosci.* 10 (2009) 507–518.
- [12] N. Guérout, X. Li, F. Barnabé-Heider, Cell fate control in the developing central nervous system, *Exp. Cell Res.* 321 (2014) 77–83.
- [13] C.A. Hackett, J.I. Weller, Genetic mapping of quantitative trait loci for traits with ordinal distributions, *Biometrics* 51 (1995) 1252–1263.
- [14] A.W. Helms, J.E. Johnson, Specification of dorsal spinal cord interneurons, *Curr. Opin. Neurobiol.* 13 (2003) 42–49.
- [15] C. Hochstim, B. Deneen, A. Lukaszewicz, Q. Zhou, D.J. Anderson, Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain code, *Cell* 133 (2008) 510–522.
- [16] B.V. Jacquet, N. Muthusamy, L.J. Sommerville, G. Xiao, H. Liang, Y. Zhang, M.J. Holtzman, H.T. Ghashghaei, Specification of a Foxj1-dependent lineage in the forebrain is required for embryonic-to-postnatal transition of neurogenesis in the olfactory bulb, *J. Neurosci. J. Soc. Neurosci.* 31 (2011) 9368–9382.
- [17] B.V. Jacquet, R. Salinas-Mondragon, H. Liang, B. Therit, J.D. Buie, M. Dykstra, K. Campbell, L.E. Ostrowski, S.L. Brody, H.T. Ghashghaei, FoxJ1-dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain, *Dev. Camb. Engl.* 136 (2009) 4021–4031.
- [18] G. La Manno, D. Gyllborg, S. Codeluppi, K. Nishimura, C. Salto, A. Zeisel, L.E. Borm, S.R.W. Stott, E.M. Toledo, J.C. Villaescusa, P. Lönnerberg, J. Ryge, R.A. Barker, E. Arenas, S. Linnarsson, Molecular diversity of midbrain development in mouse, human, and stem cells, *Cell* 167 (2016) 566–580 (e19).
- [19] B.B. Lake, et al., Neuronal subtypes and diversity revealed by single-nucleus RNA sequencing of the human brain, *Science* 352 (2016) 1586–1590.
- [20] X. Li, E.M. Floriddia, K. Toskas, K.J.L. Fernandes, N. Guérout, F. Barnabé-Heider, Regenerative potential of ependymal cells for spinal cord injuries over time, *EBioMedicine* 13 (2016) 55–65.
- [21] B. Liu, Z. Liu, T. Chen, H. Li, B. Qiang, J. Yuan, X. Peng, M. Qiu, Selective expression of Bhlhb5 in subsets of early-born interneurons and late-born association neurons in the spinal cord, *Dev. Dyn.* 236 (2007) 829–835.
- [22] P. Lu, Y. Wang, L. Graham, K. McHale, M. Gao, D. Wu, J. Brock, A. Blesch, E.S. Rosenzweig, L.A. Havton, et al., Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury, *Cell* 150 (2012) 1264–1273.
- [23] K. Meletis, F. Barnabé-Heider, M. Carlén, E. Evergren, N. Tomilin, O. Shupliakov, J. Frisén, Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells, *PLoS Biol.* 6 (2008) e182.
- [24] R.J. Mullen, C.R. Buck, A.M. Smith, NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates, *Development* 116 (1992) 201–211.
- [25] R.W. Murphy, I.S. Darevsky, R.D. MacCulloch, J. Fu, L.A. Kupriyanova, D.E. Upton, F. Danielyan, Old age, multiple formations or genetic plasticity? Clonal diversity in the uniparental Caucasian rock lizard, *Lacerta dahli*, *Genetica* 101 (1997) 125–130.
- [26] N. Muthusamy, A. Vijayakumar, G. Cheng, H.T. Ghashghaei, A knock-in Foxj1CreERT2::GFP mouse for recombination in epithelial cells with motile cilia, *Genesis* 52 (2014) 350–358.
- [27] L.E. Ostrowski, J.R. Hutchins, K. Zakeł, W.K. O'Neal, Targeting expression of a transgene to the airway surface epithelium using a ciliated cell-specific promoter, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 8 (2003) 637–645.
- [28] D.M. Panchision, J.M. Pickel, L. Studer, S.H. Lee, P.A. Turner, T.G. Hazel, R.D. McKay, Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate, *Genes Dev.* 15 (2001) 2094–2110.
- [29] A.L. Perrier, V. Tabar, T. Barberi, M.E. Rubio, J. Bruses, N. Topf, N.L. Harrison, L. Studer, Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 12543–12548.
- [30] Y. Ren, Y. Ao, T.M. O'Shea, J.E. Burda, A.M. Bernstein, A.J. Brumm, N. Muthusamy, H.T. Ghashghaei, S.T. Carmichael, L. Cheng, M.V. Sofroniew, Ependymal cell contribution to scar formation after spinal cord injury is minimal, local and dependent on direct ependymal injury, *Sci. Rep.* 7 (2017) 41122.
- [31] D.H. Rowitch, A.R. Kriegstein, Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification, *Nature* 468 (2010) 214–222.
- [32] H. Sabelström, M. Stenudd, P. Réu, D.O. Dias, M. Elfineh, S. Zdunek, P. Damberg, C. Göritz, J. Frisén, Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice, *Science* 342 (2013) 637–640.
- [33] I.S. Shimada, M. Acar, R.J. Burgess, Z. Zhao, S.J. Morrison, Prdm16 is required for the maintenance of neural stem cells in the postnatal forebrain and their differentiation into ependymal cells, *Genes Dev.* 31 (2017) 1134–1146.
- [34] M. Simat, L. Ambrosetti, B. Lardi-Studler, J.M. Fritschy, GABAergic synaptogenesis marks the onset of differentiation of basket and stellate cells in mouse cerebellum, *Eur. J. Neurosci.* 26 (2007) 2239–2256.
- [35] J.L. Stubbs, I. Oishi, J.C. Izpisua Belmonte, C. Kintner, The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos, *Nat. Genet.* 40 (2008) 1454–1460.
- [36] H.-H. Tsai, H. Li, L.C. Fuentealba, A.V. Molofsky, R. Taveira-Marques, H. Zhuang, A. Tenney, A.T. Murnen, S.P.J. Fancy, F. Merkle, N. Kessaris, A. Alvarez-Buylla, W.D. Richardson, D.H. Rowitch, Regional astrocyte allocation regulates CNS synaptogenesis and repair, *Science* 337 (2012) 358–362.
- [37] H. van Praag, A.F. Schinder, B.R. Christie, N. Toni, T.D. Palmer, F.H. Gage, Functional neurogenesis in the adult hippocampus, *Nature* 415 (2002) 1030–1034.
- [38] K. Yu, S. McGlynn, M.P. Matise, Floor plate-derived sonic hedgehog regulates glial and ependymal cell fates in the developing spinal cord, *Dev. Camb. Engl.* 140 (2013) 1594–1604.
- [39] X. Yu, C.P. Ng, H. Habacher, S. Roy, Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program, *Nat. Genet.* 40 (2008) 1445–1453.
- [40] A. Zeisel, A.B. Muñoz-Manchado, S. Codeluppi, P. Lönnerberg, G. La Manno, A. Juréus, S. Marques, H. Munguba, L. He, C. Betscholtz, C. Rolny, G. Castelo-Branco, J. Hjerling-Lefler, S. Linnarsson, Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq, *Science* 347 (2015) 1138–1142.
- [41] K. Zheng, H. Li, Y. Zhu, Q. Zhu, M. Qiu, MicroRNAs are essential for the developmental switch from neurogenesis to gliogenesis in the developing spinal cord, *J. Neurosci. J. Soc. Neurosci.* 30 (2010) 8245–8250.

6.4 Article II

Inhibition of ADAMTS-4 Expression in Olfactory Ensheathing Cells Enhances Recovery after Transplantation within Spinal Cord Injury

**Quentin Delarue*, Anne Mayeur*, Chaima Chalfouh, Axel Honoré, Célia Duclos,
Marine Di Giovanni, Xiaofei Li, Mathieu Salaun, Justine Dampierre, David Vaudry,
Jean-Paul Marie, Nicolas Guérout.**

Journal of Neurotrauma 2020 Feb 1 ;37(3) :507-516. doi : 10.1089/neu.2019.6481.

Ce projet, dont j'étais membre, a été mené au sein de l'EA3830 sous la direction du Dr. Guéroult et a fait l'objet de la Thèse du Dr. Anne Mayeur. Il s'inscrit dans la continuité des thématiques menées au sein de notre laboratoire, depuis des années, et qui s'intéressent aux différentes propriétés bénéfiques et aux mécanismes d'actions des cellules gliales olfactives (CGO) comme thérapie cellulaire dans la réhabilitation des lésions du système nerveux.

Une précédente étude menée par le laboratoire portant sur les mécanismes d'action des CGO, a démontré que ces cellules secrètent un certain nombre de facteurs trophiques et de molécules modulatrices de la matrice extracellulaire *in vitro*. Parmi ces facteurs secrétés préférentiellement par les CGO, on distingue une désintégrine métalloprotéinase avec des motifs de thrombospondines 4 (ADAMTS-4), ayant la capacité de dégrader les protéoglycanes de chondroïtine sulfate (CSPG).

Dans le cadre des lésions du SNC, cette ADAMTS-4 présente des effets controversés dépendants du modèle lésionnel. Par exemple, dans un modèle d'AVC, les résultats montrent un effet anti-inflammatoire en diminuant les facteurs pro-inflammatoires tels que CCL2 et IL-6 secrétés par la microglie et les astrocytes. En revanche, dans un modèle de sclérose latérale amyotrophique, elle entraîne la dégénérescence des motoneurones et la diminution de la sécrétion de NGF. Récemment, une étude a montré que, dans le cadre des maladies démyélinisantes, l'inhibition de l'expression d'ADAMTS-4 dans les cellules gliales, *in vitro*, induit une augmentation de la sécrétion de facteurs trophiques par ces cellules.

En se basant sur les effets bénéfiques démontrés par la littérature concernant le potentiel thérapeutique des CGO dans le cadre des LMTs et d'après les études réalisées au sein du laboratoire montrant une forte expression d'ADAMTS-4 par les cellules gliales olfactives *in vitro*, nous avons émis l'hypothèse que l'inhibition de l'expression d'ADAMTS-4 dans les CGO permettrait d'augmenter la sécrétion de facteurs trophiques et de molécules modulatrices de la matrice extracellulaire (MEC), créant ainsi un microenvironnement plus permissif après LMT.

Pour ce faire, une lignée de souris ADAMTS-4^{-/-} (souris knock-out) a été utilisée afin de réaliser des cultures primaires de CGO dépourvues du gène ADAMTS-4. Ces cultures ont été, par la suite, transplantées dans des souris WT ayant subi une transection complète de la moelle au niveau thoracique. Ce groupe était comparé à un groupe de souris WT lésé ayant reçu des CGO de souris WT (ADAMTS-4^{+/+}).

Dans notre étude, avant d'évaluer l'effet de la suppression d'ADAMTS4 dans les CGO sur la récupération et le remodelage tissulaire suite à une LMT, nous nous sommes intéressés à l'effet de cette suppression sur la survie des CGO transplantées. Pour cela, nous avons tiré avantage d'une lignée de souris luciférase, LUX^{+/-}, que nous avons croisé avec la lignée ADAMTS-4^{-/-}. De cette façon, nous avons pu générer des cultures de CGO : LUX^{+/-}/ADAMTS-4^{-/-} et LUX^{+/-}/ADAMTS-4^{+/+} et des animaux WT ont alors été transplantées avec l'une de ces deux cultures. Par la suite, nous avons pu mesurer la survie de ces cellules transplantées par le biais des techniques de bioluminescence. Cette quantification a été effectuée, à une et 2 semaines après la lésion, et nous avons pu démontrer que la suppression d'ADAMTS-4 n'a pas d'effet sur la survie des CGO au cours du temps. Ensuite, afin d'investiguer les effets des CGO dépourvues d'ADAMTS-4 sur leurs profils d'expression, des PCR quantitatives ont été effectuées sur un panel de gènes spécifiques de l'inhibition ou de l'induction de la repousse axonale. Ces gènes étudiés ont été regroupés en 4 catégories : 1- gènes d'adhésion et de matrice extracellulaire, 2- gènes de la plasticité synaptique et la repousse axonale, 3- gènes de facteur de croissance et enfin 4- gènes immunomodulateurs. Les quantifications effectuées ont montré une augmentation de l'expression de ces gènes à l'exception des gènes immunomodulateurs dans le groupe CGO ADAMTS-4^{-/-}.

Suite à ces travaux, des souris WT ont été transplantées avec des cultures de CGO ADAMTS-4^{-/-} ou bien des cultures de CGO ADAMTS-4^{+/+}. La transplantation de CGO ADAMTS-4^{-/-} a entraîné une récupération locomotrice et une amélioration significative de l'activité électrophysiologique et fonctionnelle chez les souris ayant bénéficiées de ce traitement.

Afin de corrélérer cette récupération fonctionnelle par une réparation tissulaire de la moelle lésée, nous avons évalué l'effet de la transplantation de cultures de CGO ADAMTS-4^{-/-} sur la cicatrice gliale, fibrotique et sur le degré de démyélinisation et d'intégrité de la MEC, 60 jours après la lésion. Ces analyses ont montré une modulation de la cicatrice médullaire avec une diminution des aires GFAP négatives et MBP négatives, ainsi qu'une diminution de l'expression de Neurocan.

Il est important de noter que des précédentes études ont rapporté que la surexpression des facteurs trophiques ou de la chondroïtinase ABC par les CGO peut, également, améliorer leur potentiel thérapeutique. Cependant, dans ces études, les CGO ont été modifiées par des infections virales, ce qui rend difficile la transposition clinique de ces protocoles. À notre connaissance, notre étude est la première à montrer que les propriétés thérapeutiques des CGO pourraient être améliorées par la suppression de l'expression d'ADAMTS-4.

Ainsi, cette étude illustre le fait qu'une meilleure compréhension des propriétés et des modes d'actions des molécules sécrétées par les CGO, ainsi que leur modulation, permettrait un ciblage plus efficace des différentes atteintes neurologiques qui surviennent à la suite d'une LMT.

Ce travail a fait l'objet d'une publication « Inhibition of ADAMTS-4 Expression in Olfactory Ensheathing Cells Enhances Recovery after Transplantation within Spinal Cord Injury » dans le journal *Journal of Neurotrauma* dans laquelle je suis middle auteure.

Inhibition of ADAMTS-4 Expression in Olfactory Ensheathing Cells Enhances Recovery after Transplantation within Spinal Cord Injury

Quentin Delarue,^{1,*} Anne Mayeur,^{1,*} Chaima Chalfouh,¹ Axel Honoré,¹ Célia Duclos,¹ Marine Di Giovanni,² Xiaofei Li,³ Mathieu Salaun,⁴ Justine Dampierre,⁴ David Vaudry,² Jean-Paul Marie,¹ and Nicolas Guérout¹

Abstract

Spinal cord injury (SCI) induces permanent loss of sensitive and motor functions below the injury level. To date, a wide variety of cells has been used as biotherapies to cure SCI in different animal paradigms. Specifically, olfactory ensheathing cells (OECs) is one of the most promising. Indeed, OECs have been shown to enhance recovery in many animal studies. Moreover, OECs transplantation has been applied to a paraplegic patient and have shown beneficial effects. However, it has been reported that the significant level of recovery varies among different patients. Therefore, it is of primary importance to enhance the regenerative efficiency of OECs for better translations. Recently, it has been shown that inhibiting ADAMTS4 expression in glial cells *in vitro* increases their synthesis of neurotrophic factors. We hypothesized that the expression of neurotrophic factors secreted by OECs can be increased by the deletion of ADAMTS4. Taking advantage of ADAMTS4^{-/-} mouse line, we produce ADAMTS4 deficient primary OEC cultures and then we investigated their regenerative potential after SCI. By using quantitative polymerase chain reaction, bioluminescence imaging, measurement of locomotor activity, electrophysiological studies, and immunohistochemistry, our results show that ADAMTS4^{-/-} olfactory bulb OEC (bOECs) primary cultures upregulate their trophic factor expression *in vitro*, and that the transplantation of ADAMTS4^{-/-} bOECs in a severe SCI model increases functional recovery and tissue repair *in vivo*. Altogether, our study reveals, for the first time, that primary bOEC cultures transplantation can be potentialized by inhibition of the expression of ADAMTS4.

Keywords: ADAMTS4; functional recovery; olfactory ensheathing cells; spinal cord injury; transplantation

Introduction

SPINAL CORD INJURY (SCI) is a disabling disease that typically results in permanent sensorimotor impairment below the injury level.¹ There is currently no therapy to enhance recovery following SCI. The success of novel therapies will most likely require a combinatorial approach due to the fact that the cellular mechanisms that take place after SCI are complex and evolve over time. Indeed, SCI induces the formation of an inhibitory environment that leads to the lack of regeneration and recovery of function.^{2,3} Several processes are described to inhibit recovery after SCI as neural cell death, axonal degeneration and demyelination, and inflammation.^{2,3} Therefore, cell transplantation has been proposed as a therapy to enhance recovery and tissue repair after SCI.⁴ To date, a wide variety of cells has been used as biotherapies to cure SCI.⁵⁻⁷

Specifically, olfactory ensheathing cells (OECs) have been shown to enhance recovery in different SCI paradigms in rodents.⁸ Moreover, OEC transplantations have been applied to a paraplegic patient in a clinical trial study and have induced beneficial effects.⁹ However, it has been reported that the level of recovery varies among different patients.¹⁰ Therefore, it can be of primary interest to enhance OECs effectiveness. Specifically, OECs have been described to secrete a wide range of trophic factors and extracellular matrix (ECM) modulating molecules.^{4,11} It also has been suggested that the effects of OECs transplantation could be enhanced by co-injections with additional exogenous trophic factors.¹² An alternative way will be to increase the endogenous secretion of trophic factors and ECM modulating molecules secreted by OECs.

Recently, a metalloproteinase, ADAMTS4 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs type 4, known to bind and

¹Normandie Univ, UNIROUEN, GRHV EA3830; Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Rouen, France.

²Normandie Univ, UNIROUEN, PRIMACEN; Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Mont-Saint-Aignan, France.

³Department of Neurobiology, Care Sciences and Society, BioClinicum, Karolinska Institutet, 17164 Stockholm, Sweden.

⁴Normandie Univ, UNIROUEN, LITIS EA 4108; Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Rouen, France.

*These authors contributed equally.

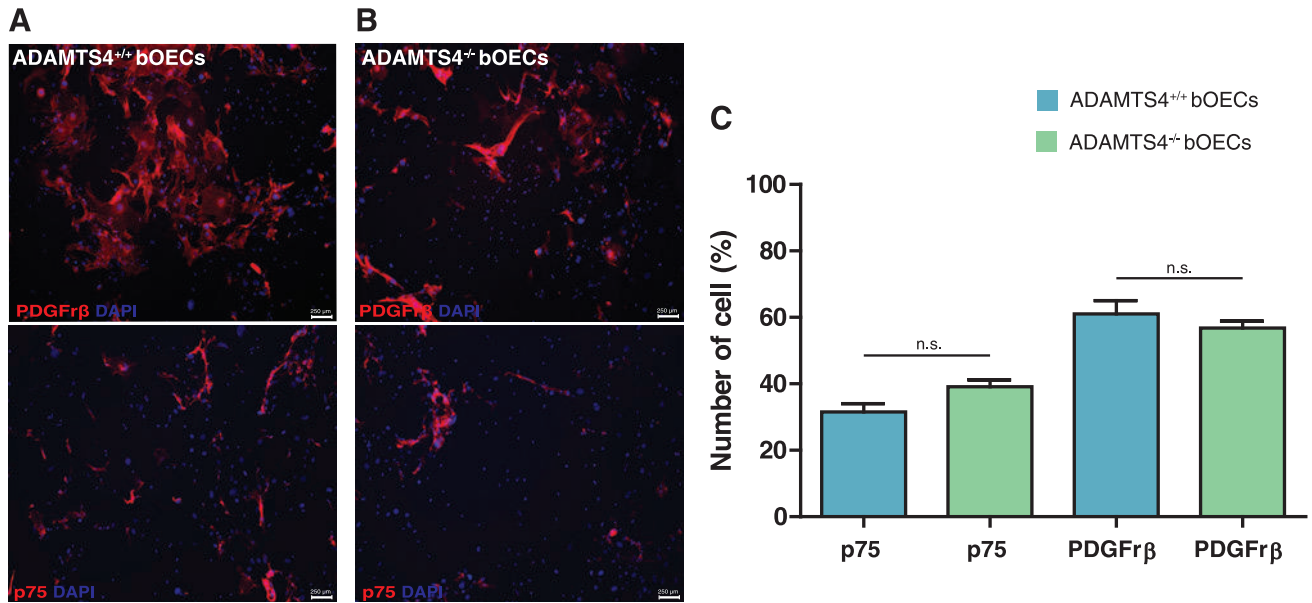


FIG. 1. Deletion of ADAMTS4 does not change the ratio between p75+ olfactory ensheathing cells (OECs) and PDGFRβ+ fibroblasts in primary boEC cultures. Immunohistochemistry of p75+ and PDGFRβ+ cells in (A) ADAMTS4^{+/+} and (B) ADAMTS4^{-/-} boECs primary cultures. (C) Quantification of the percentage of p75+ OECs and PDGFRβ+ fibroblasts in ADAMTS4^{+/+} and ADAMTS4^{-/-} boECs primary cultures. Scale bars are 250 μm. Quantifications are expressed as average ± standard error of the mean; *n* = 4 cultures per condition, all experiments were conducted in duplicate. Statistical evaluations were based on Wilcoxon-Mann-Whitney test (ns = not significant). Color image is available online.

degrade chondroitin sulfate proteoglycans), has been shown to exert multi-faceted effects after various central nervous system injuries.¹³⁻¹⁵

For instance, ADAMTS4 exerts beneficial and negative axonal regrowth effects by modulating extracellular matrix. Indeed, ADAMTS4 induces anti-inflammatory effect in a stroke model by decreasing the pro-inflammatory CCL2, tumor necrosis factor-α and interleukin-6 cytokines secreted by microglial cells and astrocytes.^{13,15} In contrast, ADAMTS4 increases neurodegeneration in an amyotrophic lateral sclerosis model by destabilizing perineuronal net leading to synaptic instability.¹³ Interestingly, in this demyelinating disease paradigm, it has been shown that inhibiting ADAMTS4 expression in glial cells *in vitro* increases their synthesis of neurotrophic factors.¹³

In our team, we have previously demonstrated that OECs produce ADAMTS4 *in vitro*.¹¹ We further hypothesized that inhibiting ADAMTS4 expression can promote the secretion of trophic factors and ECM modulating molecules by OECs. Taking advantage of ADAMTS4^{-/-} (knockout) mouse line to produce ADAMTS4-deficient olfactory bulb primary OEC (boEC) cultures, we found that ADAMTS4^{-/-} boECs upregulates their trophic factor expression *in vitro*. After the transplantation of ADAMTS4^{-/-} boECs in a severe SCI model, the functional recovery and tissue repair are better promoted *in vivo*. Therefore, our data suggest that the inhibition of ADAMTS4 expression in OECs can better promote regeneration after SCI.

Methods

Animals

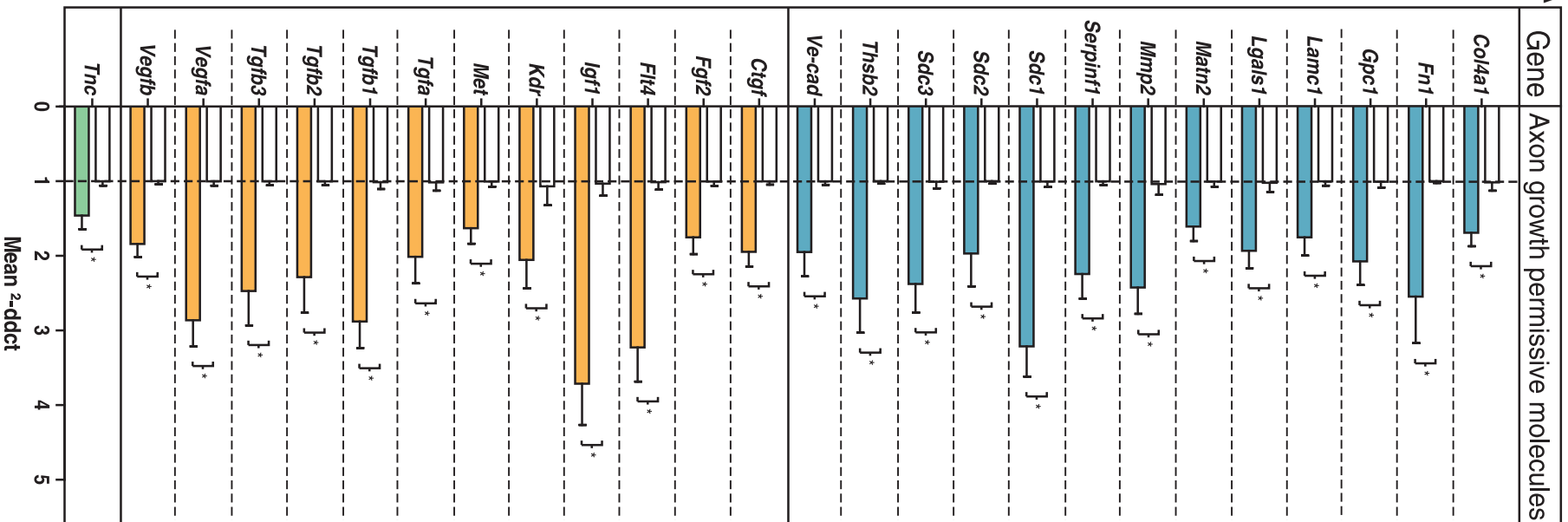
All experimental procedures were in accordance with the European Community guiding principles on the care and use of animals (86/609/CEE; Official Journal of the European Communities no. L358; December 18, 1986), French Decree no. 97/748 of October 19, 1987 (Journal Officiel de la République Française; October 20, 1987), and the recommendations of the Cenomexa ethics committee (02173.02).

Adamts4^{+/+} (B6.129P2-Adamts4^{tm1Dgen/J}) and Tg(CAG-luc,-GFP)L2G85Chco^{+/+} (FVB-Tg(CAG-luc,-GFP)L2G85Chco/J) mice, called Luciferase (LUX) thereafter, were obtained from the Jackson Laboratory (www.jax.org/strain/005770 and www.jax.org/strain/008450) and were maintained on a C57BL/6J background. Mice were bred to yield Adamts4^{+/+} (WT), Adamts4^{-/-} (KO), LUX^{+/+} and Adamts4^{-/-}/LUX^{+/+} and Adamts4^{+/+}/LUX^{+/+}. All mice have been genotyped by polymerase chain reaction (PCR) using ear DNA and were identified by implantation of glass tag (Biolog-id, France); glass tag numbers have been used to perform blindly analyses. All animals were housed in a 12-h light/12-h dark cycle with food and water *ad libitum*.

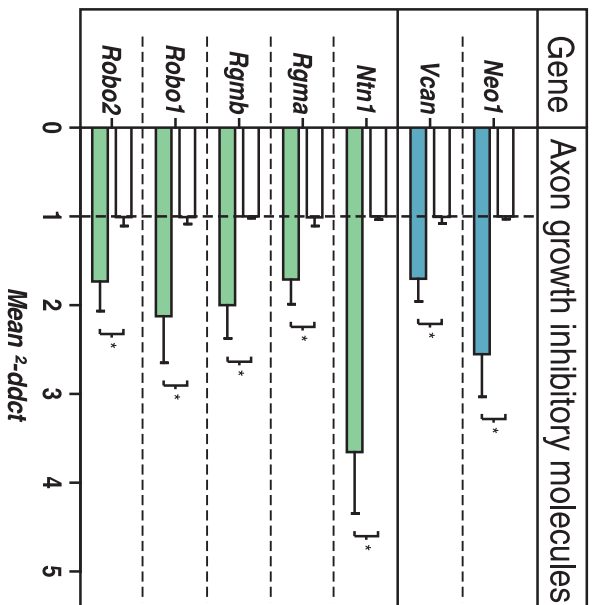
Our study was composed of two main experimental groups: ADAMTS4^{-/-} boECs transplanted C57BL/6J mice (*n* = 10) and ADAMTS4^{+/+} boECs transplanted C57BL/6J mice (*n* = 10). Additional experiments were performed for bioluminescence imaging experiments using ADAMTS4^{-/-}/LUX^{+/+} boECs transplanted

FIG. 2. Deletion of ADAMTS4 in primary boEC cultures upregulates the gene expression of trophic factors and axon growth permissive molecules. Histogram of messenger RNA (mRNA) expression of ADAMTS4^{+/+} and ADAMTS4^{-/-} primary boEC cultures of (A) axon growth permissive molecules and (B) axon growth inhibitory molecules genes. Dashed lines correspond to mRNA expression from ADAMTS4^{+/+} primary boEC cultures. (C) Percentage of upregulated genes in ADAMTS4^{-/-} primary boEC cultures in four categories of genes. (D) Relative numbers of upregulated genes in ADAMTS4^{-/-} primary boEC cultures in four categories of genes. Quantifications are expressed as average ± SEM; *n* = 4 cultures per condition; all experiments were conducted in duplicate. Statistical evaluations were based on Wilcoxon-Mann-Whitney test (**p* < 0.05). Color image is available online.

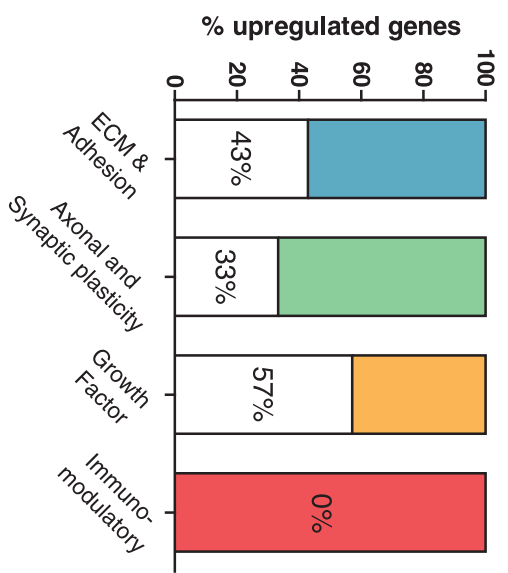
A



B



C



D

Gene	Upregulated	Total
ECM & Adhesion	15	35
Axonal and synaptic plasticity	6	18
Growth Factor	12	21
Immunomodulatory	0	5

C57BL/6J mice ($n=5$) and ADAMTS4^{+/+}/LUX^{+/-} bOECs transplanted C57BL/6J mice ($n=5$).

Primary olfactory bulb culture and cell transplant preparation

Olfactory bulb (OB) primary cultures were prepared as described previously.^{11,16} Two weeks after plating, cultures were trypsinized, and the cells were counted. Before transplantations, bOECs were resuspended in DF-10S at concentration of 25,000 cells/ μ L. OB primary cultures characterization was assessed using immunocytochemistry. Antibodies raised against p75 and PDGFR β were used (Fig. 1).

Real-time PCR

Real-time PCR experiments were performed to evaluate the messenger RNA (mRNA) expression level of axon growth inhibitory and axon growth permissive molecules, as well as neurotrophic factors in ADAMTS4^{-/-} and ADAMTS4^{+/+} primary bOECs cultures.^{17,18} Total RNAs from these cultures were extracted using Tri-reagent (Sigma) and Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. From each sample, 1.5 μ g of total RNA was converted into single stranded cDNA using the ImPromII reverse transcriptase kit (Promega) with random primers (0.5 μ g/mL). Two ng complementary DNA (cDNA) was amplified in the presence of 2 X SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems) containing preset concentrations of dNTPs, MgCl₂ as well as forward and reverse primers, with a QuantStudio™ 12KFlex (Applied Biosystems). Proper controls without reverse transcriptase or with H₂O instead of cDNA were conducted.

Primers were designed using the Primer Express software (Applied Biosystems) and validated by real-time PCR. The relative amount of cDNA in each sample was determined using the comparative quantification cycle (Cq) method and expressed as 2^{- $\Delta\Delta$ Cq}. The list of all genes including the five housekeeping genes analyzed is described in the Supplementary Figure 1. All experiments were conducted in duplicate.

Surgical procedure and cell transplantation

SCI was performed at T10 level as described previously.^{19,20} A complete transection of the spinal cord was performed with a 25-gauge needle: right after making the lesion, bOECs were transplanted. To facilitate cells transplantation, a stereotaxic frame with its micromanipulator arm (World Precision Instrument) was used. Thus, bOECs were injected using a 1 mm sterile glass capillary needle which was attached to the micromanipulator. Injections were delivered at 1 mm depth, 1.5 mm from the midline, 5 mm rostrally and caudally from the lesion site as described in Figure 3A. A total of two injections (2 \times 2 μ L), which contained 25,000 cells/ μ L, was delivered (Fig. 3A). Each injectate was carefully delivered within 1 min. After surgery, mice underwent daily checks, any of them showed neither skin lesions, infection nor autophagy throughout the study.

Bioluminescence imaging

An *in vivo* XTREM 4XP spectrum cooled charge-coupled device optical macroscopic imaging system (Brucker) was used for bioimaging. The survival of the LUX^{+/-} bOECs was monitored during 2 weeks via intraperitoneal injections of D-Luciferin (0.3 mg/g body weight) and measurements of the photon counts was performed as previously described using Brucker molecular imaging software.²¹

Measurement of locomotor activity

Measurement of locomotor activity was performed as described previously.⁸ Animals were placed individually in 40 \times 40 \times 30 cm compartments, in a dark and quiet room. Locomotor activity was

assessed automatically in a computerized actimeter (Versamax, AccuScan Instruments Inc.), which monitored the horizontal displacements, including horizontal time and horizontal activity. The responses were expressed as the total number of beams crossed (horizontal activity) and as total distance traveled by mouse during a 30-min period.

Electrophysiological studies

Motor evoked potentials (MEPs) were measured, as previously described by Amadio and colleagues.²² Mice were anesthetized with xylazine (2 mg/kg)/ketamine (5 mg/kg) in order to induce slight sedation. Then, two monopolar 27 G electrodes were placed through the scalp to contact the periosteum. The cathode needle was inserted at the midline of the interaural line and the anode tip was placed just anterior to the ear at 3-4 mm from the former one. The stimulation was defined by an intensity of 12 mA, with a maximum repeat rate of 0.1 Hz and a pulse width of 0.05 msec. The stimulation train used 10 pulses.

MEPs were recorded using a bipolar electrode inserted into the gastrocnemius muscles (Fig. 4C). The reference electrode was positioned subcutaneously in the belly. The electromyographic signal was filtered through an 80 Hz high pass filter at rate of 10 k/sec, and a sweep velocity of 20 msec. Then, amplitude was recorded and averaged for each animal. The onset of the first, usually negative, deflection was taken as the cortical MEP (cMEP) latency.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry experiments have been performed as previously described.¹⁹

The primary and species-specific fluorophore-conjugated secondary antibodies used are described in Supplementary Figure 2.

Image acquisition analysis

Representative images of the lesion site and spinal cords were acquired using the Zeiss Apotome2 microscope set up. For tissue analysis sagittal sections have been used. For each experimental group and staining, 7-10 animals were analyzed.

Quantification of immunohistochemically stained areas

The areas of the sagittal sections were measured at the epicenter of the lesion and section rostral and caudal to the injury site. Image processing and assembly was performed in ImageJ or Photoshop.

Statistical analysis

Statistics were run with non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney test for comparing two groups. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. For each experimental group and staining, five to 10 animals minimum were analyzed.

Results

Deletion of ADAMTS4 does not change the ratio between p75+ OECs and PDGFR β + fibroblasts in primary bOEC culture

Immunocytochemistry analyses revealed that in both ADAMTS4^{+/+} and ADAMTS4^{-/-} bOECs primary cultures, 35-40% of the cells were positive for P75 and 60-65% of the cells were positive for PDGFR β (Fig. 1; $n=4$ cultures per condition).

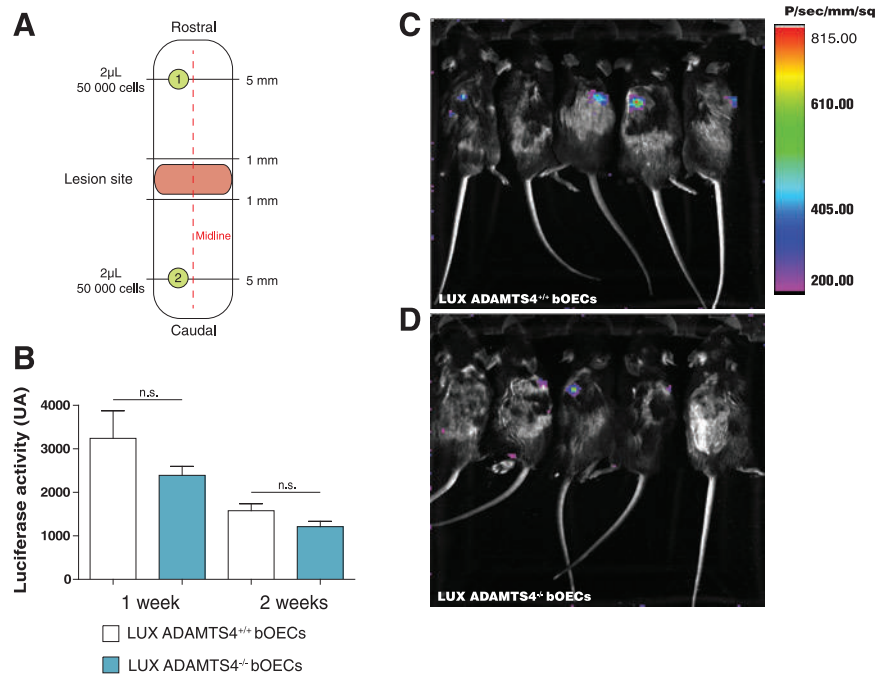


FIG. 3. Deletion of ADAMTS4 does not affect the survival of transplanted primary bOEC cultures cells after spinal cord injury (SCI). (A) Schematic representation of SCI model and bOECs injection protocol. (A) Representative images of (C) luciferase⁺ (LUX) \pm ADAMTS4^{+/+} and (D) luciferase⁺ ADAMTS4^{-/-} cells transplanted in wild-type mice 2 weeks post-transplantation and (B) quantification of luciferase signals. Quantifications are expressed as average \pm standard error of the mean; $n=5$ animals per group. Statistical evaluations were based on Wilcoxon-Mann-Whitney test (ns = not significant). Color image is available online.

Deletion of ADAMTS4 in primary bOEC culture induces upregulated gene expression of trophic factors and axon growth permissive molecules

Before studying the effects of ADAMTS4^{-/-} bOECs transplantation on functional recoveries and tissue repair, we first evaluated the effects of the deletion of ADAMTS4 in primary bOEC culture on genes expression. We performed bOEC primary cultures obtained from ADAMTS4^{+/+} and ADAMTS4^{-/-} mice ($n=4$ cultures per condition) and then performed quantitative PCR on 79 genes (Supplementary Fig. 1). These genes were analyzed in two main categories—axon growth permissive and axon growth inhibitory molecules genes, as previously.^{17,18}

Our results showed that in ADAMTS4^{-/-} bOEC primary culture, 33 genes out of 79 were upregulated, including 26 axonal permissive and seven axonal growth inhibitory molecules genes respectively (Fig. 2A, 2B). Thereafter, based on a GeneCards and National Center for Biotechnology Information database analysis, we have divided these genes into four categories for a more regenerative perspective: 1) extracellular matrix and adhesion genes; 2) axonal and synaptic plasticity genes; 3) growth factor genes; and 4) immunomodulatory genes. It appears that *in vitro* ADAMTS4^{-/-} bOECs exhibited upregulation at different degrees in each category, except for the immunomodulatory class (Fig. 2C). The detail of the number of genes upregulated in each category is presented Figure 2D.

Altogether, these results demonstrated that the deletion of ADAMTS4 in primary bOEC cultures induces genes expression changes. Interestingly, in agreement with Lemarchant et al, the deletion of ADAMTS4 increases in particular, the expression of trophic factors and more broadly axon growth permissive molecule genes.¹³

Deletion of ADAMTS4 does not affect the survival of transplanted bOECs after SCI

Before evaluating the effects of ADAMTS4^{-/-} bOECs transplantation on functional recoveries and tissue repair, we analyzed the impact of ADAMTS4 deletion on the survival of transplanted bOECs after SCI. By crossing Luciferase (LUX) mice with ADAMTS4 mice, we were able to visualize cells derived from LUX mice by bioluminescence imaging. We then transplanted the same number of cells from LUX^{+/+}/ADAMTS4^{-/-} mice or LUX^{+/+}/ADAMTS4^{+/+} mice (Fig. 3A). Then, we measured the number of remaining cells at 1 week and 2 weeks after SCI and transplantation (Fig. 3B-3D). Our data show that there is no statistically significant difference between the two groups at 1 week and at 2 weeks after SCI and transplantation (Fig. 3B), suggesting that the inhibition of ADAMTS4 expression in bOECs does not affect the survival of the transplanted bOECs after SCI.

To confirm, the low survival rate of the transplanted cells over-time, bioluminescence imaging was performed 3 weeks after SCI. By 3 weeks, none of the mice transplanted with both ADAMTS4^{-/-} and ADAMTS4^{+/+} bOECs primary cultures had remaining cells (Supplementary Fig. 3).

Deletion of ADAMTS4 in bOECs increases functional recovery and electrophysiological improvements following SCI

Measurement of horizontal activity (horizontal activity and total distance traveled) was performed during 30 min., and 15, 30, and 60 days after SCI and transplantation in mice with ADAMTS4^{-/-} and ADAMTS4^{+/+} bOECs. These analyses revealed that transplantation

of ADAMTS4^{-/-} primary bOEC cultures induces earlier functional recovery (Fig. 4A, 4B). Indeed, horizontal activity and total distance traveled measurements indicate that 15 days after SCI and transplantation, ADAMTS4^{-/-} bOECs transplanted animals presented a significantly improvement of these two parameters (Fig. 4A, 4B). No difference between the two groups could be found 30 and 60 days after SCI and transplantation (Figure 4A, 4B).

In the same animals 60 days after SCI and transplantation, we performed electrophysiological studies and recorded MEP in ADAMTS4^{-/-} and ADAMTS4^{+/+} bOECs transplanted mice. The respective position of stimulating and recording electrodes is presented in Figure 4C.

These analyses revealed that transplantation of ADAMTS4^{-/-} bOECs induces an increase of the amplitude of the MEPs 60 days after SCI and transplantation (Fig. 4D).

Deletion of ADAMTS4 in primary bOEC cultures increases tissue repair following SCI

In order to further investigate the cellular mechanisms behind the functional and electrophysiological recoveries, we performed

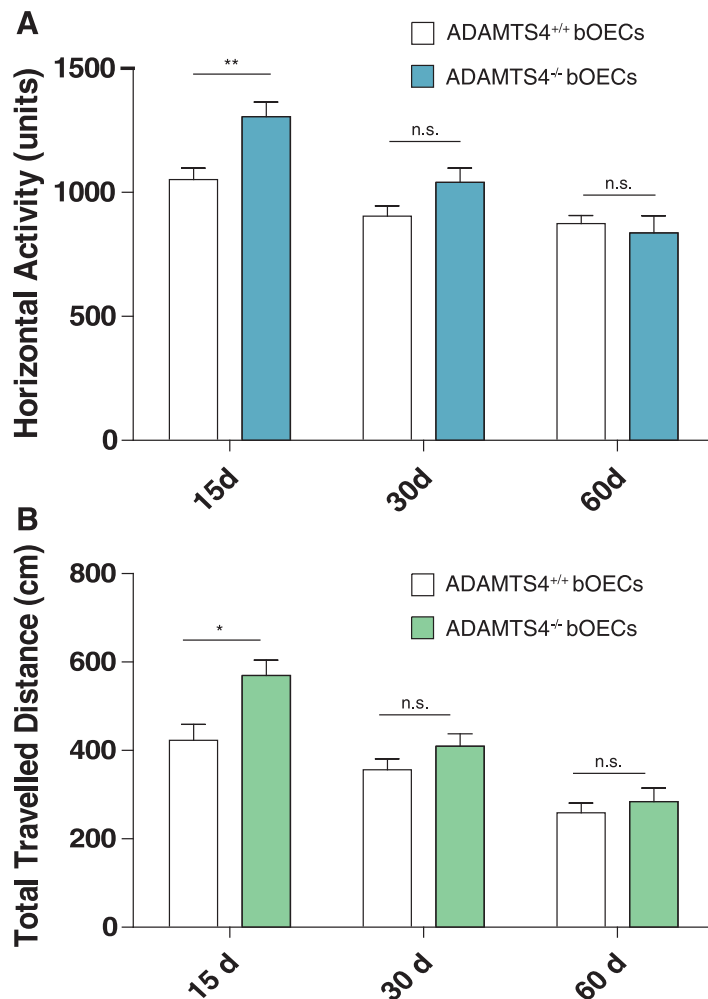
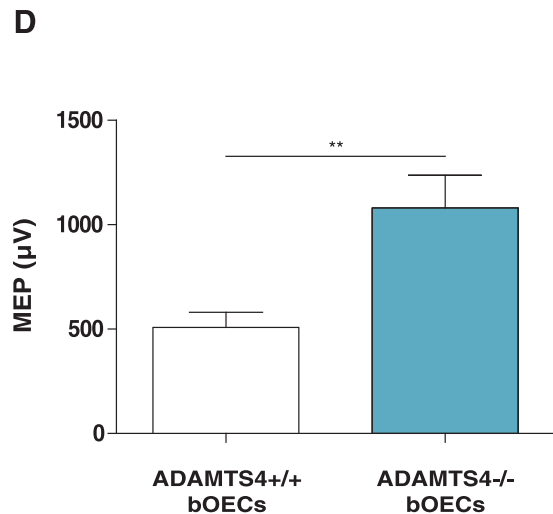
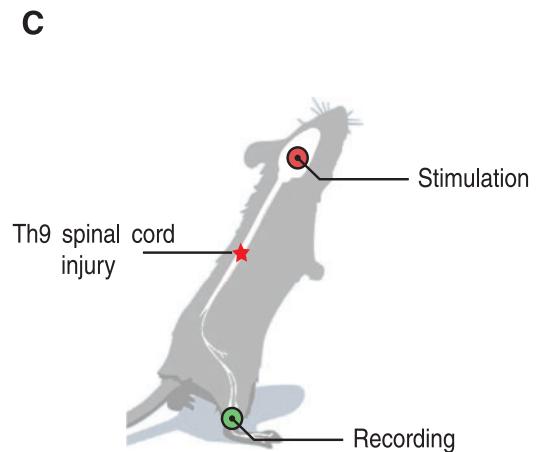


FIG. 4. Deletion of ADAMTS4 in primary bOEC cultures increases functional and electro physiological recoveries following spinal cord injury (SCI). Quantification of locomotor activities: (A) quantification of horizontal activity and (B) total distance traveled, 15, 30, and 60 days after SCI and transplantation in ADAMTS4^{+/+} and ADAMTS4^{-/-} transplanted animals. (C) Schematic representation of motor evoked potential (MEP) measurement. Stimulating electrodes were placed through the scalp to contact the periosteum and the recording electrode was placed into gastrocnemius muscle. (D) Quantification of MEP in the two experimental groups. Quantifications are expressed as average \pm standard error of the mean; $n = 10$ animals per group. Statistical evaluations were based on Wilcoxon-Mann-Whitney test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns = not significant). Color image is available online.

histological analyses on the same two groups of animals 60 days after SCI and transplantation. As the astrocytic and fibrotic components mainly compose the scar²³; we investigated this time-point for tissue repair (Fig. 5A-F). By analyzing the glial fibrillary acidic protein (GFAP)-negative area, our results show that in ADAMTS4^{-/-} bOECs transplanted mice (Fig. 5B), the astrocytic component (GFAP+ area) of the scar is larger than the one in ADAMTS4^{+/+} bOECs transplanted mice (Fig. 5A, 5C). Based on the quantification of the PDGFR β -positive area, our results did not show any difference regarding the fibrotic component of the scar between the two groups of mice (Fig. 5D-F).

Then, we analyzed the demyelinating/unmyelinating process, which takes place following SCI based on the quantification of the myelin basic protein-negative area. It appears, that in ADAMTS4^{-/-} bOECs transplanted mice (Fig. 5H), the demyelinated/unmyelinated area is smaller than the one observed in ADAMTS4^{+/+} bOECs transplanted mice (Fig. 5G, 5I).

Finally, to explore ECM modifications induce by ADAMTS4^{+/+} and ADAMTS4^{-/-} bOECs transplantation, we measured neurocan-positive ECM area (Fig. 5J-L). Our results show that neurocan-



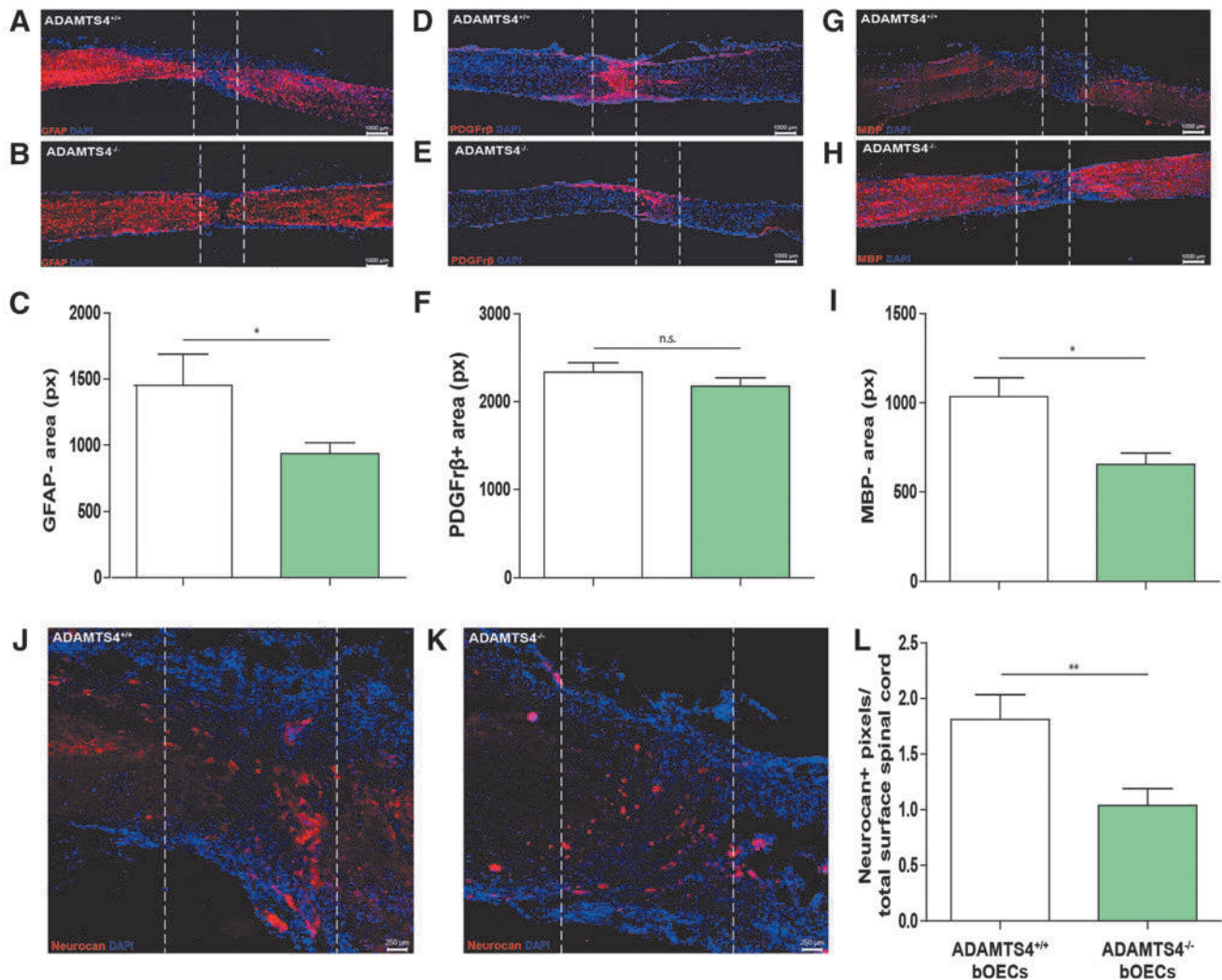


FIG. 5. Deletion of ADAMTS4 in primary bOEC cultures increases tissue repair following spinal cord injury (SCI). Representative pictures of sagittal spinal cord sections of (A, D, G, J) ADAMTS4^{+/+} and (B, E, H, K) ADAMTS4^{-/-} primary bOEC cultures transplanted animals 60 days after SCI and transplantation. Sections were stained with (A, B) glial fibrillary acidic protein (GFAP; D, E) PDGFR β , (G, H) myelin basic protein (MBP); (J, K) neurocan, and 4',6-diamidino-2-phenylindole. (A-C) Astrocytic negative area (GFAP-) and quantification of GFAP- area 60 days after SCI and transplantation. (D-F) Fibrosis area (PDGFR β +) and quantification of PDGFR β + area 60 days after SCI and transplantation. (G-I) Demyelinated/unmyelinated area (MBP-) and quantification of MBP- area sixty days after SCI and transplantation. (J-L) Neurocan positive extracellular matrix (ECM) area (neurocan+) and quantification of neurocan+ ECM area 60 days after SCI and transplantation. Scale bars are 1000 μ m (A, B, D, E, G, H) and 250 μ m (J, K). Dashed lines correspond to the injury site (A, B, D, E, G, H, J, K). Quantifications are expressed as average \pm standard error of the mean; $n=10$ animals per group. Statistical evaluations were based on Wilcoxon-Mann-Whitney test (* $p < 0.05$); ** $p < 0.01$; ns, not significant. Color image is available online.

positive ECM area in ADAMTS4^{+/+} bOECs transplanted mice (Fig. 5J) is larger than in ADAMTS4^{-/-} bOECs transplanted mice (Fig. 5K and 5L).

Discussion

In this study, we provide evidence that OECs properties can be enhanced by the deletion of ADAMTS4 gene expression. Indeed, our results show that *in vitro* primary ADAMTS4^{-/-} bOEC cultures show an upregulation of trophic factor genes (Fig. 2), and that *in vivo* the transplantation of ADAMTS4^{-/-} bOECs in a severe SCI model increases functional recovery and tissue repair (Fig. 4 and Fig. 5) without compromising the survival of the transplanted cells (Fig. 3). The main results of the study are summarized in Figure 6.

To date, there is no treatment that can be proposed to paraplegic or tetraplegic patients. However, several studies have recently demonstrated the proof of principle that different strategies can be considered as relevant. Newly, it has been proposed to modulate the scar that takes place after SCI and in particular to decrease its fibrotic component.²⁴ Indeed, in using optogenetic tools, it has been demonstrated that the reduction of the fibrotic core into the lesion scar enhances axonal regrowth and functional recovery.²⁴ Although such innovative therapy will be very promising in a near future, currently it can be difficult to apply to a large cohort of patients.

Cell therapies have been proposed for SCI treatments and have been advanced quickly in recent years.¹⁷ A wide variety of cells has been used in order to treat SCI; however, few of them

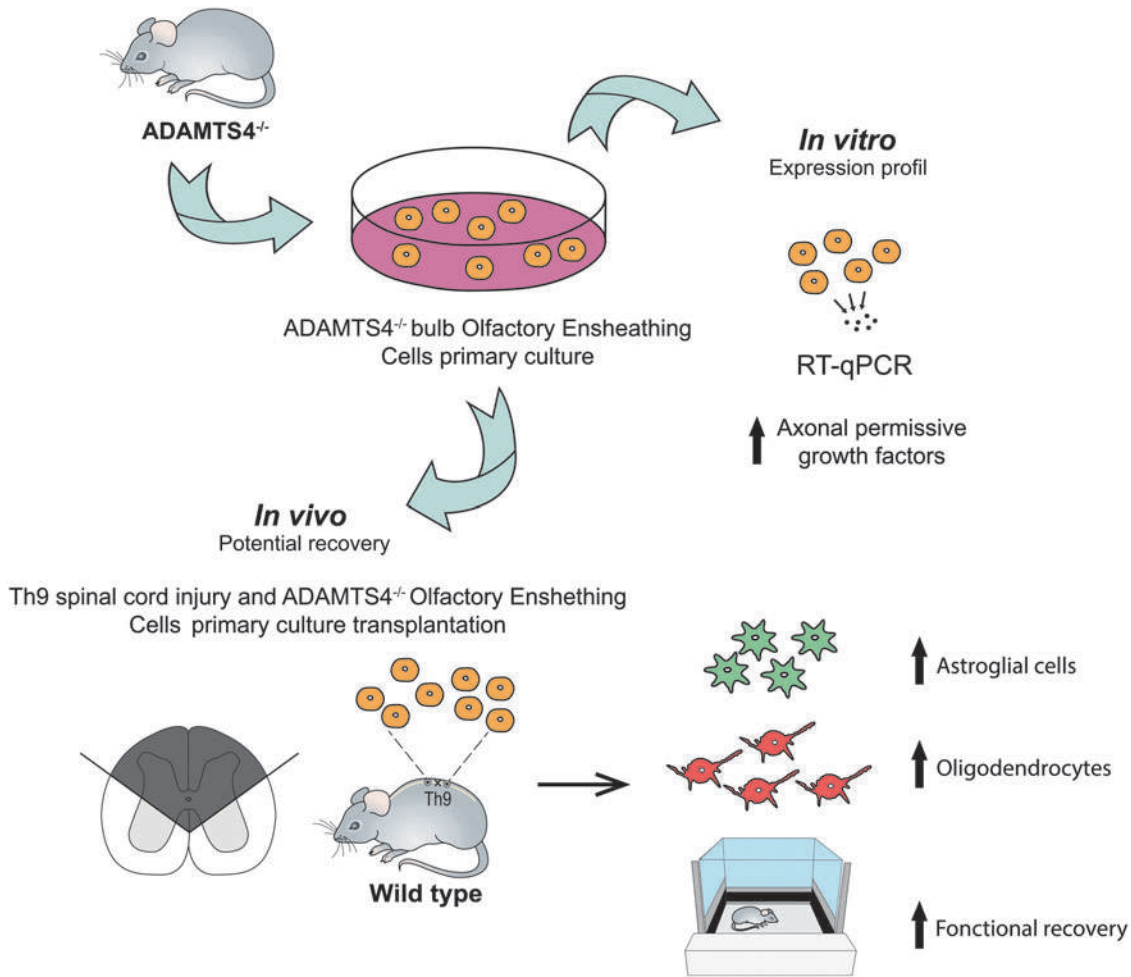


FIG. 6. Summary of the main results of the study. *In vitro*, primary bOEC cultures obtained from ADAMTS4^{-/-} mice express more axonal growth permissive molecules genes. These cells were transplanted into lesioned mice in a model of severe spinal cord injury performed at Th9 level. *In vivo*, transplantation of ADAMTS4^{-/-} primary bOEC cultures induces tissues repair by increasing astroglial cells contribution to the injury site and by decreasing demyelinating/unmyelinating process, both leading to functional recovery. Color image is available online.

has shown benefits after transplantation in a clinical human context. OECs transplantation has been applied a few years ago to a paraplegic patient and has demonstrated real functional benefits for this patient, with an improvement of his American Spinal Injury Association score from A to C.⁹ However, in this study the treatment used was complex, based on bOEC transplantations with peripheral nerve bridging, making it difficult to reproduce. That is why it is of primary importance to first propose OECs transplantation as a realistic therapy to enhance their properties.

In our study, to maximize the effects of the transplanted cells, we based our transplantation protocol on a meta-analysis in which the authors describe the most effective way to transplant OECs after SCI, with rostro-caudal injections, with small volumes of injection, and with OECs cultures obtained from olfactory bulb.²⁵

Specifically, it has been shown recently that axonal regrowth and functional recovery can be greatly improved after SCI by administering it in a time- and spatial-specific manner with an appropriate combination of growth factors and chemoattractant molecules.²⁶ Based on these results, we hypothesized that modulating the expres-

sion of neurotrophic factors secreted by OECs can improve, in the same way, tissue repair and functional recovery after SCI and transplantation. First, to validate our hypothesis, we performed quantitative polymerase chain reaction on a list of genes of axon growth inhibitory and axon growth permissive molecules. It appears that the deletion of ADAMTS4^{-/-} in primary bOEC cultures mainly enhances the expression of these genes of axon growth permissive molecules, validating our main hypothesis.

Then, we transplanted ADAMTS4^{-/-} bOECs in lesioned mice and we demonstrated that the deletion of ADAMTS4 leads to an improvement of electrophysiological and functional recoveries compared with the ADAMTS4^{+/+} bOECs transplanted group. Moreover, to correlate these functional and electrophysiological recoveries, we performed immunohistochemistry analyses, and it appears that ADAMTS4^{-/-} bOECs transplantation increases tissue repair. In particular, our results demonstrate that ADAMTS4^{-/-} bOECs transplantation modulates glial scar in decreasing the GFAP-negative area into the lesion site and more interestingly, we demonstrated that ADAMTS4^{-/-} bOEC transplantation also decreases the demyelinated area and neurocan expression.

Previously, studies have reported that overexpression of trophic factors or chondroitinase ABC by OECs can enhance their properties.^{27–29} However, in these studies OECs have been modified by virus infections, leading to a safety concern in clinical trials. To our knowledge, our study is the first one reporting that OECs properties could be easily enhanced by ADAMTS4 deletion.

Altogether, our study reveals, for the first time, that the potential of primary bOECs transplantation can be enhanced by inhibition of the expression of ADAMTS4. Indeed, in our study, ADAMTS4^{-/-} primary bOEC cultures upregulate their trophic factors expression leading to an increase after SCI and transplantation of functional recovery and tissue repair.

Acknowledgments

We are grateful to Prof. Denis Vivien for sharing the ADAMTS4^{+/-} transgenic mouse line.

This research was supported by ADIR association, Fondation de l'Avenir and IRME association. CC and NG are supported by European Union and Normandie Regional Council. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Funds (ERDF).

Behavioral studies and processing were conducted with the support of equipment from the Behavioural Analysis Platform SCAC (University of Rouen, Normandy, France).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Supplementary Material

Supplementary Figure S1
Supplementary Figure S2
Supplementary Figure S3

References

- Westgren, N. and Levi, R. (1998). Quality of life and traumatic spinal cord injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 79, 1433–1439.
- Sofroniew, M.V. (2018). Dissecting spinal cord regeneration. *Nature* 557, 343–350.
- Grégoire, C.-A., Goldenstein, B.L., Floriddia, E.M., Barnabé-Heider, F., and Fernandes, K.J.L. (2015). Endogenous neural stem cell responses to stroke and spinal cord injury. *Glia* 63, 1469–1482.
- Gómez, R.M., Sánchez, M.Y., Portela-Lomba, M., Ghotme, K., Barreto, G.E., Sierra, J., and Moreno-Flores, M.T. (2018). Cell therapy for spinal cord injury with olfactory ensheathing glia cells (OECs). *Glia* 66, 1267–1301.
- Assinck, P., Duncan, G.J., Hilton, B.J., Plemel, J.R., and Tetzlaff, W. (2017). Cell transplantation therapy for spinal cord injury. *Nat. Neurosci.* 20, 637–647.
- Barnabé-Heider, F. and Frisén, J. (2008). Stem cells for spinal cord repair. *Cell Stem Cell* 3, 16–24.
- Tetzlaff, W., Okon, E.B., Karimi-Abdolrezaee, S., Hill, C.E., Sparling, J.S., Plemel, J.R., Plunet, W.T., Tsai, E.C., Baptiste, D., Smithson, L.J., Kawaja, M.D., Fehlings, M.G., and Kwon, B.K. (2011). A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 28, 1611–1682.
- Mayeur, A., Duclos, C., Honoré, A., Gauberti, M., Drouot, L., do Rego, J.-C., Bon-Mardion, N., Jean, L., Vérin, E., Emery, E., Lemarchant, S., Vivien, D., Boyer, O., Marie, J.-P., and Guérout, N. (2013). Potential of olfactory ensheathing cells from different sources for spinal cord repair. *PLoS One* 8, e62860.
- Tabakow, P., Raisman, G., Fortuna, W., Czyz, M., Huber, J., Li, D., Szweczyk, P., Okurowski, S., Miedzybrodzki, R., Czapiaga, B., Salomon, B., Halon, A., Li, Y., Lipiec, J., Kulczyk, A., and Jarmundowicz, W. (2014). Functional regeneration of supraspinal connections in a patient with transected spinal cord following transplantation of bulbar olfactory ensheathing cells with peripheral nerve bridging. *Cell Transplant.* 23, 1631–1655.
- Tabakow, P., Jarmundowicz, W., Czapiaga, B., Fortuna, W., Miedzybrodzki, R., Czyz, M., Huber, J., Szarek, D., Okurowski, S., Szweczyk, P., Gorski, A., and Raisman, G. (2013). Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury. *Cell Transplant.* 22, 1591–1612.
- Guérout, N., Derambure, C., Drouot, L., Bon-Mardion, N., Duclos, C., Boyer, O., and Marie, J.P. (2010). Comparative gene expression profiling of olfactory ensheathing cells from olfactory bulb and olfactory mucosa. *Glia* 58, 1570–1580.
- Wright, A.A., Todorovic, M., Tello-Velasquez, J., Rayfield, A.J., St John, J.A., and Ekberg, J.A. (2018). Enhancing the therapeutic potential of olfactory ensheathing cells in spinal cord repair using neurotrophins. *Cell Transplant.* 27, 867–878.
- Lemarchant, S., Pomeschik, Y., Kidin, I., Kärkkäinen, V., Valonen, P., Lehtonen, S., Goldsteins, G., Malm, T., Kanninen, K., and Koistinaho, J. (2016). ADAMTS-4 promotes neurodegeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurodegener.* 11, 10.
- Lemarchant, S., Dunghana, H., Pomeschik, Y., Leinonen, H., Kolesowska, N., Korhonen, P., Kanninen, K.M., García-Berrocso, T., Montaner, J., Malm, T., and Koistinaho, J. (2016). Anti-inflammatory effects of ADAMTS-4 in a mouse model of ischemic stroke. *Glia* 64, 1492–1507.
- Lemarchant, S., Wojciechowski, S., Vivien, D., and Koistinaho, J. (2017). ADAMTS-4 in central nervous system pathologies. *J. Neurosci. Res.* 95, 1703–1711.
- Honoré, A., Le Corre, S., Derambure, C., Normand, R., Duclos, C., Boyer, O., Marie, J.-P., and Guérout, N. (2012). Isolation, characterization, and genetic profiling of subpopulations of olfactory ensheathing cells from the olfactory bulb. *Glia* 60, 404–413.
- Anderson, M.A., Burda, J.E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T.M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B.S., Deming, T.J., and Sofroniew, M.V. (2016). Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 532, 195–200.
- Sabelström, H., Stenudd, M., Réu, P., Dias, D.O., Elfineh, M., Zdunek, S., Damberg, P., Göritz, C., and Frisén, J. (2013). Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science* 342, 637–640.
- Li, X., Floriddia, E.M., Toskas, K., Chalfouh, C., Honoré, A., Aumont, A., Vallières, N., Lacroix, S., Fernandes, K.J.L., Guérout, N., and Barnabé-Heider, F. (2018). FoxJ1 regulates spinal cord development and is required for the maintenance of spinal cord stem cell potential. *Exp. Cell Res.* 368, 84–100.
- Li, X., Floriddia, E.M., Toskas, K., Fernandes, K.J.L., Guérout, N., and Barnabé-Heider, F. (2016). Regenerative potential of ependymal cells for spinal cord injuries over time. *EBioMedicine* 13, 55–65.
- Takano, M., Kawabata, S., Shibata, S., Yasuda, A., Nori, S., Tsuji, O., Nagoshi, N., Iwanami, A., Ebise, H., Horiuchi, K., Okano, H., and Nakamura, M. (2017). Enhanced functional recovery from spinal cord injury in aged mice after stem cell transplantation through HGF induction. *Stem Cell Reports* 8, 509–518.
- Amadio, S., Pluchino, S., Brini, E., Morana, P., Guerriero, R., Martinelli Boneschi, F., Comi, G., Zaratini, P., Muzio, V., and del Carro, U. (2006). Motor evoked potentials in a mouse model of chronic multiple sclerosis. *Muscle Nerve* 33, 265–273.
- Stenudd, M., Sabelström, H., and Frisén, J. (2015). Role of endogenous neural stem cells in spinal cord injury and repair. *JAMA Neurol.* 72, 235–237.
- Dias, D.O., Kim, H., Holl, D., Werne Solnestam, B., Lundeberg, J., Carlén, M., Göritz, C., and Frisén, J. (2018). Reducing pericyte-derived scarring promotes recovery after spinal cord injury. *Cell* 173, 153–165.
- Watzlawick, R., Rind, J., Sena, E.S., Brommer, B., Zhang, T., Kopp, M.A., Dirnagl, U., Macleod, M.R., Howells, D.W., and Schwab, J.M. (2016). Olfactory ensheathing cell transplantation in experimental spinal cord injury: effect size and reporting bias of 62 experimental treatments: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Biol.* 14, e1002468.

26. Anderson, M.A., O'Shea, T.M., Burda, J.E., Ao, Y., Barlately, S.L., Bernstein, A.M., Kim, J.H., James, N.D., Rogers, A., Kato, B., Wollenberg, A.L., Kawaguchi, R., Coppola, G., Wang, C., Deming, T.J., He, Z., Courtine, G., and Sofroniew, M.V. (2018). Required growth facilitators propel axon regeneration across complete spinal cord injury. *Nature* 561, 396–400.
27. Cao, L., Liu, L., Chen, Z.Y., Wang, L.M., Ye, J.L., Qiu, H.Y., Lu, C.L., and He, C. (2004). Olfactory ensheathing cells genetically modified to secrete GDNF to promote spinal cord repair. *Brain* 127, 535–549.
28. Ma, Y.H., Zhang, Y., Cao, L., Su, J.C., Wang, Z.W., Xu, A.B., and Zhang, S.C. (2010). Effect of neurotrophin-3 genetically modified olfactory ensheathing cells transplantation on spinal cord injury. *Cell Transplant.* 19, 167–177.
29. Carwardine, D., Wong, L.F., Fawcett, J.W., Muir, E.M., and Granger, N. (2016). Canine olfactory ensheathing cells from the olfactory mucosa can be engineered to produce active chondroitinase ABC. *J. Neurol. Sci.* 367, 311–318.

Address correspondence to:
Nicolas Guéroul, PhD
Normandie University
UNIROUEN, EA3830-GRHV
76000 Rouen, France

E-mail: nicolas.gueroul@univ-rouen.fr

6.5 Projet III

Resident neural stem cells guarantee the regeneration promoted by bulbar olfactory ensheathing cell transplantation after spinal cord injury

**Xiaofei Li*, Axel Honore*, Quentin Delarue*, Chaima Chalfouh, Marine Di Giovanni,
David Vaudry, Mathieu Salaun, Jean-Paul Marie, Fanie Barnabé-Heider, Nicolas
Guérout**

En cours de finalisation pour une future soumission.

Alors que la plupart des études se concentrent sur le potentiel thérapeutique des CGO et ses effets neurorégénératifs et immunomodulateurs dans le cadre des LMTs, rares sont celles qui se sont intéressées au mode d'action des CGO après transplantation. Ce projet de recherche s'inscrit ainsi dans ce cadre précis ; en se basant sur l'hypothèse que les effets bénéfiques de la transplantation des CGO, décrits dans la littérature, pourraient être la conséquence d'une interaction des CGO, de manière directe ou indirecte, avec les cellules souches endogènes de la moelle, à savoir les cellules épendymaires.

Ce projet interne au laboratoire a été conduit sous la direction du Dr. Guérout et a fait l'objet de la thèse du Dr. Axel Honoré. Le travail consistait à mettre en commun les connaissances établies grâce aux deux projets précédents ; notre expertise dans le domaine des cellules souches endogènes de la moelle et leur réactivité suite à la lésion médullaire, ainsi que les différentes études internes du laboratoire explorant les différentes thérapies cellulaires et en particulier l'utilisation des CGO [186, 255, 256].

En effet, plusieurs études ont montré l'effet de la transplantation des CGO dans le cadre des LMTs, en décrivant leur capacité à induire la repousse axonale permettant la préservation cellulaire au niveau du site de la lésion [257].

Notre étude se base sur l'utilisation de deux lignées de souris transgéniques hFoxJ1-CreER^{T2}::YFP, permettant le suivi spécifique des cellules épendymaires et leurs progénies, et la lignée hFoxJ1-CreER^{T2}::YFP-Rasless, qui inhibe le cycle cellulaire des cellules épendymaires sous la dépendance de la recombinaison Cre activée par le tamoxifène.

Ces deux lignées ont été divisées en deux groupes, contrôle nommée « DF10S » et transplanté nommée « bOEC ». Ces deux groupes de souris ont subi, par la suite, une hémisection thoracique, suivie de deux injections de milieu de culture pour le contrôle ou de CGO issues d'une culture primaire de bulbes olfactifs pour le groupe transplanté.

L'effet de la transplantation de CGO sur les cellules souches médullaires a été évalué *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, l'effet des CGO sur le potentiel souche des cellules épendymaires a été étudié via des cultures de neurosphères obtenues à partir de moelle de souris WT une semaine après lésion. Ainsi, il a été montré que la transplantation de CGO augmente le nombre de neurosphères obtenues chez le groupe transplanté comparé au groupe contrôle. Ces résultats ont été confirmés également *in vivo*, chez les souris hFoxJ1-CreER^{T2}::YFP où il a été observé une augmentation du taux de prolifération des cellules épendymaires recombinées EDU⁺/YFP⁺ chez le groupe bOEC, deux semaines après la lésion.

L'évaluation de la multi potentialité des cellules souches a été évaluée via des tests *in vitro* de différenciation des neurosphères, générées à partir des premières neurosphères. Ces expériences ont montré une augmentation de la différenciation des cellules vers un profil neuronal (Tuj1⁺) chez le groupe transplanté. *In vivo*, les quantifications deux semaines après la lésion, nous ont montré qu'à la suite de la transplantation, les cellules épendymaires se différencient plus en astrocytes (GFAP⁺) au niveau du site de la lésion, contribuant ainsi à la formation de la cicatrice médullaire.

À la suite de ces résultats et en se basant sur l'étude d'Anderson et al. montrant qu'après une lésion médullaire les astrocytes secrètent à la fois des facteurs inhibiteurs à la repousse axonale mais également des facteurs permissifs [148], nous avons réalisé une étude du profil d'expression de ces mêmes facteurs par PCR quantitative. Ceci nous a montré que les facteurs inhibiteurs de la repousse axonale sont diminués chez les souris WT lésées transplantées par rapport aux animaux contrôles. Suite à ces analyses de gènes, des quantifications du taux de survie des neurones résidents ont été effectuées, nous avons pu constater ainsi une augmentation du nombre de neurones dans le groupe transplanté par rapport au groupe contrôle. Ces résultats peuvent expliquer les effets de la transplantation de CGO décrits dans la littérature sur la repousse axonale et la récupération fonctionnelle et consolident ainsi l'hypothèse que les CGO modifient le microenvironnement lésionnel en le rendant plus permissif.

Afin d'investiguer si ces effets nécessitent la présence des cellules épendymaires ou bien si les CGO « seules » peuvent induire ces effets, nous avons reconduit ces expériences, mais en utilisant des souris hFoxJ1-CreER^{T2}::YFP-Rasless. Ainsi, dans ce modèle, nous avons montré que la transplantation de CGO n'influait plus l'expression des facteurs inhibiteurs ou permissifs à la repousse axonale. De la même façon, dans ce modèle, la transplantation de CGO n'avait pas d'influence sur la survie neuronale. Ceci nous laisse suggérer que l'action des CGO est médiée par les cellules épendymaires.

Pour conclure, cette étude a montré l'effet de la transplantation de CGO sur le potentiel souche des cellules épendymaires qui se trouve augmenté *in vitro* et *in vivo*, ainsi que sur leur capacité à induire une différenciation de ces cellules souches endogènes, après leur migration au site de la lésion, vers un profil astrocytaire. Nous avons également montré que les CGO transplantées après une lésion médullaire peuvent créer un microenvironnement permissif pour la repousse axonale, favorisant la survie des neurones. Enfin, notre étude a montré que l'effet des CGO est « cellules épendymaires dépendant ».

Des études single cell sont en cours de réalisation afin de finaliser cette étude, dans le but de caractériser au mieux l'effet des transplantations de CGO sur les cellules épendymaires. Pour ce faire, des tris cellulaires au FACS ont été effectués afin de récupérer spécifiquement les cellules épendymaires et leur progénie sur la base de l'expression de marqueurs fluorescents (tdTomato) chez des souris lésées et lésées transplantées. Ces cellules tdTomato positives serviront à réaliser des études de single cell par le biais de la technique Smart-Seq3. Ces expériences seront réalisées en collaboration avec la plateforme SciLife du Karolinska Institutet.

**Resident neural stem cells guarantee the regeneration promoted by bulbar olfactory
ensheathing cell transplantation after spinal cord injury**

**Xiaofei Li^{1*†}, Axel Honore^{2*}, Quentin Delarue^{2*}, Chaima Chalfouh², Marine Di
Giovanni³, David Vaudry³, Mathieu Salaun⁴, Jean-Paul Marie², Fanie Barnabé-Heider¹⁻⁵,
Nicolas Guérout^{1,2†}**

¹Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, 17177 Stockholm, Sweden.

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

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

⁴Normandie Univ, UNIROUEN, LITIS EA 4108, 76000 Rouen, France. Institute for Research
and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000 Rouen, France.

⁵Department of Neurosciences, Research Center of the University of Montreal Hospital
(CRCHUM), QC H2X 0A9 Montreal, Canada.

*Equal contribution

Address correspondence to:

†Corresponding authors.

Lead contact: Nicolas Guérout (nicolas.guerout@univ-rouen.fr);

Co-correspondance: Xiaofei Li (xiaofei.li@ki.se)

ABSTRACT

Both cell transplantation and modulating endogenous neural stem cells have raised great hope for regenerative medicine. Recently, clinical data showed that autologous transplantation of bulbar olfactory ensheathing cells (bOECs) enhanced substantial functional recovery in human. However, the cellular mechanisms behind the effects of transplanted bOECs on the injured spinal cord are still poorly understood, which leads to the difficulty in clinical repetitions. Ependymal cells, the endogenous spinal cord stem cells, are shown essential for tissue restriction and neuronal survival after spinal cord injury (SCI). By using FoxJ1-CreER^{T2}-YFP mice to fate-map ependymal cells, we found that bOECs transplantation enhances the stem cell potential of ependymal cells after SCI both *in vivo* and *in vitro*, and it modulates microenvironment for better axonal regrowth and neuronal survival. Surprisingly, by using FoxJ1-Rasless mice to specifically block ependymal cell proliferation, we no longer observed the regenerative effects promoted by bOECs transplantation. Altogether, our data provide a model that the bOECs transplantation therapy is dependent on the activated ependymal cells for the enrichment of the microenvironment and promoting neuronal survival after SCI.

Key words: Ependymal cells; olfactory ensheathing cell; self-renewal; differentiation; spinal cord injury.

INTRODUCTION

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

The success of novel therapies will most likely require a combinatorial approach because the mechanisms of cellular and functional loss upon injury are complex and evolve overtime. The key factors leading to the lack of complete regeneration and recovery of function are the formation of an inhibitory glial environment, neural cell death, demyelination, axonal degeneration and lack of regrowth and inflammatory response (Barnabe-Heider and Frisen, 2008). Therefore, cell transplantation has been proposed as a source to alleviate this cellular loss (Barnabe-Heider and Frisen, 2008). To date, a wide variety of cells has been used as biotherapies to cure SCI in different animal paradigms (Assinck et al., 2017; Barnabe-Heider and Frisen, 2008; Tetzlaff et al., 2011). Specifically, olfactory ensheathing cells (OECs) have been shown to enhance recovery and could be a very attractive therapeutic approach (Mayeur et al., 2013). Indeed, OECs transplantations have been applied to a paraplegic patient in a clinical trial study and have shown beneficial effects (Tabakow et al., 2013). However, due to the lack of mechanisms of the contribution of endogenous spinal cord cells in response to the therapy, even though other patients that received similar OECs transplantation also achieved

significant recovery, their recoveries did not reach the same level of the patient previously reported (Wang et al., 2016).

One advantage of OECs transplantation is that these cells are differentiated glial cells and thus cannot give rise to other cell types nor arise risks for teratoma formation after transplantation (Khazaei et al., 2016). Therefore, in both animal and human trials, the most possible relevant mechanisms of regeneration promoted by OECs transplantation could be the recruitment and activation of endogenous stem and progenitor cells by OECs. Previous fate-mapping studies using transgenic mouse models based on CreER driven by FoxJ1 promoter reveal that since juvenile stage, ependymal cells are the spinal cord stem cells and can give rise to astrocytes and oligodendrocytes after SCI (Barnabe-Heider et al., 2010; Li et al., 2018b; Li et al., 2016; Meletis et al., 2008). Moreover, it has been shown that using a FoxJ1-Rasless mouse model in which ependymal cell proliferation is specifically blocked upon SCI, ependymal cells play a critical role in glial scar formation and are required for neuronal survival adjacent to the lesion (Sabelstrom et al., 2013). These studies confirm that ependymal cells are required for glial scar formation and to maintain the integrity of the injured spinal cord. On the other hand, it has been shown that OECs transplantation can allow better axonal regrowth by reducing the intensity of glial scar, in which differentiated ependymal cells are one of the key components (Burda and Sofroniew, 2014; Sabelstrom et al., 2013; Zukor et al., 2013). These studies further suggest that OECs could have modulation effects on the endogenous stem and glial cells.

In this study, we took advantage of inducible FoxJ1 transgenic mouse lines to investigate the response of ependymal cells after SCI and OECs transplantation. We used bulbar OECs (bOECs) for transplantation upon SCI and found that bOECs can activate and recruit endogenous ependymal stem cells after SCI in both *in vivo* and *in vitro* experiments. The

transplantation of bOECs can modulate the microenvironment to be more permissive for axonal regrowth and also increase neuronal survival together with ependymal cells. Moreover, by using FoxJ1-Rasless mice to specifically block the proliferation of ependymal cells, we no longer observed the effects regarding microenvironment enrichment and neuronal survival in the absence of proliferating ependymal cells. Our data suggest that bOECs *per se* are insufficient to achieve beneficial effects for injured spinal cord, while the regenerative and neuroprotective effects by bOECs transplantation are dependent on ependymal cells after SCI.

Altogether, our data provide a new model to potentially explain the effects by some cell transplantation therapies. We propose that activated ependymal cells are playing an essential role for the effects by bOECs transplantation therapy, which further inspires the next generation therapeutic possibilities for SCI.

Materials and methods

Animals

All experiments were conducted in accordance with the guidelines of the French Board of Agriculture. We used two mouse lines in this study, including randomized grouped male and female. In addition, a Luciferase (LUX) thereafter mouse line Tg(CAG-luc,-GFP)L2G85Chco^{+/+} (FVB-Tg(CAG-luc,-GFP)L2G85Chco/J), was also used (Cao et al., 2004; Sheikh et al., 2007).

Adult mice tamoxifen-inducible FoxJ1-CreER^{T2} (Jacquet et al., 2011; Jacquet et al., 2009; Ostrowski et al., 2003), with a C57BL/6 genetic background were crossed with Rosa26-YFP reporter mice. FoxJ1-CreER^{T2}-Rasless-YFP mice were used to conditionally delete the N-, K-, H-ras genes to block the proliferation of ependymal cells upon tamoxifen administration (Sabelstrom et al., 2013). To induce recombination, we injected 60 mg/kg of body weight once daily for 5 days. Clearance of tamoxifen was allowed for one week before the start of the SCI experiments.

Primary olfactory bulb culture and cell transplant preparation

Olfactory bulb (OB) primary cultures were prepared as described previously by our team with slight modifications (Guerout et al., 2010; Honore et al., 2012). Mice were killed by lethal dose of sodium pentobarbital (150 mg/kg body weight) and decapitated. OB were immediately dissected and placed into Hank's buffered salt solution (HBSS) after removing meninges. HBSS containing 0.1% of trypsin (Invitrogen) and OB were incubated for 20 min at 37°C. Trypsinization was stopped by adding Dulbecco's Modified Eagle's/Ham's F12 medium (D.M.E.M/F12, Invitrogen), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (F.B.S, Invitrogen) and 0.5% penicillin/streptomycin (Invitrogen) (DF-10S). The tissue was centrifuged at 1.500 RPM for 5 min, resuspended in DF-10S and centrifuged again. Tissue was then triturated using a micropipette, until a homogenous cell suspension was obtained. Cells were plated in DF-10S

in 75 cm² flasks (SARSTED). The flasks were incubated at 37°C, 5% CO₂. The medium was changed every two days. Ten days after plating, OB primary cultures (bOECs) were confluent. Before surgery, cultures were trypsinized to remove them from the dishes, and the cells were counted using a hemocytometer. bOECs cultures cells were resuspended in DF-10S at concentration of 25 000 cells/μL. DF-10S was used as control group.

Surgical procedure and cell transplantation

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

After surgery, mice were placed back in their home cages. Mice underwent daily checks for general health, mobility within the cage, wounds, swelling or infections. The animals showed

neither skin lesions, infection nor autophagy throughout the study. Bladders were manually expressed after operation until needed.

EdU, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (0,075mg/mL and 1% of sucrose, life) was administered with drinking water, exchanged every third day and kept in the dark. Following SCI, EdU was given twice by intraperitoneal injections (1,5mg/mL in PBS, 100 μ L per injection) at 6 hours interval, followed by administration in the drinking water for up to 7 days.

Neural Stem Cells Cultures

Animals were sacrificed one week after SCI. Spinal cord cells were dissociated and neurosphere cultures were established as described (Li et al., 2016; Meletis et al., 2008). All cells isolated from one spinal cord were plated in 75 cm² culture dishes. First, neurospheres were harvested after 2 weeks in culture and then were dissociated into single cells for passage or differentiation. Approximately 100,000 cells per animal were plated in a 25 cm² culture dish for the next generation of neurospheres, and all the new neurospheres (second, third and fourth generations) were harvested after one week in culture. Dissociated primary neurospheres, approximately 70,000 cells/well, were plated in poly-L-lysine-coated chamber slides (Sigma) for differentiation with growth factors-free medium supplemented with 1% fetal bovine serum. Two to four independent experiments per group were performed. After 2 weeks in differentiation condition, immunocytochemistry was performed as described (Supplementary Figure 1).

Bioluminescence imaging

An *in vivo* XTREM 4XP spectrum cooled charge-coupled device optical macroscopic imaging system (Brucker, Billerica, MA, USA) was used for bioimaging. The bOECs were injected into the injured spinal cord with D-Luciferin (150 ng/ml), and the photon counts were examined on day 1. Thereafter, the survival of the bOECs was monitored for 2 weeks via intraperitoneal

injections of D-Luciferin (0.3 mg/g body weight) and measurements of the photon counts as previously described using Bruker molecular imaging software (Takano et al., 2017).

Immunohistochemistry

Animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (150 mg/kg body weight) and perfused transcardially with PBS followed by ice-cold 4% formaldehyde in PBS. Dissected spinal cords were post-fixed overnight at 4°C and cryoprotected in 30% sucrose solution in PBS. The tissues were embedded into OCT (Tissue-Tek[®], Sakura). Coronal and sagittal 20µm sections were collected alternating on ten (8-10 sections per slide). Sections were incubated with blocking solution (10 % Normal Donkey serum, 0.3% Triton-X100), then incubated overnight at room temperature in a humidified chamber with primary antibodies diluted in blocking solution. The following antibodies were used (Supplementary figure 1). EdU was detected with the Click-iT[®] EdU Alexa Fluor[®] 594 imaging kit (Invitrogen) using the Manufacturer's instructions. After washing, antibody staining was revealed using species-specific fluorophore-conjugated (Cy3, Cy5 or Alexa 488 from Jackson Immuno Research) secondary antibodies. Sections were counterstained with DAPI (1µg/mL) and sections were coverslipped with Vectashield mounting media (Vector Labs). Pictures were taken using a Zeiss LMS700 microscope. Image processing and assembly was performed in ImageJ or Photoshop.

Image acquisition analysis

Confocal representative images of the lesion site and spinal cords were acquired using the Zeiss LSM700 or Zeiss LSM800 microscope set up.

SCI and transplantation studies used coronal sections for analysis. For cell culture analysis, 6-8 randomly selected views per well were used for analysis, and at least 3 wells per animal were used for statistical analysis. Quantification of the number of cells were performed using the Zeiss Apotome2 microscope set up. The quantification of cells was performed in 2-4 sections per animal. For each experimental group and staining, 3-9 animals were analyzed.

Real time PCR

Real time PCR experiments were performed to evaluate the level of mRNA expression of the axonal growth inhibitory and axonal growth permissive molecules and also neurotrophic factors. Mice were killed 2 weeks after SCI and spinal cord were immediately dissected on dry ice. Total RNAs from these tissues samples were extracted using Tri-reagent (Sigma) and Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. From each sample, 1.5 µg of total RNA was converted into single stranded cDNA using the ImPromII reverse transcriptase kit (Promega) with random primers (0.5µg/ml). Real time PCR experiments were performed and monitored by ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Life Technologies). The primer pairs used for the different genes analyses have been previously described (Anderson et al., 2016; Sabelstrom et al., 2013). Mouse glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA was used as control. Relative expression between a given sample and a reference sample was calculated using the $2^{-\Delta Ct}$ method, where ΔCt is the difference in the Ct values for the target gene and the reference gene.

Statistical analysis

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

RESULTS

Transplantation of bOECs increases ependymal cell proliferation self-renewal capacity

Before to study the effects of bOECs transplantations on endogenous cell types, we first evaluated the survival of bOECs after transplantation in non-immunodeficiency mice. We isolated bOECs from luciferase animals (Cao et al., 2004; Sheikh et al., 2007) and transplanted the luciferase+ bOECs into WT animals after SCI. As previously described by others, transplanted bOECs stayed in the spinal cord without obvious migration and significantly reduced their number after 2 weeks post injury (Figure 1A-B).

To evaluate the control group, we compared FoxJ1-CreER^{T2}-YFP mice with or without DF10S media injection without SCI, and observed that the DF-10S injection did not induce any cellular response of ependymal cells or astrocytes in the uninjured spinal cord (Data not shown). It has been shown that in intact spinal cord, ependymal cells around central canal rarely divide but they start proliferating vigorously after SCI (Barnabe-Heider et al., 2010; Meletis et al., 2008). To investigate whether bOECs transplantation after SCI affects ependymal cell proliferation both *in vivo* and *in vitro*, after tamoxifen administration and clearance period, we transplanted bOECs from WT mice into FoxJ1-CreER^{T2}-YFP mice (both mice share C57BL/6 genetic background) and labeled the proliferative cells with EdU administration via drinking water during 1 week. We found that SCI leads to a strong incorporation of EdU in recombined ependymal lineage cells ($72,5 \pm 1,745\%$) while even significantly more in the transplantation group ($83,07 \% \pm 0,913\%$) (Figure 1 C-E), suggesting that bOECs transplantations after SCI enhance the proliferative potential of ependymal cells *in vivo*. The same experiments were performed to FoxJ1-CreER^{T2}-YFP mice without injury, but bOECs transplantations do not induce higher ependymal cell proliferation *in vivo*, compared to uninjured mice without bOECs transplantation (Data not shown).

We next assessed the spinal cord self-renewal potential after OECs transplantation *in vitro*. We used the same surgical protocol as described above. It has been proved that the stem cell potential is confined to ependymal cells *in vitro* (Barnabe-Heider et al., 2010). To study whether bOECs transplantations would change this potential of ependymal cells or other cell types, we performed neurosphere assay in FoxJ1-CreER^{T2}-YFP. After tamoxifen injection and surgical procedure, dissociated spinal cord were cultured to produce neurospheres (Figure 1F) and a small piece of cervical biopsy was kept for *in vivo* comparison. We found that bOEC transplantation does not change the stem cell potential of ependymal cells, nor promote another stem cell niches with or without SCI. Indeed, the recombination patterns of *in vivo* and *in vitro* were the same in the primary neurospheres, suggesting that all the *in vivo* recombined ependymal cells give rise to neurospheres in both groups (Figure 1G). Moreover, 100% of the second and third neurospheres were YFP positive, indicating that the stem cell potential is only confined to ependymal cells upon bOECs transplantation (Figure 1H). These recombination patterns are similar to the ones previously described in uninjured and injured animals without bOECs transplantation (Barnabe-Heider et al., 2010; Li et al., 2016).

We then further studied the effects of bOECs on self-renewal potential of ependymal cells *in vitro*. We performed neurosphere assay with WT animals under four conditions, including 1) no injury as baseline, 2) SCI with DF10S, 3) no injury but with bOECs transplantation and 4) SCI with bOECs transplantation. We quantified and compared the total number of generated neurospheres per 100,000 cells for each passage and set the group with no injury nor bOECs as one fold (Figure 1I-L). We found that SCI results in two times more neurospheres than healthy control, while bOECs transplantation after SCI can lead to double amount of neurospheres compared to SCI group. Interestingly, without SCI, the self-renewal potential of ependymal cells was also able to be activated highly as the SCI group, suggesting that either SCI or bOECs transplantation is sufficient to increase the self-renewal potential, while the effect reaches the

highest level after both SCI and bOECs transplantation. As previously described, self-renewal potential gradually becomes constant over passages regardless of the paradigm tested (Figure 1I-L) (Li et al., 2016). Therefore, these *in vivo* and *in vitro* data indicate that bOECs transplantations in spinal cord can highly enhance the self-renewal potential of ependymal cells.

bOECs transplantation changes ependymal cell progeny

It has been previously shown that after SCI, proliferative ependymal cells leave the central canal, differentiate into glial cell lineage and migrate to the lesion site (Barnabe-Heider et al., 2010; Meletis et al., 2008; Sabelstrom et al., 2013). We further investigated the effects of bOECs transplantation on the fate of ependymal progeny after spinal cord dorsal hemisection (T9-T10). FoxJ1-CreER^{T2}-YFP mice were used to fate map the ependymal cells and follow the activation, migration and differentiation of their progeny after SCI *in vivo*. Two weeks and fourteen weeks after surgery, we sacrificed the animals and performed immunohistochemistry analysis. We found that 2 weeks after SCI, ependymal cells start to leave the central canal and migrate to the lesion site in both DF10S and bOECs transplantation groups (Figure 2A, E). Similarly to previous studies (Barnabe-Heider et al., 2010), we observed that the ependymal progeny highly express Sox9 in both DF10S and bOECs groups at around 80%, while no significance was found between the proportion of YFP+Sox9+ or YFP+Olig2+ costaining. However, while it was consistent with previous study that ependymal lineage gives rise to around 15%-20% GFAP+ cells (Barnabe-Heider et al., 2010), we found that there was almost three times more YFP+GFAP+ cells in bOECs group than DF10S group ($45.0 \pm 4.5\%$ V.S. $15.5 \pm 1.9\%$), suggesting that bOECs induce more ependymal cells to differentiate into astrocytes, but not more oligodendrocytes (Figure 2A-I). After 14 weeks, a higher proportion of YFP+Sox9+ cells was observed in transplanted group in comparison to control group while no significance was observed in YFP+GFAP+ cells (Figure 2A-H, J), which is probably due to the decrease of GFAP expression of reactive astrocytes after the glial scar is formed. These data

suggest that bOEC transplantation strongly induces an astrocytic differentiation of ependymal cells *in vivo* (Figure 2I-J).

To further investigate whether bOECs transplantation affects stem cell differentiation *in vitro*, we performed differentiation assay on the neurospheres derived from ependymal cells as previously described (Meletis et al., 2008). Neurospheres from spinal cord display multipotency and can give rise to astrocytes, oligodendrocytes and neurons *in vitro* (Barnabe-Heider et al., 2010; Li et al., 2018a; Li et al., 2016). After differentiation of the primary neurospheres (Figure 2K-M), we used antibody CNPase to identify oligodendrocyte lineage and Tuj1 for neuronal lineage respectively. Similarly to previous studies (Li et al., 2018b; Li et al., 2016), adult spinal cord neurospheres generate a low proportion of CNPase+ cells at around 0.5% (Figure 2K and N), which significantly increased and was doubled after SCI (Figure 2N), regardless of bOECs transplantations. On the contrary, bOECs transplantation significantly increased the proportion of Tuj1+ cells compare to the non-transplantation groups in both uninjured conditions (from $1.3 \pm 0.06\%$ to $3.6 \pm 0.61\%$) and injured conditions (from $2.3 \pm 0.17\%$ to $3.8 \pm 0.23\%$), respectively (Figure 2O). These data suggest that bOECs transplantation increases neuronal differentiation while SCI increases oligodendrocytic differentiation of ependymal cells *in vitro*.

bOECs transplantation enriches the scar environment for axonal regrowth

It has been suggested that after SCI, astrocytes become reactive and contribute to the inhibitory glia scar by assembling and secreting a large amount of CSPG (Chondroitin Sulfate Proteoglycan) that act as the major barrier for regenerating axons (Cregg et al., 2014; O'Shea et al., 2017). It has been also described that ependymal cells derived astrocytes do not contribute to the production of axonal growth-inhibiting CSPG (Meletis et al., 2008). As bOECs transplantation increases the differentiation of ependymal cells progeny to astrocytes (Figure 2F and I), we further assessed whether these ependymal cells-derived astrocytes after bOECs

transplantations are CSPG producing astrocytes. We analyzed the expression of Neurocan, one major inhibitory produced CSPG upon SCI (Jones et al., 2003). 2 weeks after SCI, we found that some YFP+GFAP+ cells in SCI with DF10S control group had expression of Neurocan, while bOECs transplantation group had almost none expression in the lesion core (Figure 3A-B), suggesting that bOECs further decrease the expression of Neurocan by the astrocytes derived from ependymal cells. To further study more broadly whether bOECs transplantation induces a more axonal regrowth permissive micro-environment by modulating scar formation, we performed qPCR experiments for a number of axonal growth permissive and inhibitory molecules, using the similar list reported recently (Anderson et al., 2016) (Figure 3C-D, Supplementary figure 2). Taking advantage of this list of axonal growth permissive and inhibitory genes, we took the lesion tissues of WT animals 2 weeks after SCI with and without bOECs transplantation for qPCR, and we compared to uninjured WT animals used as control (baseline, indicated as dashed line in figures) (Anderson et al., 2016) (Supplementary Figure 2). Similarly to previous study, we found in both groups, independently of bOECs transplantation, that SCI induces an increase of the axonal growth permissive genes (Anderson et al., 2016). Even though bOECs transplantation induces a decrease in the expression of a small number of the axonal growth permissive genes, most of the genes in this category were found unchanged with or without bOECs transplantation (Figure 3C). However, 9 out of 10 genes from the top 10 axonal growth inhibitory genes list were significantly down regulated in bOECs group (Figure 3D), and 8 of these genes had an dramatically decreased expression level down to the ones of uninjured animals (Figure 3D). These results suggest that bOECs transplantation enriches the microenvironment of the injured spinal cord for better axonal regrowth, partly by inhibiting the expression of axonal growth inhibitory molecules.

bOECs transplantation promotes neuronal survival after SCI

Previous study showed that ependymal cells secrete neurotrophic factors to maintain neuronal survival after SCI (Sabelstrom et al., 2013). Our study showed that bOECs increase the proliferation of ependymal cells (Figure 1). Therefore, we analyze whether the increased number of ependymal cells by bOECs transplantation can promote better neuronal survival. Our data showed that the number of NeuN+ cells decreased over time (from 2-14 weeks after SCI) in the SCI+DF10S group, while the survived neurons maintained their cell numbers 14 weeks after SCI with bOECs transplantation (Figure 3E-G), suggesting that bOECs transplantation increased neuronal survival, probably due to the effect of increasing the ependymal cell proliferation.

The endogenous ependymal cells are required for regenerative effects promoted by bOECs transplantation

As ependymal cells were found to be vital for neuronal survival by modulating the microenvironment after SCI (Sabelstrom et al., 2013), while the number of ependymal cells can be expanded after bOECs transplantation (Figure 1), it is thus unknown whether the beneficial effects shown after bOECs transplantation is independent from the increased number of ependymal cells. Therefore, we took advantage of another transgenic mouse model FoxJ1-Rasless to specifically ablate the proliferation of ependymal cells and thereby block the generation of ependymal cell progeny upon injury (Sabelstrom et al., 2013). We transplanted the same number of bOECs into FoxJ1-Rasless animals like the ones into WT animals, and found that the bOECs also decreased significantly during a two-week post-transplantation period but with more substantial loss than the ones in WT (Figure 4A-B).

To study the role of bOECs transplantation on spinal cord microenvironment, we took advantage of the list of axonal growth permissive and axonal growth inhibitory genes again as

shown in Figure 3. Our qPCR experiments on lesioned FoxJ1-Rasless animals 2 weeks after SCI with and without bOECs transplantations showed that in this FoxJ1-Rasless model, bOECs transplantation fails to modulate axonal growth inhibitory genes (Figure 4C-D), differently from that in FoxJ1-CreER^{T2}-YFP mice (Figure 3D), suggesting that ependymal cells are required to proceed the axonal regrowth effects by bOECs transplantation. Moreover, we investigated whether the neuronal protection effects by bOECs transplantation is also dependent on ependymal cells. We used both FoxJ1-CreER^{T2}-YFP and FoxJ1-Rasless animals for SCI and bOECs transplantations at 2 and 14 weeks after SCI, and we compared the neuronal survival levels. We found that 2 weeks after SCI, bOECs transplantation achieved neuronal protection more significantly than DF10S group after SCI in FoxJ1-CreER^{T2}-YFP mice, but failed to do so in the absence of proliferative ependymal cells in FoxJ1-Rasless mice where the cell cycle of ependymal cells is blocked (Figure 4E). We also found the similar consequence of neuronal survival 14 weeks after SCI and transplantation, regarding the failure of neuroprotection with bOECs (Figure 4F). These data suggest that ependymal cells are required for neuronal protection, and play an essential role in promoting neuronal survival and microenvironment modulation by bOECs transplantation.

DISCUSSION

In this study, we provide evidence that activated ependymal cells are required as an essential player to guarantee to process the effects by bOECs transplantation. By using different transgenic mouse models, we have discovered that 1) bOECs transplantation can enhance the stem cell potential of spinal cord stem cell after SCI; 2) bOECs transplantation modulates microenvironment for better axonal regrowth and neuronal survival; and 3) the beneficial effects on the injured spinal cord by bOECs transplantation are dependent on the activated spinal cord stem cells.

It has been widely shown that OECs transplantation is an attractive therapy for SCI treatment, in both animal models and clinical trials. These studies showed that OECs can secrete factors that promote axonal regrowth and improve functional recovery (Lakatos et al., 2000; Polentes et al., 2004; Ramon-Cueto et al., 1998; Stamegna et al., 2011; Tabakow et al., 2013; Tabakow et al., 2014; Wang et al., 2016; Yamamoto et al., 2009). However, the survival of OECs is relatively short after transplantation for just 2 weeks (Khankan et al., 2016), while the recovery could be present during months. Therefore, it is unclear whether these beneficial effects on the injured spinal cord are directly from OECs, or are dependent on other cell types that are modulated by OECs and further proceed a prolonged effect. Previous discoveries have demonstrated that spinal cord stem cell potential is confined to ependymal cells around the central canal, and confirmed that ependymal cells are essential for glial scar formation and neuronal survival after SCI (Barnabe-Heider et al., 2010; Sabelstrom et al., 2013). In our study, taking advantage of FoxJ1-CreER^{T2}-YFP mice to lineage trace ependymal cells, we showed that bOECs increase the proliferation and astrocytic differentiation of ependymal cells *in vivo* while enhance self-renewal potential of ependymal cells *in vitro*, suggesting that bOECs can modulate ependymal cells to better proliferate and contribute to the glial scar formation. These data suggest that bOECs transplantation can modulate endogenous stem cells, and further

provide a potential explanation of the prolonged effects after transplanted bOECs disappear *in vivo*.

Whether more astrocytes derived from ependymal cells after bOECs transplantation is beneficial for the SCI recovery is a concern due to the potential inhibitory effect of axonal regrowth. Indeed, it has been widely studied that the glial scar, mainly formed by astrocytes, displays a role in inhibiting axonal regrowth (Burda and Sofroniew, 2014; Zukor et al., 2013). However, even though astrocytes in the glial scar secrete both inhibitory and promoting axonal regrowth factors after SCI, recent studies show that depleting astrocytes or ependymal cell-derived astrocytes after SCI leads to a severer injury (Anderson et al., 2016; Sabelstrom et al., 2013). In our study, we showed that there is a higher number of astrocytes derived from ependymal cells after bOECs transplantation but they do not exhibit Neurocan expression, suggesting that this population of astrocytes derived from ependymal cells may not inhibit axonal regrowth. As we found higher number of ependymal cell-derived astrocytes after SCI upon bOECs transplantation, these astrocytes could be very beneficial for the reinforcement of the spinal cord.

Taken the list of gene expression of permissive and inhibitory axonal growth molecules previously reported (Anderson et al., 2016), our qPCR data showed that most of the genes of inhibitory axonal growth showed significantly lower expression after bOECs transplantation. However, by using FoxJ1-Rasless mice to specifically block the cell cycle of ependymal cells, we did not find obvious differences of the gene expression profiles regarding permissive and inhibitory axonal growth between DF10S and bOECs transplantation groups after SCI, suggesting that ependymal cells are required for bOECs transplantation to modulate the microenvironment for axonal regrowth. Furthermore, it has been shown that ependymal cells are required for neuronal survival after SCI due to their regulation of the expression of

neurotrophic factors (Sabelstrom et al., 2013). We observed that more survived neurons in the injured spinal cord in bOECs group both 2 weeks and 14 weeks after SCI since bOECs can expand the pool of ependymal cells, but this is only shown in the presence of proliferative ependymal cells. Indeed, in the absence of ependymal cells in FoxJ1-Rasless animals, no significance regarding the neuronal survival levels was found in the injured spinal cord between bOECs transplantation and DF10S groups, suggesting that ependymal cells are required for the neuronal protection effects promoted by bOECs transplantation treatments.

In addition, in the field of cell therapy for SCI, it is mainly proposed in two directions: to modulate the endogenous stem cells or cell transplantations (Assinck et al., 2017; Barnabe-Heider and Frisen, 2008; Gomez et al., 2018; Stenudd et al., 2015). However, even though endogenous stem and progenitor cells can be modulated by conditional knockout specific genes (Dias et al., 2018; North et al., 2015), it is still difficult to apply these means for treatments in the therapeutic perspective due to current technical limitations. On the other hand, bOECs transplantation has been shown for promoting regeneration potentials of the injured spinal cord without having risks of uncontrollable cell growth and fates like stem cells (Khazaei et al., 2016). Our study provides a practical way to use cell therapy to modulate endogenous stem cells for potential SCI cures.

Altogether our study reveals, for the first time, that bOECs transplantation activates endogenous ependymal cells, which in return, guarantee the enrichment of microenvironment and neuronal survival after SCI. Our data propose a model that ependymal cells possess an essential role in process the effects promoted by cell transplantation therapies for SCI treatments. This project is paving the way of a new concept in biotherapy field focusing on activation, recruitment and modulation of endogenous spinal cord stem cells for future SCI therapeutic possibilities.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. Jonas Friséen for sharing the FoxJ1-CreER^{T2}-YFP and FoxJ1-Rasless transgenic mouse lines as well as critical comments, and to Célia Duclos for her technical support.

FUNDING SOURCES

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

CONFLICTS OF INTEREST

We declare no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

N.G. conceptualized the project.

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

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

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

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

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

Ahuja, C.S., Wilson, J.R., Nori, S., Kotter, M.R.N., Druschel, C., Curt, A., and Fehlings, M.G. (2017). Traumatic spinal cord injury. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17018.

Anderson, M.A., Burda, J.E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T.M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B.S., Deming, T.J., and Sofroniew, M.V. (2016). Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 532, 195-200.

Assinck, P., Duncan, G.J., Hilton, B.J., Plemel, J.R., and Tetzlaff, W. (2017). Cell transplantation therapy for spinal cord injury. *Nat Neurosci* 20, 637-647.

Barnabe-Heider, F., and Frisen, J. (2008). Stem cells for spinal cord repair. *Cell Stem Cell* 3, 16-24.

Barnabe-Heider, F., Goritz, C., Sabelstrom, H., Takebayashi, H., Pfrieder, F.W., Meletis, K., and Frisen, J. (2010). Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell* 7, 470-482.

Burda, J.E., and Sofroniew, M.V. (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81, 229-248.

Cao, Y.A., Wagers, A.J., Beilhack, A., Dusich, J., Bachmann, M.H., Negrin, R.S., Weissman, I.L., and Contag, C.H. (2004). Shifting foci of hematopoiesis during reconstitution from single stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 221-226.

Cregg, J.M., DePaul, M.A., Filous, A.R., Lang, B.T., Tran, A., and Silver, J. (2014). Functional regeneration beyond the glial scar. *Exp Neurol* 253, 197-207.

Dias, D.O., Kim, H., Holl, D., Werne Solnestam, B., Lundeberg, J., Carlen, M., Goritz, C., and Frisen, J. (2018). Reducing Pericyte-Derived Scarring Promotes Recovery after Spinal Cord Injury. *Cell* 173, 153-165 e122.

Gomez, R.M., Sanchez, M.Y., Portela-Lomba, M., Ghotme, K., Barreto, G.E., Sierra, J., and Moreno-Flores, M.T. (2018). Cell therapy for spinal cord injury with olfactory ensheathing glia cells (OECs). *Glia* 66, 1267-1301.

Guerout, N., Derambure, C., Drouot, L., Bon-Mardion, N., Duclos, C., Boyer, O., and Marie, J.P. (2010). Comparative gene expression profiling of olfactory ensheathing cells from olfactory bulb and olfactory mucosa. *Glia* 58, 1570-1580.

Honore, A., Le Corre, S., Derambure, C., Normand, R., Duclos, C., Boyer, O., Marie, J.P., and Guerout, N. (2012). Isolation, characterization, and genetic profiling of subpopulations of olfactory ensheathing cells from the olfactory bulb. *Glia* 60, 404-413.

Jacquet, B.V., Muthusamy, N., Sommerville, L.J., Xiao, G., Liang, H., Zhang, Y., Holtzman, M.J., and Ghashghaei, H.T. (2011). Specification of a Foxj1-dependent lineage in the forebrain is required for embryonic-to-postnatal transition of neurogenesis in the olfactory bulb. *J Neurosci* 31, 9368-9382.

Jacquet, B.V., Salinas-Mondragon, R., Liang, H., Therit, B., Buie, J.D., Dykstra, M., Campbell, K., Ostrowski, L.E., Brody, S.L., and Ghashghaei, H.T. (2009). FoxJ1-dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain. *Development* 136, 4021-4031.

Jones, L.L., Margolis, R.U., and Tuszynski, M.H. (2003). The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp Neurol* 182, 399-411.

Khankan, R.R., Griffis, K.G., Haggerty-Skeans, J.R., Zhong, H., Roy, R.R., Edgerton, V.R., and Phelps, P.E. (2016). Olfactory Ensheathing Cell Transplantation after a Complete Spinal Cord Transection Mediates Neuroprotective and Immunomodulatory Mechanisms to Facilitate Regeneration. *J Neurosci* 36, 6269-6286.

Khazaei, M., Ahuja, C.S., and Fehlings, M.G. (2016). Induced Pluripotent Stem Cells for Traumatic Spinal Cord Injury. *Front Cell Dev Biol* 4, 152.

Lakatos, A., Franklin, R.J., and Barnett, S.C. (2000). Olfactory ensheathing cells and Schwann cells differ in their in vitro interactions with astrocytes. *Glia* 32, 214-225.

Li, X., Floriddia, E.M., Toskas, K., Chalfouh, C., Honore, A., Aumont, A., Vallieres, N., Lacroix, S., Fernandes, K.J.L., Guerout, N., *et al.* (2018a). FoxJ1 regulates spinal cord development and is required for the maintenance of spinal cord stem cell potential. *Exp Cell Res* 368, 84-100.

Li, X., Floriddia, E.M., Toskas, K., Chalfouh, C., Honore, A., Aumont, A., Vallieres, N., Lacroix, S., Fernandes, K.J.L., Guerout, N., *et al.* (2018b). FoxJ1 regulates spinal cord development and is required for the maintenance of spinal cord stem cell potential. *Exp Cell Res.*

Li, X., Floriddia, E.M., Toskas, K., Fernandes, K.J.L., Guerout, N., and Barnabe-Heider, F. (2016). Regenerative Potential of Ependymal Cells for Spinal Cord Injuries Over Time. *EBioMedicine* 13, 55-65.

Mayeur, A., Duclos, C., Honore, A., Gauberti, M., Drouot, L., do Rego, J.C., Bon-Mardion, N., Jean, L., Verin, E., Emery, E., *et al.* (2013). Potential of olfactory ensheathing cells from different sources for spinal cord repair. *PLoS One* 8, e62860.

Meletis, K., Barnabe-Heider, F., Carlen, M., Evergren, E., Tomilin, N., Shupliakov, O., and Frisen, J. (2008). Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol* 6, e182.

North, H.A., Pan, L., McGuire, T.L., Brooker, S., and Kessler, J.A. (2015). beta1-Integrin alters ependymal stem cell BMP receptor localization and attenuates astrogliosis after spinal cord injury. *J Neurosci* 35, 3725-3733.

O'Shea, T.M., Burda, J.E., and Sofroniew, M.V. (2017). Cell biology of spinal cord injury and repair. *J Clin Invest* 127, 3259-3270.

Ostrowski, L.E., Hutchins, J.R., Zakel, K., and O'Neal, W.K. (2003). Targeting expression of a transgene to the airway surface epithelium using a ciliated cell-specific promoter. *Mol Ther* 8, 637-645.

Polentes, J., Stamegna, J.C., Nieto-Sampedro, M., and Gauthier, P. (2004). Phrenic rehabilitation and diaphragm recovery after cervical injury and transplantation of olfactory ensheathing cells. *Neurobiol Dis* 16, 638-653.

Ramon-Cueto, A., Plant, G.W., Avila, J., and Bunge, M.B. (1998). Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci* 18, 3803-3815.

Sabelstrom, H., Stenudd, M., Reu, P., Dias, D.O., Elfineh, M., Zdunek, S., Damberg, P., Goritz, C., and Frisen, J. (2013). Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science* 342, 637-640.

Sheikh, A.Y., Lin, S.A., Cao, F., Cao, Y., van der Bogt, K.E., Chu, P., Chang, C.P., Contag, C.H., Robbins, R.C., and Wu, J.C. (2007). Molecular imaging of bone marrow mononuclear cell homing and engraftment in ischemic myocardium. *Stem Cells* 25, 2677-2684.

Siddiqui, A.M., Khazaei, M., and Fehlings, M.G. (2015). Translating mechanisms of neuroprotection, regeneration, and repair to treatment of spinal cord injury. *Prog Brain Res* 218, 15-54.

Stamegna, J.C., Felix, M.S., Roux-Peyronnet, J., Rossi, V., Feron, F., Gauthier, P., and Matarazzo, V. (2011). Nasal OEC transplantation promotes respiratory recovery in a subchronic rat model of cervical spinal cord contusion. *Exp Neurol* 229, 120-131.

Stenudd, M., Sabelstrom, H., and Frisen, J. (2015). Role of endogenous neural stem cells in spinal cord injury and repair. *JAMA Neurol* 72, 235-237.

Tabakow, P., Jarmundowicz, W., Czapiga, B., Fortuna, W., Miedzybrodzki, R., Czyz, M., Huber, J., Szarek, D., Okurowski, S., Szewczyk, P., *et al.* (2013). Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury. *Cell Transplant* 22, 1591-1612.

Tabakow, P., Raisman, G., Fortuna, W., Czyz, M., Huber, J., Li, D., Szewczyk, P., Okurowski, S., Miedzybrodzki, R., Czapiga, B., *et al.* (2014). Functional regeneration of supraspinal connections in a patient with transected spinal cord following transplantation of bulbar olfactory ensheathing cells with peripheral nerve bridging. *Cell Transplant* 23, 1631-1655.

Takano, M., Kawabata, S., Shibata, S., Yasuda, A., Nori, S., Tsuji, O., Nagoshi, N., Iwanami, A., Ebise, H., Horiuchi, K., *et al.* (2017). Enhanced Functional Recovery from Spinal Cord Injury in Aged Mice after Stem Cell Transplantation through HGF Induction. *Stem Cell Reports* 8, 509-518.

Tetzlaff, W., Okon, E.B., Karimi-Abdolrezaee, S., Hill, C.E., Sparling, J.S., Plemel, J.R., Plunet, W.T., Tsai, E.C., Baptiste, D., Smithson, L.J., *et al.* (2011). A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury. *J Neurotrauma* 28, 1611-1682.

Wang, S., Lu, J., Li, Y.A., Zhou, H., Ni, W.F., Zhang, X.L., Zhu, S.P., Chen, B.B., Xu, H., Wang, X.Y., *et al.* (2016). Autologous Olfactory Lamina Propria Transplantation for Chronic Spinal Cord Injury: Three-

Year Follow-Up Outcomes From a Prospective Double-Blinded Clinical Trial. *Cell Transplant* 25, 141-157.

Westgren, N., and Levi, R. (1998). Quality of life and traumatic spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 79, 1433-1439.

Yamamoto, M., Raisman, G., Li, D., and Li, Y. (2009). Transplanted olfactory mucosal cells restore paw reaching function without regeneration of severed corticospinal tract fibres across the lesion. *Brain Res* 1303, 26-31.

Zukor, K., Belin, S., Wang, C., Keelan, N., Wang, X., and He, Z. (2013). Short hairpin RNA against PTEN enhances regenerative growth of corticospinal tract axons after spinal cord injury. *J Neurosci* 33, 15350-15361.

Figure legends

Figure 1. The transplantation of bOECs increases self-renewal capacity and proliferation of ependymal cells. A-B) Representative images of luciferase+ cells in WT mice 1 week and 2 weeks post-transplantation and quantification of luciferase signals. C-D) Representative confocal images of coronal section of adult lesioned spinal cord from FoxJ1-CreER^{T2}-YFP mice 2 weeks after SCI of DF10S (C) and bOECs mice (D). Scale bar: 25µm. E) Quantification of proliferating EdU+YFP+ positive recombined cells *in vivo* 2 weeks after SCI. Quantifications are expressed as average \pm SEM. N=5 animals. F) Representative confocal image of primary cultured recombined neurospheres from FoxJ1-CreER^{T2}-YFP injured mice. Scale bar: 200 µm. G) Quantification of *in vivo* recombined reporter+ cells and *in vitro* recombined neurospheres from FoxJ1-CreER^{T2}-YFP mice after bOECs transplantation from non-SCI and SCI mice. H) Comparative quantification of recombined neurospheres over passages from FoxJ1-CreER^{T2}-YFP mice after bOECs transplantation from non-SCI and SCI mice. I-L) Quantification of the total number of neurospheres derived from 100,000 cell over passages from SCI or uninjured WT mice that received DF10S or bOECs 1 week after injury. Quantifications are expressed as average \pm SEM. N=3-4 animals per analysis including at least two independent culture experiments were performed. *P<0.05, **P<0.01, and ***P<0.001.

Figure 2. bOECs transplantation changes ependymal cell progeny *in vivo* and *in vitro*. A-H) Representative confocal images of coronal section of adult lesioned spinal cord from FoxJ1-CreER^{T2}-YFP mice 2 weeks after SCI and injection of DF10S (A-D) and transplantation of bOECs (E-H). Scale bar: 200µm (A and E) and 50µm (B-D, F-H). Identification of cells derived from YFP+ recombined ependymal cells were identified by GFAP (B and F), Sox9 (C and G) and Olig2 (D and H). I-J) Quantification of double positive recombined cells in the spinal cord 2 weeks (I) and 14 weeks (J) after SCI. K-M) Representative confocal images of differentiated cells derived from primary neurospheres from WT adult mice one week after SCI from bOECs

mice. Scale bar: 25 μ m. N) Quantification of CNPase+ differentiated cells generated from primary neurospheres of adult WT mice from non SCI, non SCI+bOECs, SCI and SCI+bOECs mice. O) Quantification of Tuj1+ differentiated cells generated from primary neurospheres of adult WT mice from non SCI, non SCI+bOECs, SCI and SCI+bOECs mice. Quantifications are expressed as average \pm SEM. N=4-5 animals per analysis including at least two independent culture experiments were performed. *P<0.05, **P<0.01, and ***P<0.001.

Figure 3. bOECs transplantation enriches the scar environment for axonal regrowth. A-

B) Representative confocal images of longitudinal section of adult injured spinal cord from FoxJ1-CreER^{T2}-YFP mice 2 weeks after SCI of DF10S injection (A) and bOECs transplantation (B). Scale bar: 50 μ m. C-D) Histogram of mRNA expression of WT spinal cord of axon growth permissive molecules (C) and axon growth inhibitory molecules (D) after SCI. Asterisks indicate significant differences between SCI+DF10S (grey) and SCI+bOECs (blue) groups. E-F) Representative confocal images of coronal sections of adult injured spinal cord from FoxJ1-CreER^{T2}-YFP mice with neuronal survival staining (NeuN), under SCI+DF10S (E) and SCI+bOECs (F) condition. G) Quantification of the NeuN+ cells from WT mice 2 weeks and 14 weeks after SCI with DF10S or bOECs transplantation. *P<0.05, P-value column is the result of non-parametric t-test for comparison of the two groups. Dashed line correspond to mRNA expression from uninjured control WT mice. Quantifications are expressed as average \pm SEM. N=4 animals. *P<0.05.

Figure 4. bOECs transplantation and endogenous ependymal cells synergistically promote neuronal survival and the enrichment of microenvironment. A-B) Representative

images of luciferase+ cells in FoxJ1-Rasless mice 1 week and 2 weeks post-transplantation and quantification of luciferase signals. C-D) Histogram of expression of FoxJ1-CreER^{T2}-Rasless-YFP spinal cord of axonal growth permissive molecules (C) and axon-growth inhibitory molecules (D) after SCI. Asterisks indicate significant differences between SCI+DF10S (iced

blue) and SCI+bOECs (mauve) groups. E-F) Surviving NeuN+ cells in adult injured spinal cord from FoxJ1-CreER^{T2}-YFP and FoxJ1-Rasless mice 2 weeks (E) and 14 weeks (F) with bOECs transplantation.

Supplementary Figure 1. Antibody table. Details of sources and dilutions of antibodies used for histo/immunochemistry in this study.

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

Supplementary Figure 2. Table of genes for axonal growth inhibitory and axonal growth permissive molecules analyzed by qPCR. This table lists the genes abbreviation and full name of 43 axon-growth-modulating molecules for which gene expression levels were analyzed in this study (Anderson et al., 2016; Sabelstrom et al., 2013).

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

Figure 1

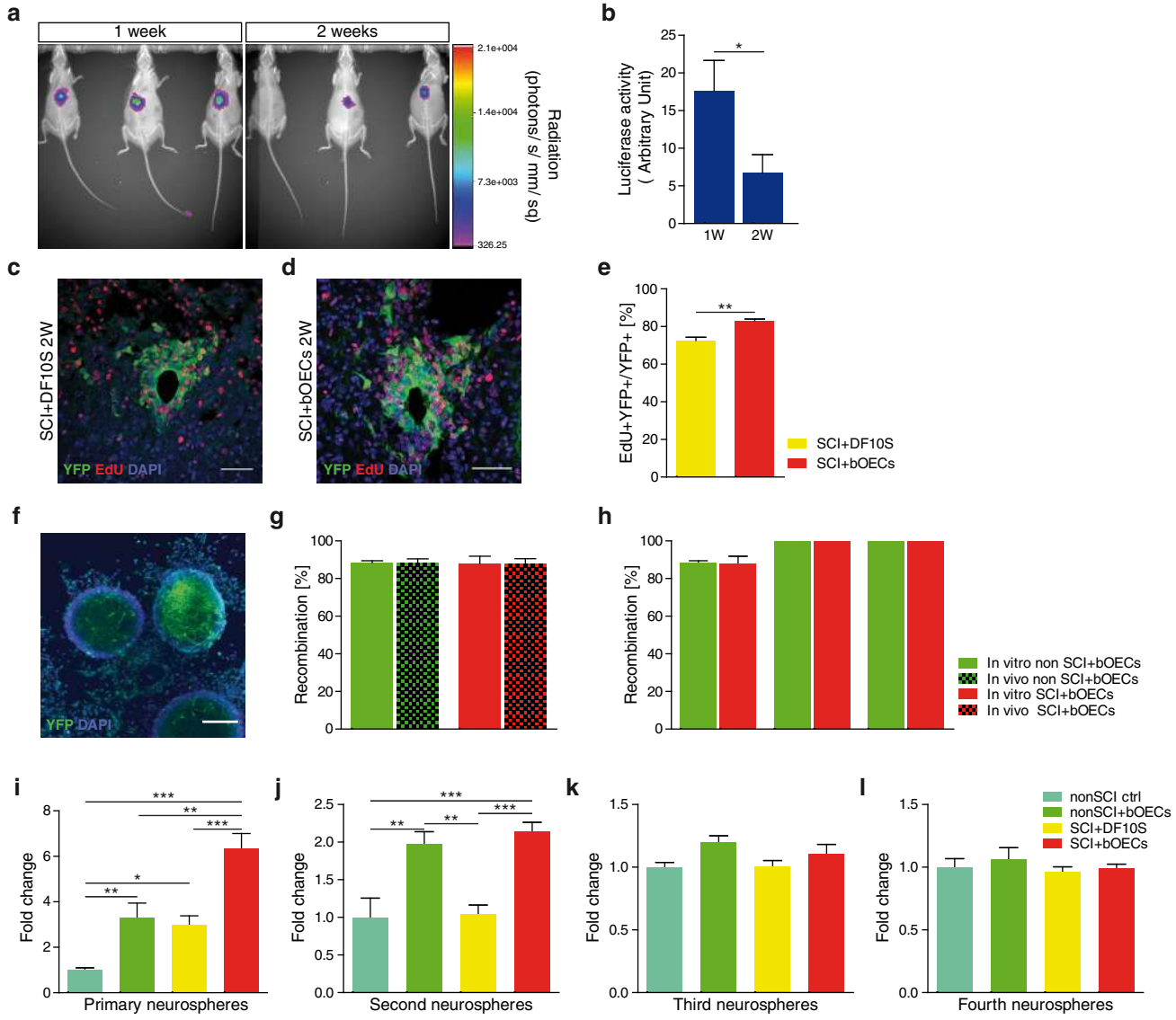


Figure 2

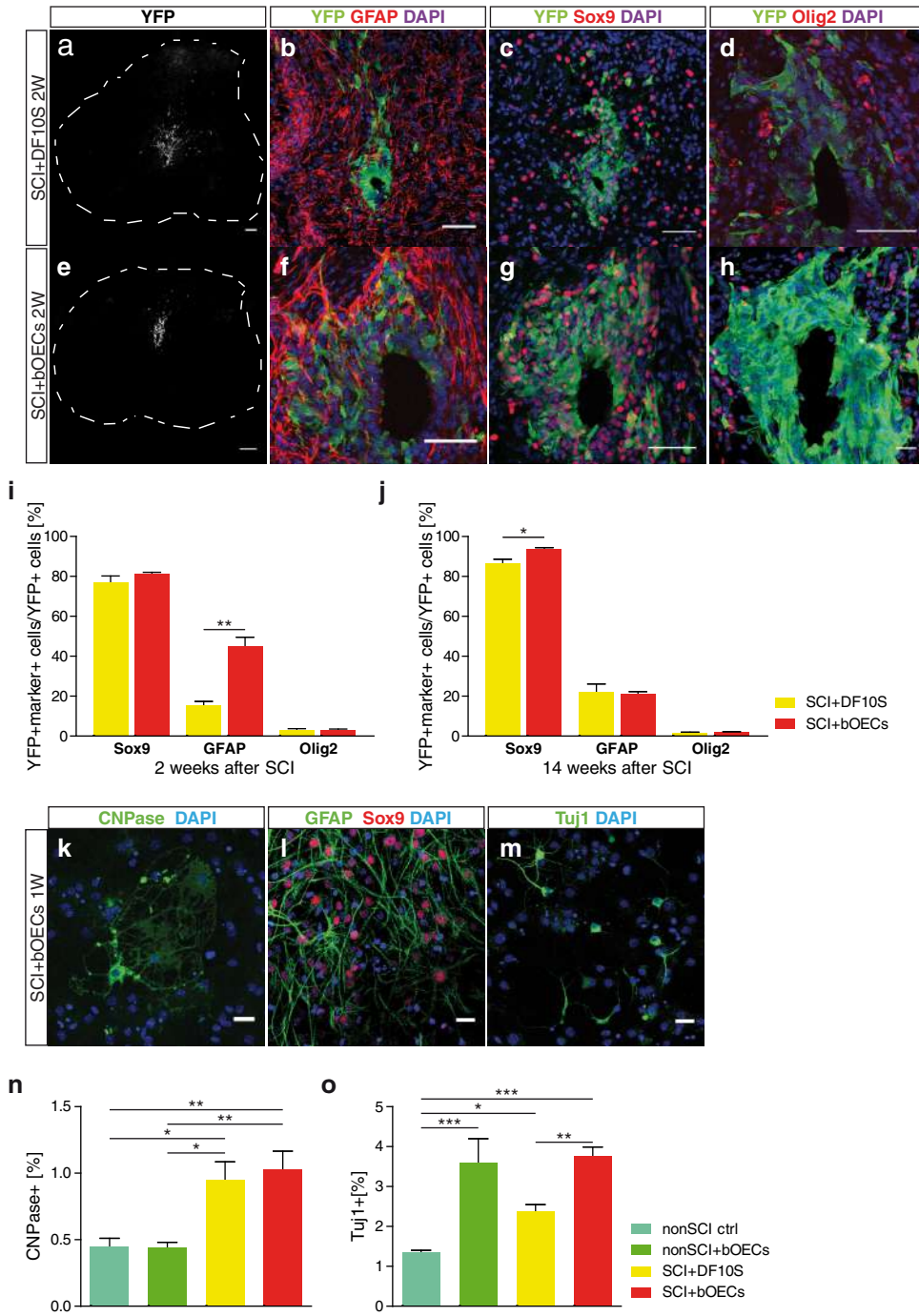
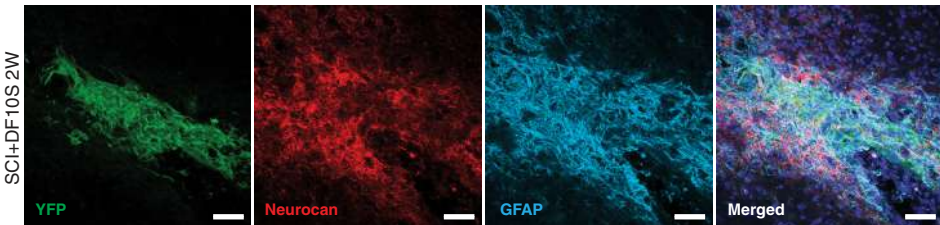
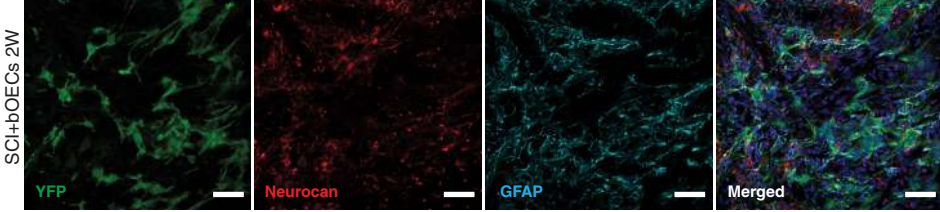


Figure 3

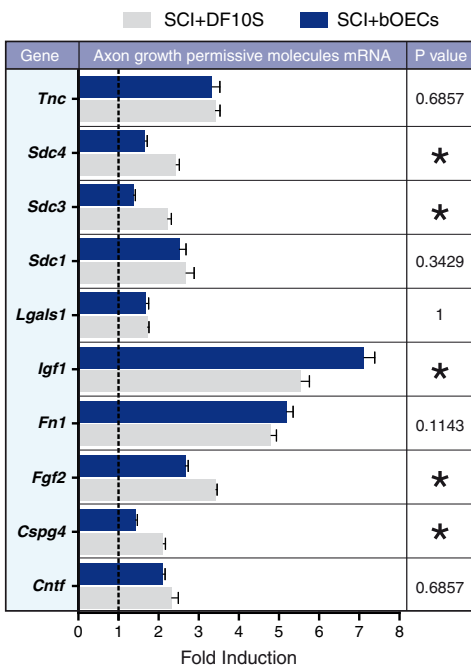
a



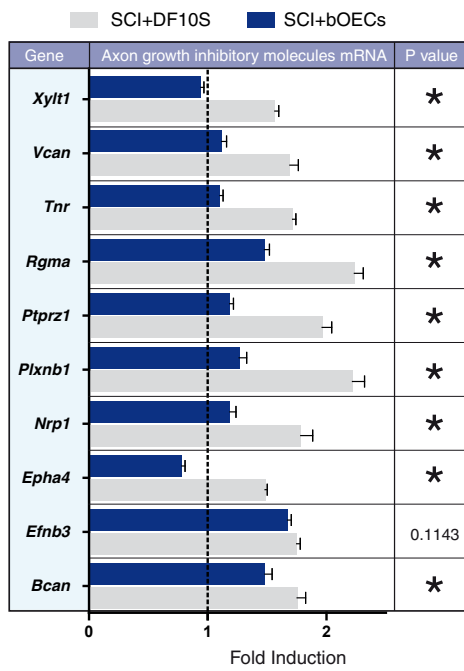
b



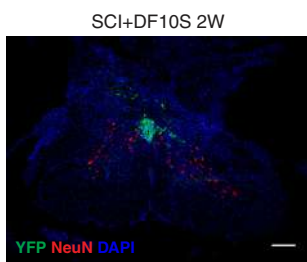
c



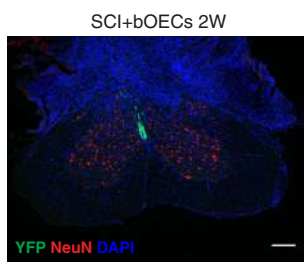
d



e



f



g

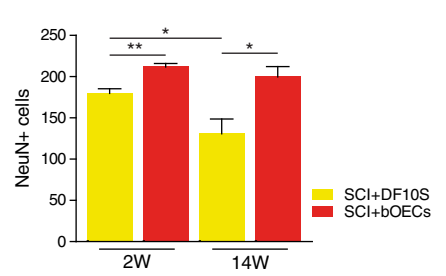
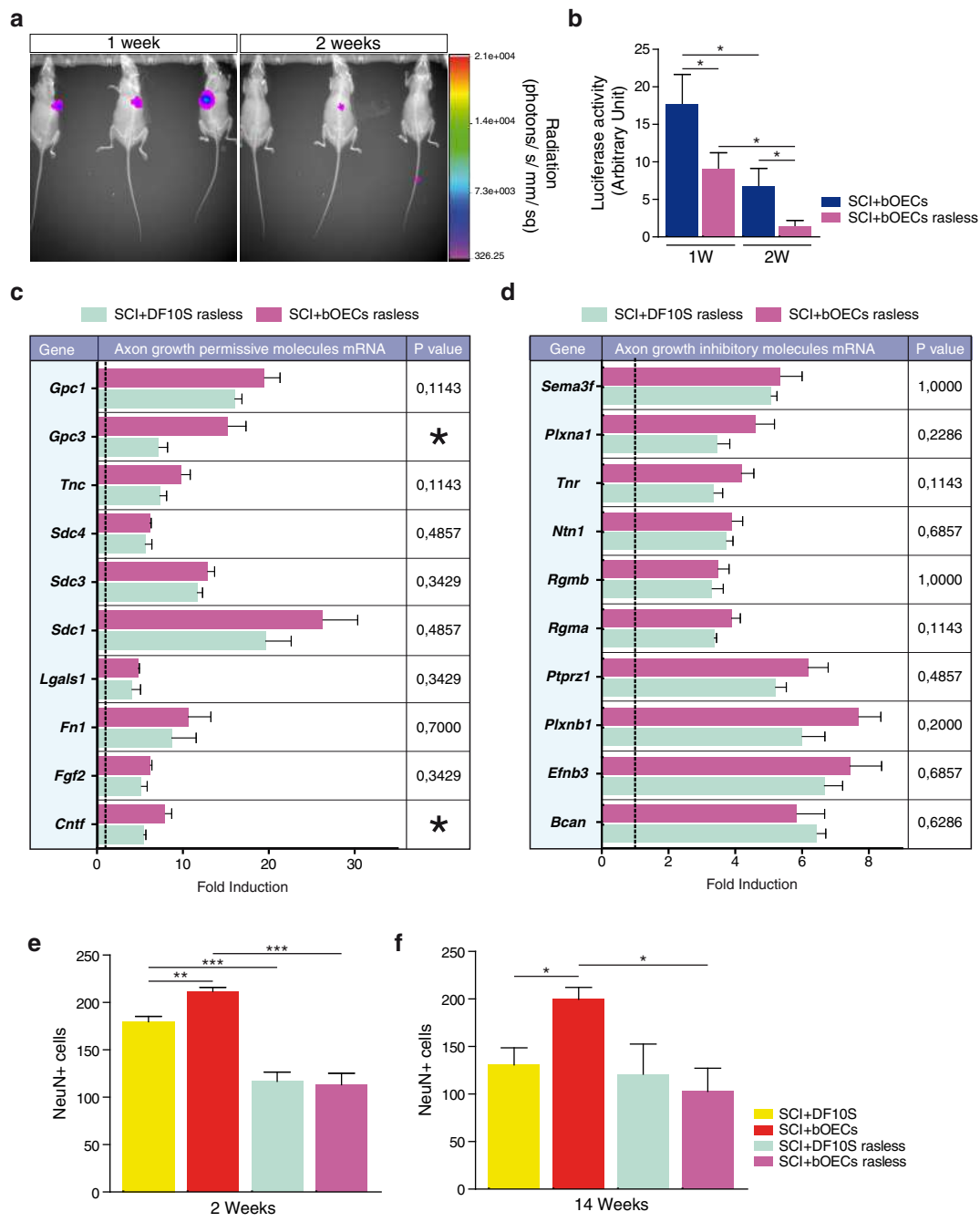


Figure 4



Discussion de thèse

La lésion médullaire traumatique (LMT) est une affection complexe chronique et incurable pouvant se produire lorsqu'une force physique externe endommage la moelle spinale conduisant à des déficits moteurs et/ou sensoriels permanents [258]. Ces altérations varient en fonction du niveau de l'atteinte lésionnelle et également en fonction de sa sévérité. Malheureusement, il n'existe pas à ce jour de traitement permettant une récupération des fonctions neurologiques perdues à cause de la complexité de la physiopathologie engendrée et de ses mécanismes évolutifs au fil du temps. Plusieurs facteurs moléculaires et cellulaires participent à cette série d'évènements, caractérisée par la destruction tissulaire, l'ischémie, la libération de cytokines pro-inflammatoires, le stress oxydatif ainsi que l'excitotoxicité formant ainsi un microenvironnement apoptotique causant la dégénérescence et la démyélinisation axonale [175, 181, 259]. L'ensemble de ces réactions aboutit à la formation d'une cicatrice médullaire formée principalement par la cicatrice fibrotique, située au cœur de la lésion, et constituée par des fibroblastes provenant d'un sous-ensemble de cellules périvasculaires, appelées péricytes de type A [127, 138]. Cette cicatrice fibrotique est entourée par une couche de cellules de type astrocytaire formant la cicatrice gliale. Ces astrocytes proviennent soit des cellules épendymaires du canal central, formant, ainsi, la partie la plus profonde de la cicatrice, soit, d'astrocytes résidents formant la couche périphérique [70, 137].

De plus en plus d'études, montrent que la modulation des différentes composantes de la cicatrice médullaire pourrait être une cible thérapeutique potentielle pour la mise en place d'une récupération fonctionnelle plus efficace. Récemment, l'étude de Dias et al. a montré, par le biais d'un modèle de souris transgénique GLAST-CreER^{T2}::YFP-Rasless, une réduction de la composante fibrotique de la cicatrice médullaire, permettant ainsi une amélioration de la récupération sensori-motrice [162]. D'autre part, concernant la cicatrice gliale, des études ont montré que cette composante est essentielle afin d'empêcher la propagation de la cicatrice fibreuse et l'infiltration des cellules inflammatoires du cœur de la lésion vers les tissus qui l'entourent. En effet, l'étude d'Anderson et al. a montré qu'en absence de cicatrice gliale chronique, on observe une propagation de la cicatrice fibreuse et une infiltration des cellules inflammatoires. C'est pour cela que, dès son ablation, le cœur de la lésion s'étend sur les tissus adjacents à la lésion et empêche ainsi toute régénération axonale. Également, cette étude a prouvé, via une analyse par PCR quantitative, que ces astrocytes formant la cicatrice gliale peuvent établir un environnement propice à une repousse axonale en montrant leur capacité à sécréter des facteurs permissifs à cette repousse [148].

Nous émettons donc l'hypothèse que les réponses cellulaires endogènes de la moelle spinale, suite à sa lésion, peuvent être modulées et que cette modulation serait différentielle en fonction du traitement utilisé dans le but de restaurer les fonctions motrices perdues.

L'analyse bibliographique des études sur le traitement des LMTs révèle diverses stratégies thérapeutiques en cours de développement et faisant appel à différents domaines. Parmi ces stratégies, l'utilisation de la thérapie cellulaire semble être l'une des plus prometteuse. Le but de cette stratégie est d'exploiter les potentiels bénéfiques des cellules transplantées. De ce fait plusieurs types de cellules ont ainsi été utilisés, et qui en fonction de leur origine, induisent des effets qui leurs sont propres.

Dans notre laboratoire, nous utilisons particulièrement les cellules gliales olfactives (CGO) et nous nous intéressons à leurs mécanismes de fonctionnement dans le but d'améliorer leur efficacité en tant que thérapie cellulaire suite aux LMTs (Article 2). Notamment, nous avons évalué les effets de leurs transplantations sur la réactivité des cellules souches endogènes de la moelle spinale après LMT (Projet 3). Ces deux travaux font partie de mon manuscrit de Thèse.

Bien que la thérapie cellulaire soit une approche thérapeutique prometteuse dans le cadre des LMTs, de nombreux obstacles sont à prendre en considération afin de pouvoir l'appliquer chez l'homme d'une manière efficace et reproductible [260].

Le principal obstacle, parmi ceux-ci, est le caractère invasif de ces thérapies dû à l'intervention chirurgicale nécessaire afin de transplanter les cellules. De plus, dans le cas de transplantations autologues, deux interventions s'avèrent être nécessaires. La première afin de récupérer les cellules qui seront mises en culture et la seconde afin de procéder à leur transplantation. Concernant la transplantation de cellules souches, en plus du risque de tumorigénicité, des problèmes de tolérances immunitaires et d'immunotoxicité sont également à prendre en compte. A cela, peuvent s'ajouter des complications telles que la stabilité génétique des cellules, leur senescence, leur viabilité ou bien leur migration non contrôlée après injection [261].

D'autre part, dans le cadre des LMTs, une efficacité variable a été rapportée concernant les résultats obtenus après thérapie cellulaire. Cette hétérogénéité est due notamment à différentes conditions expérimentales entre les études telles que le niveau de la lésion (thoracique, lombaire, etc), le modèle de la lésion (compression ou transection), le temps entre la lésion et l'injection (immédiate ou différée) ou encore le nombre de cellules transplantées [262].

D'où, une standardisation des méthodes de cultures, de préservation et de stockage des cellules et également de leur modalité d'administration devra être effectuée afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats, ce qui permettrait de mieux comparer les études entre elles [263]. Toutes ces questions seront à résoudre avant une éventuelle transposition vers la clinique.

Il est à noter aussi, que les différentes études ont bien montré que, quel que soit le type de cellules transplantées dans le cadre des LMTs, aucun à lui seul, ne possédait les propriétés qui permettraient de moduler les différents mécanismes se mettant en place après une lésion spinale. De ce fait, il peut être envisagé d'adjoindre une thérapie à la transplantation cellulaire telle que l'administration de facteurs neurotrophiques, les pontages nerveux (scaffolding), l'utilisation de biomatériaux ou encore la rééducation. Ces associations thérapeutiques laissent espérer une efficacité du traitement à long terme [264].

Enfin, pour en conclure, malgré que de nombreuses thérapies cellulaires semblent prometteuses du fait de leurs effets neuroprotecteurs et neurorégénératifs, leur utilisation clinique reste néanmoins limitée, principalement, à cause de leur caractère invasif. C'est pourquoi nous proposons de tester notre hypothèse par le biais d'une méthode non invasive ; la stimulation magnétique répétitive Trans-spinale : la rTSMS.

La stimulation électromagnétique (SEM) se distingue par son caractère non invasif, indolore, sa facilité d'utilisation et la rareté de ces effets secondaires. Son principe d'action est basé sur l'induction de pulsations électriques au sein d'une bobine électromagnétique placée au contact de la région d'intérêt [208]. Par ailleurs, son efficacité thérapeutique a été confirmée dans le traitement de certaines pathologies neurologiques telles que les troubles psychiatriques comme la dépression [204] et chez des patients ayant subi un accident vasculaire cérébral [205]. De plus, cette efficacité a été prouvée, tant au niveau fonctionnel que cellulaire chez des patients souffrant de maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson [206] et la maladie d'Alzheimer [207].

Différentes techniques neuromodulatrices non invasives ont été appliquées à la suite d'une lésion médullaire. Parmi eux, on peut citer la stimulation électrique transcutanée [265], la stimulation trans-spinale à courant continu (TsDCS) [266] ou la stimulation électromagnétique [251]; ces techniques étant des outils thérapeutiques utilisables pour la recherche expérimentale et clinique. Alors que la stimulation électrique transcutanée et la TsDCS sont conçues pour stimuler principalement un groupe individuel de neurones, la bobine double ou en forme de huit de la rTSMS délivre un champ magnétique plus focal stimulant les différentes

structures du tissu neural (de 0.5mm² à 2cm² selon la taille des bobines) [267, 268]. C'est pour cette raison que, lors de notre étude, nous avons choisi l'utilisation de la rTSMS, qui nous permet de moduler de manière non invasive les réponses cellulaires endogènes de la moelle spinale à la suite de la lésion.

Peu d'études se sont intéressées à l'application de la stimulation électromagnétique au niveau de la moelle spinale et en particulier dans un cadre lésionnel. Dans la plupart de ces études, les auteurs utilisent une méthode basée sur la stimulation magnétique transcrânienne en plaçant la bobine au niveau cérébral ou en utilisant des stimulateurs développés spécialement par les laboratoires. Des protocoles basés sur la stimulation du corps entier ont déjà été effectués [269, 270], le risque étant de stimuler d'autres structures et ainsi de perdre la spécificité de l'effet au niveau médullaire. C'est pourquoi, nous avons proposé dans notre étude une stimulation focale au niveau du site de la lésion. Pour ce faire, nous avons utilisé une bobine en huit d'un modèle commercialisé et utilisé en clinique que nous avons positionné en contact étroit avec le dos de l'animal directement sur le site de la lésion.

Bien que certaines études publiées précédemment aient utilisé la rTSMS après une lésion de la moelle spinale, le choix de leurs bobines et de leurs protocoles de stimulation sont différents des nôtres. En effet, l'étude de Petrosyan et al. est basée sur l'utilisation de la rTSMS focale dans le cadre des LMTs sur un modèle de rat [271]. Cependant, leur protocole est basé sur une stimulation de basse fréquence (0,2 Hz) et de très haute intensité (2,8 T) pendant 5 semaines. De plus, le pattern de stimulation était composé d'un train de stimulation d'une durée de 35 minutes. Étonnamment, dans cette étude, il n'y avait pas de différence entre les animaux traités par rTSMS et les animaux non traités. Une autre étude de Leydeker et al a utilisé un protocole de stimulation non focale avec une bobine circulaire de 5 cm impliquant des stimulations du corps entier [253]. Ces différentes études mettent en évidence la présence d'une variabilité des effets observés qui peuvent être expliqués, par des différences quant aux paramètres utilisés comme la fréquence, l'intensité de stimulation, le site de stimulation, le nombre de stimuli ainsi que la durée du traitement.

Par conséquent, nous avons entamé notre étude par une preuve de concept, en évaluant la faisabilité et l'effet de notre protocole de rTSMS établi à une fréquence de 10 Hz, 10 minutes par jour, pendant 2 semaines, sur la réparation tissulaire et les récupérations fonctionnelles. Ces paramètres étaient choisis conformément à d'autres protocoles précédemment décrits [229, 272].

Les résultats obtenus montrent une capacité de la rTSMS à moduler la cicatrice médullaire, 15 jours après la lésion, et que ces effets sont maintenus 90 jours après LMT. En effet, en concordance à ce qui a été décrit dans les études précédentes, la cicatrice fibreuse représente une barrière majeure pour la repousse axonale et sa réduction en utilisant la rTSMS augmente à son tour l'astroglie et diminue l'inflammation.

Afin d'étudier l'effet de la rTSMS sur la récupération fonctionnelle, nous avons utilisé le couloir de mesure des troubles de la marche et de l'équilibre (Locotronic test). Il s'agit d'un dispositif se présentant sous forme d'un corridor et d'une échelle à plat sur laquelle l'animal se déplace. De part et d'autre de ce corridor, des capteurs infra rouges permettent la visualisation et l'enregistrement, et ce de manière quantitative, des déplacements de l'animal ainsi que les erreurs de contrôle moteur (pattes avant, pattes arrière). Une erreur est relevée par les capteurs lorsque la patte de l'animal chute entre deux barreaux.

Suite à ces enregistrements, nous avons démontré que le traitement basé sur la rTSMS améliore les fonctions sensori-motrices après la lésion. Ceci en diminuant le nombre d'erreurs des pattes arrière, le temps d'erreur total des pattes arrière et le temps total de traversée. Ces résultats sont en accord avec une étude précédemment publiée montrant que le champ magnétique favorise la restauration des fonctions locomotrices après lésion médullaire [270].

Jusqu'à ce jour, les mécanismes physiologiques, cellulaires et moléculaires qui induisent les effets thérapeutiques de la SEM sont peu connus, notamment dans le cadre LMTs.

C'est pour cette raison, et afin d'approfondir nos connaissances des mécanismes moléculaires qui sous-tendent aux effets thérapeutiques de la rTSMS, que nous avons effectué une analyse protéomique. Cette étude a révélé que 156 protéines sont différentiellement régulées. L'analyse des voies de signalisations liées à ces protéines montre que la rTSMS a augmenté 37 fonctions biologiques et en a diminué 7 autres. Parmi celles-ci, on peut noter des fonctions biologiques ayant une implication directe dans la restauration des fonctions neurologiques perdues.

Nous nous sommes concentrés sur 6 processus biologiques clés modulés après rTSMS et directement liés à la série d'événements caractérisant la phase secondaire de la lésion. Parmi ces processus biologiques, quatre ont été régulé positivement sous l'influence de la stimulation : 1) La prolifération des cellules neurales, 2) L'axonogenèse, 3) La ramifications neuronale 4) La croissance axonale. Ces derniers ont été regroupé en 2 familles : A) Repousse axonale et ramification neuronale B) Prolifération des cellules neurales

Il est à noter aussi, que l'analyse protéomique a révélé un nombre de protéines de la myéline et des microtubules qui sont up-régulées dans les groupes stimulés tels que MBP, MAPT, MOG, CNP, Nefm. Or, plusieurs études prouvent que la myélinisation est régulée par de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques comme l'activation neuronale [273, 274], on peut émettre donc l'hypothèse que la rTSMS peut avoir un rôle extrinsèque via l'activation neuronale en stimulant la maturation des cellules précurseurs d'oligodendrocytes (OPC) ou en maintenant leur survie grâce à son effet anti-apoptotique ou bien en améliorant leur différenciation vers un profil myélinisant [238, 239]. Ce rôle spécifique pourrait être une des causes des effets observés suite à la rTSMS dans notre étude.

De manière intéressante, cette analyse protéomique nous révèle également d'autres protéines up-régulées par la stimulation. Celles-ci étant liées à la prolifération des cellules neurales et à la migration cellulaire telles que SYN1, NCDN, GAP43, PAFAH1, RHOG.

De même, deux autres fonctions biologiques, intéressantes dans ce contexte lésionnel, ont été découvertes et qui sont down-régulées après la stimulation : l'apoptose et la mort neuronale, avec l'expression de protéines spécifiques dont SOD1 / 2, PRDX, MAPK3, Cdc42, SNCA.

Afin de valider nos résultats d'analyses protéomiques, nous avons étudié l'effet de la rTSMS sur la survie neuronale, la régénération axonale et la remyélinisation *in vivo*. Nous rapportons alors que l'application de la rTSMS, après lésion, diminue le processus de démyélinisation et améliore la survie neuronale, observés respectivement par la réduction de la zone négative MBP et par l'augmentation du nombre de cellules positives NeuN au site lésionnel. Suite à cela, des expériences de traçage antérograde ont été réalisées en utilisant du BDA afin de visualiser la repousse axonale/survie axonale. Ceci nous a permis ainsi de montrer que le rTSMS induit une repousse axonale traversant le site de la lésion en comparaison aux animaux contrôles.

Les résultats obtenus par l'analyse protéomique suggèrent que l'effet de la rTSMS sur la régénération tissulaire peut être en parti lié à l'activation de la prolifération des cellules souches neurales au niveau de la moelle. C'est pourquoi, nous avons ensuite évalué l'effet de la stimulation sur les cellules souches neurales endogènes de la moelle spinale.

Chacune des cellules de la moelle spinale, les cellules épendymaires, les astrocytes et les OPC présente une réponse spécifique suite à la lésion [116, 275]. En effet, plusieurs études ont montré le potentiel de chacune de ces cellules gliales à répondre à une activité électrique d'une manière directe ou indirecte, faisant d'eux probablement des effecteurs cellulaires de la SEM [276]. Dans

notre publication, nous présentons, pour la première fois, l'effet de la rTSMS sur la réactivité des cellules souches endogènes de la moelle spinale après LMT.

Depuis quelques années, des études ont montré que le potentiel souche endogène était confiné, dès le stade postnatal jusqu'à l'âge adulte, aux cellules épendymaires bordant le canal central, ces cellules étant majoritairement quiescentes en absence de la lésion[41]. Toutefois, à la suite d'une lésion, une augmentation de leur taux de prolifération de plus de 50 fois, par rapport aux conditions physiologiques, a été observée. Une partie de ces cellules quitte alors le canal central et migre vers le site de la lésion afin de contribuer à la mise en place de la cicatrice médullaire. Suite à cela, elles commencent à se différencier majoritairement en astrocytes, et minoritairement en oligodendrocytes au niveau du site de la lésion [52, 70, 138].

Dans notre étude, nous avons tiré profit de la lignée de souris inductible hFoxJ1-CreERT::tdTomato, pour cartographier spécifiquement les cellules épendymaires. Dans un premier temps, nos résultats montrent que la rTSMS induit l'augmentation du taux de prolifération des cellules épendymaires *in vitro* se traduisant par une élévation du nombre des premières neurosphères obtenues à partir de moelles lésées et stimulées. De la même façon, nos investigations ont permis de démontrer que la rTSMS augmente la réactivité des cellules épendymaires *in vivo* au niveau du canal central par rapport au groupe contrôle.

Dans un second temps, nous avons étudié les effets de la rTSMS sur la différenciation de ces cellules épendymaires après la lésion. Pour ce faire, nous avons analysé les cellules dérivées des cellules épendymaires 15 jours après lésion. Nos données démontrent alors que la rTSMS augmente le nombre d'astrocytes et d'oligodendrocytes dérivés des cellules souches endogènes à la suite de la lésion. Nous avons également démontré que la contribution des astrocytes dérivés des cellules épendymaires à la mise en place de la cicatrice médullaire se trouvait également augmentée.

Plusieurs sont les hypothèses pouvant être formulées quant aux mécanismes expliquant les effets de la rTSMS sur la réactivation des cellules souches endogènes. Nous émettons l'hypothèse que la modification du microenvironnement lésionnel médullaire pourrait avoir un effet direct sur cette réactivité. En effet, une étude a montré, récemment, que cette réactivité est médiée par plusieurs facteurs présents lors de la phase secondaire et que paradoxalement leur présence est nécessaire pour l'activation de ces cellules épendymaires via l'induction de leur prolifération et de leur différenciation [163]. Ces facteurs telle que la libération du glutamate conduisent à la prolifération massive de ces cellules et à l'augmentation de leur taux de survie. Certaines études suggèrent que les récepteurs AMPA présents sur les cellules souches pourraient jouer un rôle

central dans la régulation des réponses médiées par le glutamate, via l'augmentation du taux de BDNF [165, 166]. En outre, il a été bien décrit que la SEM modifie l'activité neuronale, en augmentant la production et la libération de certains facteurs neurotrophiques tels que le BDNF et le VEGF [235, 277].

Le deuxième facteur est l'inflammation présente suite à la lésion et induisant des effets différentiels sur les cellules épendymaires. Une étude récente a montré que la co-culture de cellules souches endogènes issues de moelles de souris avec des macrophages pro-inflammatoires M1 exprimant massivement iNOS, $TNF\alpha$ et l'IL-1 β induit la prolifération des cellules souches via la signalisation MAPK. Il est intéressant de noter, qu'une autre étude a montré que la SEM appliquée suite à une hémorragie intracérébrale induit la prolifération et la différenciation neuronale des cellules souches neurales par la voie de signalisation MAPK chez le rat [278].

Ces effets de la rTSMS sur l'induction de la réactivité des cellules souches endogènes sont en accord avec plusieurs études précédentes démontrant que la SEM augmente la différenciation et la prolifération cellulaire. Par ailleurs, une étude portant sur l'évaluation des effets de la SEM sur la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales et des cellules progénitrices, menée par Abbasnia et al., a montré que la SEM augmente le nombre et la taille des neurosphères obtenus *in vitro* à partir de la zone sous-ventriculaire de la souris adulte [6]. Aussi, Guo et al, indiquent que l'application de la rTMS à 10 Hz augmente significativement la prolifération des cellules souches neurales adultes (NSC) dans la zone sous-ventriculaire [279]. Enfin, il a également été montré que la rTMS diminue l'apoptose en réduisant le nombre de cellules caspase-3 positives dans un modèle murin d'ischémie transitoire [240].

Suite à cela, nous avons évalué l'efficacité de la rTSMS dans un contexte proche des conditions cliniques, en commençant la stimulation 10 jours après la LMT. En effet, vu que ces lésions sont majoritairement dues à des accidents de la circulation, la plupart des patients médullo-lésés ne pourraient bénéficier du traitement de rTSMS que 10 à 14 jours après sa survenue, lorsqu'ils soient stabilisés et qu'il n'y ait plus de complications secondaires à l'accident. C'est pourquoi nous avons testé la rTSMS pendant 14 jours consécutifs, en commençant le traitement 10 jours après la lésion. Dans ce paradigme, on montre que la rTSMS induit une récupération fonctionnelle et une réparation tissulaire chez la souris adulte.

Deux profils de patients atteints de LMT sont majoritairement constatés. Une première catégorie concerne des patients âgés entre 16 et 30 ans et une deuxième catégorie touche une population de patients âgés de plus de 60 ans [280]. Dans notre étude, Nous avons évalué si la rTSMS

peut être également efficace chez des patients appartenant à ces deux catégories. Nos résultats démontrent que le rTSMS induit une récupération fonctionnelle et une réparation tissulaire chez les souris juvéniles et âgées. Nous notons toutefois, en accord avec la littérature, que les souris âgées présentent des moindres résultats, en termes de récupération fonctionnelle, que ceux trouvés chez les souris juvéniles, probablement en raison de changements physiologiques liés à l'âge [281].

La particularité de notre étude est notamment liée au fait que différents paradigmes de stimulation, de modèles lésionnels et de catégories d'âges de souris ont été évalués. En effet, nous avons essayé de nous rapprocher le plus possible des conditions cliniques afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine des effets thérapeutiques et ainsi faciliter la translation de cette technique chez l'homme. Cependant, une limitation majeure de notre étude, et également de nombreuses autres, est l'utilisation de bobines commercialisées « humaines ». Ces bobines sont de tailles relativement grandes en comparaison à celle de la souris, risquant ainsi de générer une stimulation plus large que celle souhaitée. Dans notre étude, la zone stimulée était de 1,5 cm², ce qui correspond chez la souris à 3-4 segments vertébraux. Ainsi, pour une meilleure transition en clinique, il serait nécessaire de développer une bobine spécifique aux rongeurs qui permettrait de délivrer une SEM à haute intensité tout en maintenant un meilleur focus.

Pour conclure, cette étude nous a permis de démontrer l'effet de la stimulation magnétique répétitive trans-spinale comme thérapie non invasive sur la réparation tissulaire à la suite de la lésion de la moelle spinale, via sa capacité à moduler la cicatrice médullaire *in vivo*. Nos résultats mettent également en évidence que la rTSMS favorise la survie neuronale, la régénération axonale et la remyélinisation et permet ainsi la récupération fonctionnelle, dans différents paradigmes (aiguë et chronique) et à différents âges (juvénile, adulte et vieux). Notre étude nous a permis aussi de dévoiler, pour la première fois, les processus biologiques clés modulés après rTSMS et directement liés à la restauration des fonctions neurologiques perdues. Elle démontre, également, l'effet de la rTSMS sur l'induction de la prolifération et la différenciation des cellules souches de la moelle *in vivo*. Ainsi, ces résultats constituent un grand espoir dans l'établissement d'un nouveau traitement suite aux lésions médullaires chez l'homme.

Conclusion et perspectives

La stimulation électromagnétique (SEM) a montré son efficacité thérapeutique au niveau du système nerveux central (SNC), dans le cadre d'un certain nombre de pathologies à travers ses potentiels neurotrophiques, neuroprotecteurs et neurorégénératifs, en se distinguant des autres stratégies principalement par son non invasivité et son innocuité.

Sous cette optique se place mon travail de thèse qui consiste à tirer avantage de la SEM, de son efficacité thérapeutique et de ses effets neurobiologiques bienfaisants, au niveau du SNC, tant au niveau de la réparation tissulaire qu'à la récupération fonctionnelle dans le cadre de la lésion médullaire traumatique (LMT).

Le premier enjeu à cette application de la stimulation magnétique répétitive trans-spinale (rTSMS) était de valider la faisabilité du protocole de stimulation dans ce contexte. Pour ce faire, certains paramètres ont été déterminants à sa réussite, tels que le choix de la bobine, la configuration des paramètres du protocole et en particulier, l'emplacement de la bobine. Cette étape de paramétrage est essentielle à la spécificité de l'effet observé et son efficacité.

Le deuxième enjeu était de s'intéresser, pour la première fois, à l'effet de la rTSMS sur deux cibles thérapeutiques potentielles, la cicatrice médullaire et les cellules souches endogènes de la moelle, à travers leur modulation afin de promouvoir une régénération et une récupération plus efficace de la moelle spinale à la suite du traumatisme.

En effet, les différents rôles de la cicatrice médullaire et la réactivité des cellules épendymaires à la suite de la LMT méritent une attention particulière dans le développement des nouvelles stratégies thérapeutiques. Ceci a fait la singularité de notre étude, en démontrant la capacité modulatrice de la rTSMS sur les différentes composantes de la cicatrice médullaire *in vivo*, via la réduction de la composante fibrotique et microgliale aboutissant à une régénération axonale, une remyélinisation prouvée tant qu'au niveau histologique que protéomique et conduisant à la récupération sensorimotrice des souris lésées et stimulées.

En outre, notre publication a montré également l'effet de la rTSMS sur l'induction de la prolifération et la différenciation des cellules souches de la moelle *in vivo*, en augmentant le nombre des cellules différenciées vers un profil astrocytaire et oligodendrocytaire contribuant à la mise en place de la cicatrice médullaire.

Ces résultats ouvrent un champ de perspectives très large au niveau fondamental et clinique afin d'approfondir encore plus la compréhension des mécanismes liés à cette efficacité thérapeutique dans le contexte de la LMT et à une optimisation du protocole pour une transposition efficace et rapide chez l'homme.

En se basant sur nos résultats au niveau cellulaire et mécanistique, on peut suggérer, en premier lieu, que la rTSMS a pu cibler la réponse des précurseurs oligodendrocytaires (OPC) observée via leur contribution à la remyélinisation, suite à la lésion. Cette contribution, tel était indiquée dans l'analyse bibliographique, s'explique soit par la différenciation de ces OPCs en cellules de Schwann-like myélinisante, traduite dans notre étude, par l'augmentation de l'expression des marqueurs de la myélinisation, une meilleure régénération axonale et la récupération motrice observée dans les deux semaines suivant le traitement, soit grâce à l'effet anti-apoptotique de la rTSMS, pouvant favoriser la survie des oligodendrocytes matures myélinisants, soit par l'apparition de nouveaux oligodendrocytes myélinisants. Cette dernière ne pouvant être investiguée qu'après six semaines de la lésion. Une deuxième piste prometteuse se base sur l'effet anti-inflammatoire de la rTSMS et sa modulation de la cicatrice gliale. On peut y suggérer que la rTSMS pourrait cibler l'hétérogénéité phénotypiques des astrocytes formant la cicatrice gliale. Ceci en diminuant le nombre des astrocytes A1, défini comme neurotoxique et inhibiteur à la repousse axonale, via sa capacité à diminuer l'activation des microglies au niveau de la cicatrice et par conséquent à réduire la libération des facteurs inflammatoires responsables à l'induction de ce phénotype.

En conclusion, notre étude pré-clinique prometteuse et les différentes perspectives proposées à la suite de ce travail ouvrent la voie pour suivre les recherches et établir des protocoles de stimulation chez les primates non humains, donnant un grand espoir face à ce traumatisme et ces séquelles physiques et psychiques.

Bibliographie

- [1] D. Purves, G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, W. Hall, A.-S. LaMantia, and L. White, Neurosciences. De Boeck Supérieur, 2019-06-03.
- [2] L. R. Cochard, Atlas d'embryologie humaine de Netter. De Boeck Supérieur, 2015-03-11.
- [3] E. Marieb and K. Hoehn, Anatomie et physiologie humaines : Livre + eText + plateforme numérique MonLab - Licence étudiant 60 mois. Pearson Education France, 2014-11-28.
- [4] J. Langman and T. W. Sadler, Atlas d'embryologie médicale de Langman. Pradel, Wolters Kluwer France, 2008.
- [5] R. A. Barker, F. Cicchetti, and E. S. J. Robinson, Neuroanatomie et neurosciences. De Boeck Supérieur, 2019-06-17.
- [6] K. Abbasnia, A. Ghanbari, M. Abedian, A. Ghanbari, S. Sharififar, and H. Azari, "The effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on proliferation and differentiation of neural stem cells," Anatomy & Cell Biology, vol. 48, no. 2, pp. 104–113, 2015-06.
- [7] R. L. Drake, A. W. Vogl, A. H. G. Mitchell, F. Duparc, and J. Duparc, Gray's Anatomie - Le Manuel pour les étudiants. Elsevier Health Sciences, 2020-07-08.
- [8] O. Bican, A. Minagar, and A. A. Pruitt, "The spinal cord : A review of functional neuroanatomy," Neurologic Clinics, vol. 31, no. 1, pp. 1–18, 2013-02.
- [9] T. H. Milhorat, R. M. Kotzen, and A. P. Anzil, "Stenosis of central canal of spinal cord in man : Incidence and pathological findings in 232 autopsy cases," Journal of Neurosurgery, vol. 80, no. 4, pp. 716–722, 1994-04.
- [10] Clinical Anatomy of the Spine, Spinal Cord, and Ans. Elsevier, 2014.

- [11] J. Bernstock, J. Verheyen, B. Huang, and J. H. a. S. Pluchino, “Typical and Atypical Stem Cell Niches of the Adult Nervous System in Health and Inflammatory Brain and Spinal Cord Diseases,” 2014-08-01.
- [12] L. Tatu, “Vascularisation artérielle de la moelle spinale,” p. 2, 2009-11.
- [13] D. C. Lu, T. Niu, and W. A. Alaynick, “Molecular and cellular development of spinal cord locomotor circuitry,” Frontiers in Molecular Neuroscience, vol. 8, p. 25, 2015.
- [14] R. Diez del Corral and K. G. Storey, “Markers in vertebrate neurogenesis,” Nature Reviews. Neuroscience, vol. 2, no. 11, pp. 835–839, 2001-11.
- [15] G. Le Dréau and E. Martí, “The multiple activities of BMPs during spinal cord development,” Cell Mol Life Sci, vol. 70, no. 22, pp. 4293–4305, 2013-11.
- [16] N. J. Allen and D. A. Lyons, “Glia as architects of central nervous system formation and function,” Science (New York, N.Y.), vol. 362, no. 6411, pp. 181–185, 2018-12-10.
- [17] E. van Tilborg, C. G. M. de Theije, M. van Hal, N. Wagenaar, L. S. de Vries, M. J. Benders, D. H. Rowitch, and C. H. Nijboer, “Origin and dynamics of oligodendrocytes in the developing brain : Implications for perinatal white matter injury,” Glia, vol. 66, no. 2, pp. 221–238, 2018-02.
- [18] B. Emery, “Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination,” Science (New York, N.Y.), vol. 330, no. 6005, pp. 779–782, 2010-11-05.
- [19] W. Huang, Q. Guo, X. Bai, A. Scheller, and F. Kirchhoff, “Early embryonic NG2 glia are exclusively gliogenic and do not generate neurons in the brain,” Glia, vol. 67, no. 6, pp. 1094–1103, 2019-06.
- [20] A. M. Ravanelli and B. Appel, “Motor neurons and oligodendrocytes arise from distinct cell lineages by progenitor recruitment,” Genes & Development, vol. 29, no. 23, pp. 2504–2515, 2015-12-01.
- [21] M. Sugimori, M. Nagao, C. M. Parras, H. Nakatani, M. Lebel, F. Guillemot, and M. Nakafuku, “Ascl1 is required for oligodendrocyte development in the spinal cord,” Development (Cambridge, England), vol. 135, no. 7, pp. 1271–1281, 2008-04.
- [22] F. de Castro, A. Bribián, and M. C. Ortega, “Regulation of oligodendrocyte precursor migration during development, in adulthood and in pathology,” Cellular and molecular life sciences : CMLS, vol. 70, no. 22, pp. 4355–4368, 2013-11.

- [23] E. G. Hughes, S. H. Kang, M. Fukaya, and D. E. Bergles, "Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain," Nature Neuroscience, vol. 16, no. 6, pp. 668–676, 2013-06.
- [24] W. D. Richardson, N. Pringle, M. J. Mosley, B. Westermarck, and M. Dubois-Dalcq, "A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system," Cell, vol. 53, no. 2, pp. 309–319, 1988-04-22.
- [25] F. Guo, J. Lang, J. Sohn, E. Hammond, M. Chang, and D. Pleasure, "Canonical Wnt signaling in the oligodendroglial lineage—puzzles remain," Glia, vol. 63, no. 10, pp. 1671–1693, 2015-10.
- [26] S. Foerster, M. F. E. Hill, and R. J. M. Franklin, "Diversity in the oligodendrocyte lineage : Plasticity or heterogeneity?," Glia, vol. 67, no. 10, pp. 1797–1805, 2019-10.
- [27] N. Baumann and D. Pham-Dinh, "Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system," Physiological Reviews, vol. 81, no. 2, pp. 871–927, 2001-04.
- [28] G. J. Duncan, S. B. Manesh, B. J. Hilton, P. Assinck, J. Liu, A. Moulson, J. R. Plemel, and W. Tetzlaff, "Locomotor recovery following contusive spinal cord injury does not require oligodendrocyte remyelination," Nature Communications, vol. 9, no. 1, p. 3066, 2018-03-08.
- [29] E. Traiffort, M. Zakaria, Y. Laouarem, and J. Ferent, "Hedgehog : A Key Signaling in the Development of the Oligodendrocyte Lineage," vol. 4, no. 3, 2016-09-08.
- [30] N. G. Bauer, C. Richter-Landsberg, and C. Ffrench-Constant, "Role of the oligodendroglial cytoskeleton in differentiation and myelination," Glia, vol. 57, no. 16, pp. 1691–1705, 2009-12.
- [31] S. A. Liddelow and B. A. Barres, "Reactive Astrocytes : Production, Function, and Therapeutic Potential," Immunity, vol. 46, no. 6, pp. 957–967, 2017-06-20.
- [32] A. Verkhratsky and M. Nedergaard, "Physiology of Astroglia," Physiological Reviews, vol. 98, no. 1, pp. 239–389, 2018-01-01.
- [33] L. Ben Haim and D. H. Rowitch, "Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation," Nature Reviews. Neuroscience, vol. 18, no. 1, pp. 31–41, 2017-01.

- [34] Y. Zhang and B. A. Barres, "Astrocyte heterogeneity : An underappreciated topic in neurobiology," *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 20, no. 5, pp. 588–594, 2010-10.
- [35] C. Hochstim, B. Deneen, A. Lukaszewicz, Q. Zhou, and D. J. Anderson, "Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain code," *Cell*, vol. 133, no. 3, pp. 510–522, 2008-05-02.
- [36] L. S. Chaboub and B. Deneen, "Developmental origins of astrocyte heterogeneity : The final frontier of CNS development," *Developmental Neuroscience*, vol. 34, no. 5, pp. 379–388, 2012.
- [37] T. Amuti, I. Ouko, S. Mukonjia, I. Cheruiyot, J. Munguti, P. Mwachaka, and A. Malek, "Role of heterogeneous astrocyte receptor expression in determining astrocytic response to neuronal disorders," vol. 7, no. 1, pp. 1169–1174, 2018-04-11.
- [38] M. A. Cañizares, A. R. Albors, G. Singer, N. Suttie, M. Gorkic, P. Felts, and K. G. Storey, "Multiple steps characterise ventricular layer attrition to form the ependymal cell lining of the adult mouse spinal cord central canal," *Journal of Anatomy*, vol. 236, no. 2, pp. 334–350, 2020-02.
- [39] H. Fu, Y. Qi, M. Tan, J. Cai, X. Hu, Z. Liu, J. Jensen, and M. Qiu, "Molecular mapping of the origin of postnatal spinal cord ependymal cells : Evidence that adult ependymal cells are derived from Nkx6.1+ ventral neural progenitor cells," *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 456, no. 3, pp. 237–244, 2003-02-10.
- [40] Y. Qin, W. Zhang, and P. Yang, "Current states of endogenous stem cells in adult spinal cord," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 93, no. 3, pp. 391–398, 2015-03.
- [41] X. Li, E. M. Floriddia, K. Toskas, K. J. L. Fernandes, N. Guérout, and F. Barnabé-Heider, "Regenerative Potential of Ependymal Cells for Spinal Cord Injuries Over Time," *EBioMedicine*, vol. 13, pp. 55–65, 2016-11.
- [42] N. Guérout, X. Li, and F. Barnabé-Heider, "Cell fate control in the developing central nervous system," vol. 321, no. 1, pp. 77–83, 2014-02-01.
- [43] J. P. Hugnot and R. Franzen, "The spinal cord ependymal region : A stem cell niche in the caudal central nervous system," *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, vol. 16, pp. 1044–1059, 2011-01-01.
- [44] L. Djenoune, H. Khabou, F. Joubert, F. B. Quan, S. Nunes Figueiredo, L. Bodineau, F. Del Bene, C. Burcklé, H. Tostivint, and C. Wyart, "Investigation of spinal cerebrospinal

- fluid-contacting neurons expressing PKD2L1 : Evidence for a conserved system from fish to primates,” Frontiers in Neuroanatomy, vol. 8, p. 26, 2014.
- [45] Y. L. Petracca, M. M. Sartoretti, D. J. Di Bella, A. Marin-Burgin, A. L. Carcagno, A. F. Schinder, and G. M. Lanuza, “The late and dual origin of cerebrospinal fluid-contacting neurons in the mouse spinal cord,” Development (Cambridge, England), vol. 143, no. 5, pp. 880–891, 2016-03-01.
- [46] A. Orts-Del’Immagine, J. Trouslard, C. Airault, J.-P. Hugnot, B. Cordier, T. Doan, A. Kastner, and N. Wanaverbecq, “Postnatal maturation of mouse medullo-spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons,” Neuroscience, vol. 343, pp. 39–54, 2017-02-20.
- [47] J. Alfonso, C. Le Magueresse, A. Zuccotti, K. Khodosevich, and H. Monyer, “Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal SVZ by reducing GABA signaling,” Cell Stem Cell, vol. 10, no. 1, pp. 76–87, 2012-01-06.
- [48] R. Fiorelli, A. Cebrian-Silla, J.-M. Garcia-Verdugo, and O. Raineteau, “The adult spinal cord harbors a population of GFAP-positive progenitors with limited self-renewal potential,” Glia, vol. 61, no. 12, pp. 2100–2113, 2013-12.
- [49] N. Marichal, C. Reali, O. Trujillo-Cenóz, and R. E. Russo, “Spinal Cord Stem Cells In Their Microenvironment : The Ependyma as a Stem Cell Niche,” vol. 1041, pp. 55–79, 2017.
- [50] N. Marichal, G. García, M. Radmilovich, O. Trujillo-Cenóz, and R. E. Russo, “Spatial domains of progenitor-like cells and functional complexity of a stem cell niche in the neonatal rat spinal cord,” Stem Cells (Dayton, Ohio), vol. 30, no. 9, pp. 2020–2031, 2012-09.
- [51] D. J. Di Bella, A. L. Carcagno, M. L. Bartolomeu, M. B. Pardi, H. Löhr, N. Siegel, M. Hammerschmidt, A. Marín-Burgin, and G. M. Lanuza, “Ascl1 Balances Neuronal versus Ependymal Fate in the Spinal Cord Central Canal,” Cell Reports, vol. 28, no. 9, pp. 2264–2274.e3, 2019-08-27.
- [52] K. Meletis, F. Barnabé-Heider, M. Carlés, E. Evergren, N. Tomilin, O. Shupliakov, and J. Frisé, “Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells,” PLoS biology, vol. 6, no. 7, p. e182, 2008-07-22.
- [53] F. J. Rodriguez-Jimenez, A. Alastrue-Agudo, M. Stojkovic, S. Erceg, and V. Moreno-Manzano, “Connexin 50 Expression in Ependymal Stem Progenitor Cells after Spinal

- Cord Injury Activation,” International Journal of Molecular Sciences, vol. 16, no. 11, pp. 26608–26618, 2015-11-06.
- [54] J. R. Sternberg, A. E. Prendergast, L. Brosse, Y. Cantaut-Belarif, O. Thouvenin, A. Orts-Del’Imagine, L. Castillo, L. Djenoune, S. Kurisu, J. R. McDearmid, P.-L. Bardet, C. Boccara, H. Okamoto, P. Delmas, and C. Wyart, “Pkd211 is required for mechanoeception in cerebrospinal fluid-contacting neurons and maintenance of spine curvature,” Nature Communications, vol. 9, no. 1, p. 3804, 2018-09-18.
- [55] D. E. Clevidence, D. G. Overdier, R. S. Peterson, A. Porcella, H. Ye, K. E. Paulson, and R. H. Costa, “Members of the HNF-3/forkhead family of transcription factors exhibit distinct cellular expression patterns in lung and regulate the surfactant protein B promoter,” Developmental Biology, vol. 166, no. 1, pp. 195–209, 1994-11.
- [56] X. Yu, C. P. Ng, H. Habacher, and S. Roy, “Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program,” Nature Genetics, vol. 40, no. 12, pp. 1445–1453, 2008-12.
- [57] J. L. Stubbs, I. Oishi, J. C. Izpisua Belmonte, and C. Kintner, “The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos,” Nature Genetics, vol. 40, no. 12, pp. 1454–1460, 2008-12.
- [58] V. Moreno-Manzano, “Ependymal cells in the spinal cord as neuronal progenitors,” Current Opinion in Pharmacology, vol. 50, pp. 82–87, 2020-02.
- [59] B. V. Jacquet, R. Salinas-Mondragon, H. Liang, B. Therit, J. D. Buie, M. Dykstra, K. Campbell, L. E. Ostrowski, S. L. Brody, and H. T. Ghashghaei, “FoxJ1-dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain,” Development (Cambridge, England), vol. 136, no. 23, pp. 4021–4031, 2009-12.
- [60] X. Li, E. M. Floriddia, K. Toskas, C. Chalfouh, A. Honore, A. Aumont, N. Vallières, S. Lacroix, K. J. L. Fernandes, N. Guérout, and F. Barnabé-Heider, “FoxJ1 regulates spinal cord development and is required for the maintenance of spinal cord stem cell potential,” Experimental Cell Research, vol. 368, no. 1, pp. 84–100, 2018-01-07.
- [61] N. Muthusamy, A. Vijayakumar, G. Cheng, and H. T. Ghashghaei, “A knock-in Foxj1(CreERT2 : :GFP) mouse for recombination in epithelial cells with motile cilia,” Genesis (New York, N.Y. : 2000), vol. 52, no. 4, pp. 350–358, 2014-04.

- [62] J. Altman, "Are new neurons formed in the brains of adult mammals?," Science (New York, N.Y.), vol. 135, no. 3509, pp. 1127–1128, 1962-03-30.
- [63] E. K. Adrian and B. E. Walker, "Incorporation of thymidine-H3 by cells in normal and injured mouse spinal cord," Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, vol. 21, pp. 597–609, 1962-10.
- [64] S. Weiss, C. Dunne, J. Hewson, C. Wohl, M. Wheatley, A. C. Peterson, and B. A. Reynolds, "Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis," The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 16, no. 23, pp. 7599–7609, 1996-12-01.
- [65] C. B. Johansson, S. Momma, D. L. Clarke, M. Risling, U. Lendahl, and J. Frisé, "Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system," Cell, vol. 96, no. 1, pp. 25–34, 1999-01-08.
- [66] D. J. Martens, R. M. Seaberg, and D. van der Kooy, "In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord," The European Journal of Neuroscience, vol. 16, no. 6, pp. 1045–1057, 2002-09.
- [67] J.-P. Hugnot, "The Spinal Cord Neural Stem Cell Niche," Neural Stem Cells and Therapy, 2012-02-15.
- [68] P. J. Horner, A. E. Power, G. Kempermann, H. G. Kuhn, T. D. Palmer, J. Winkler, L. J. Thal, and F. H. Gage, "Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord," The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 20, no. 6, pp. 2218–2228, 2000-03-15.
- [69] S. Yamamoto, M. Nagao, M. Sugimori, H. Kosako, H. Nakatomi, N. Yamamoto, H. Takebayashi, Y. Nabeshima, T. Kitamura, G. Weinmaster, K. Nakamura, and M. Nakafuku, "Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord," The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 21, no. 24, pp. 9814–9823, 2001-12-15.
- [70] F. Barnabé-Heider, C. Göritz, H. Sabelström, H. Takebayashi, F. W. Pfrieger, K. Meletis, and J. Frisé, "Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord," Cell Stem Cell, vol. 7, no. 4, pp. 470–482, 2010-10-08.

- [71] C. Dromard, H. Guillon, V. Rigau, C. Ripoll, J. C. Sabourin, F. E. Perrin, F. Scamps, S. Bozza, P. Sabatier, N. Lonjon, H. Duffau, F. Vachiery-Lahaye, M. Prieto, C. Tran Van Ba, L. Deleyrolle, A. Boularan, K. Langley, M. Gaviria, A. Privat, J. P. Hugnot, and L. Bauchet, "Adult human spinal cord harbors neural precursor cells that generate neurons and glial cells in vitro," Journal of Neuroscience Research, vol. 86, no. 9, pp. 1916–1926, 2008-07.
- [72] I. Kulbatski and C. H. Tator, "Region-specific differentiation potential of adult rat spinal cord neural stem/precursors and their plasticity in response to in vitro manipulation," The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society, vol. 57, no. 5, pp. 405–423, 2009-05.
- [73] L. K. Hamilton, M. K. V. Truong, M. R. Bednarczyk, A. Aumont, and K. J. L. Fernandes, "Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord," Neuroscience, vol. 164, no. 3, pp. 1044–1056, 2009-12-15.
- [74] C. Dromard, S. Bartolami, L. Deleyrolle, H. Takebayashi, C. Ripoll, L. Simonneau, S. Prome, S. Puech, V. B. C. Tran, C. Duperray, J. Valmier, A. Privat, and J.-P. Hugnot, "NG2 and Olig2 expression provides evidence for phenotypic deregulation of cultured central nervous system and peripheral nervous system neural precursor cells," Stem Cells (Dayton, Ohio), vol. 25, no. 2, pp. 340–353, 2007-02.
- [75] J.-C. Sabourin, K. B. Ackema, D. Ohayon, P.-O. Guichet, F. E. Perrin, A. Garces, C. Ripoll, J. Charité, L. Simonneau, H. Kettenmann, A. Zine, A. Privat, J. Valmier, A. Pattyn, and J.-P. Hugnot, "A mesenchymal-like ZEB1(+) niche harbors dorsal radial glial fibrillary acidic protein-positive stem cells in the spinal cord," Stem Cells (Dayton, Ohio), vol. 27, no. 11, pp. 2722–2733, 2009-11.
- [76] I. Kulbatski, A. J. Mothe, A. Keating, Y. Hakamata, E. Kobayashi, and C. H. Tator, "Oligodendrocytes and radial glia derived from adult rat spinal cord progenitors : Morphological and immunocytochemical characterization," The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society, vol. 55, no. 3, pp. 209–222, 2007-03.
- [77] K. Nakashima and T. Taga, "Mechanisms underlying cytokine-mediated cell-fate regulation in the nervous system," Molecular Neurobiology, vol. 25, no. 3, pp. 233–244, 2002-06.

- [78] D. A. Lim, A. D. Tramontin, J. M. Trevejo, D. G. Herrera, J. M. García-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla, “Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis,” Neuron, vol. 28, no. 3, pp. 713–726, 2000-12.
- [79] Y. Kang, H. Ding, H. Zhou, Z. Wei, L. Liu, D. Pan, and S. Feng, “Epidemiology of worldwide spinal cord injury : A literature review,” Journal of Neurorestoratology, vol. Volume 6, pp. 1–9, 2017-12.
- [80] N. Weidner, R. Rupp, and K. Tansey, eds., Neurological Aspects of Spinal Cord Injury. Springer International Publishing, 2017.
- [81] A. A. Rabinstein, “Traumatic Spinal Cord Injury,” Continuum (Minneapolis, Minn.), vol. 24, pp. 551–566, 2018-04.
- [82] K. Venkatesh, S. K. Ghosh, M. Mullick, G. Manivasagam, and D. Sen, “Spinal cord injury : Pathophysiology, treatment strategies, associated challenges, and future implications,” Cell and Tissue Research, vol. 377, no. 2, pp. 125–151, 2019-08.
- [83] M. D. Stillman, J. Barber, S. Burns, S. Williams, and J. M. Hoffman, “Complications of Spinal Cord Injury Over the First Year After Discharge From Inpatient Rehabilitation,” Archives of Physical Medicine and Rehabilitation, vol. 98, no. 9, pp. 1800–1805, 2017-09.
- [84] M. R., “Choc neurogénique,” Revue Médicale Suisse, 2014.
- [85] P. C. Wing, “Early acute management in adults with spinal cord injury : A clinical practice guideline for health-care providers. Who should read it?,” The Journal of Spinal Cord Medicine, vol. 31, no. 4, p. 360, 2008.
- [86] T. C. Sutherland and C. G. Geoffroy, “The Influence of Neuron-Extrinsic Factors and Aging on Injury Progression and Axonal Repair in the Central Nervous System,” vol. 8, p. 190, 2020.
- [87] J. R. Wrathall, Y. D. Teng, and D. Choiniere, “Amelioration of functional deficits from spinal cord trauma with systemically administered NBQX, an antagonist of non-N-methyl-D-aspartate receptors,” Experimental Neurology, vol. 137, no. 1, pp. 119–126, 1996-01.
- [88] K. T. Kahle, J. M. Simard, K. J. Staley, B. V. Nahed, P. S. Jones, and D. Sun, “Molecular mechanisms of ischemic cerebral edema : Role of electroneutral ion transport,” Physiology (Bethesda, Md.), vol. 24, pp. 257–265, 2009-08.

- [89] D. Liu, G. Y. Xu, E. Pan, and D. J. McAdoo, "Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury," Neuroscience, vol. 93, no. 4, pp. 1383–1389, 1999.
- [90] D. J. McAdoo, M. G. Hughes, L. Nie, B. Shah, C. Clifton, S. Fullwood, and C. E. Hulsebosch, "The effect of glutamate receptor blockers on glutamate release following spinal cord injury. Lack of evidence for an ongoing feedback cascade of damage → glutamate release → damage → glutamate release → etc.," Brain Research, vol. 1038, no. 1, pp. 92–99, 2005-03-15.
- [91] I. Vanzulli and A. M. Butt, "mGluR5 protect astrocytes from ischemic damage in postnatal CNS white matter," Cell Calcium, vol. 58, no. 5, pp. 423–430, 2015-11.
- [92] R. Káradóttir and D. Attwell, "Neurotransmitter receptors in the life and death of oligodendrocytes," Neuroscience, vol. 145, no. 4, pp. 1426–1438, 2007-04-14.
- [93] J. D. Pandya, V. N. Nukala, and P. G. Sullivan, "Concentration dependent effect of calcium on brain mitochondrial bioenergetics and oxidative stress parameters," Frontiers in Neuroenergetics, vol. 5, p. 10, 2013.
- [94] M. Ma, "Role of calpains in the injury-induced dysfunction and degeneration of the mammalian axon," Neurobiology of Disease, vol. 60, pp. 61–79, 2013-12.
- [95] E. J. Bradbury and E. R. Burnside, "Moving beyond the glial scar for spinal cord repair," Nature Communications, vol. 10, no. 1, p. 3879, 2019-08-28.
- [96] M. L. Bennett, F. C. Bennett, S. A. Liddelow, B. Ajami, J. L. Zamanian, N. B. Fernhoff, S. B. Mulinyawe, C. J. Bohlen, A. Adil, A. Tucker, I. L. Weissman, E. F. Chang, G. Li, G. A. Grant, M. G. Hayden Gephart, and B. A. Barres, "New tools for studying microglia in the mouse and human CNS," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 113, no. 12, pp. E1738–1746, 2016-03-22.
- [97] T. Kaiser and G. Feng, "Tmem119-EGFP and Tmem119-CreERT2 Transgenic Mice for Labeling and Manipulating Microglia," eNeuro, vol. 6, no. 4, 2019 Jul/Aug.
- [98] C. Ruan, L. Sun, A. Kroshilina, L. Beckers, P. De Jager, E. M. Bradshaw, S. A. Hasson, G. Yang, and W. Elyaman, "A novel Tmem119-tdTomato reporter mouse model for studying microglia in the central nervous system," Brain, Behavior, and Immunity, vol. 83, pp. 180–191, 2020-01.

- [99] J. C. Gensel and B. Zhang, "Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury," Brain Research, vol. 1619, pp. 1–11, 2015-09-04.
- [100] R. Hohlfeld, M. Kerschensteiner, and E. Meinl, "Dual role of inflammation in CNS disease," Neurology, vol. 68, pp. S58–63 ; discussion S91–96, 2007-05-29.
- [101] K. A. Kigerl, J. C. Gensel, D. P. Ankeny, J. K. Alexander, D. J. Donnelly, and P. G. Popovich, "Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord," The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 29, no. 43, pp. 13435–13444, 2009-10-28.
- [102] A. Mantovani, S. K. Biswas, M. R. Galdiero, A. Sica, and M. Locati, "Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling," The Journal of Pathology, vol. 229, no. 2, pp. 176–185, 2013-01.
- [103] B. Fan, Z. Wei, X. Yao, G. Shi, X. Cheng, X. Zhou, H. Zhou, G. Ning, X. Kong, and S. Feng, "Microenvironment Imbalance of Spinal Cord Injury," Cell Transplantation, vol. 27, no. 6, pp. 853–866, 2018-06.
- [104] X. Z. Liu, X. M. Xu, R. Hu, C. Du, S. X. Zhang, J. W. McDonald, H. X. Dong, Y. J. Wu, G. S. Fan, M. F. Jacquin, C. Y. Hsu, and D. W. Choi, "Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury," The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 17, no. 14, pp. 5395–5406, 1997-07-15.
- [105] S. D. Grossman, L. J. Rosenberg, and J. R. Wrathall, "Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion," Experimental Neurology, vol. 168, no. 2, pp. 273–282, 2001-04.
- [106] G. L. Li, M. Farooque, A. Holtz, and Y. Olsson, "Apoptosis of oligodendrocytes occurs for long distances away from the primary injury after compression trauma to rat spinal cord," Acta Neuropathologica, vol. 98, no. 5, pp. 473–480, 1999-11.
- [107] A. Almad, F. R. Sahinkaya, and D. M. McTigue, "Oligodendrocyte fate after spinal cord injury," Neurotherapeutics : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, vol. 8, no. 2, pp. 262–273, 2011-04.
- [108] M. V. Sofroniew and H. V. Vinters, "Astrocytes : Biology and pathology," Acta Neuropathologica, vol. 119, no. 1, pp. 7–35, 2010-01.

- [109] J. P. O’Callaghan, K. A. Kelly, R. L. VanGilder, M. V. Sofroniew, and D. B. Miller, “Early activation of STAT3 regulates reactive astrogliosis induced by diverse forms of neurotoxicity,” PloS One, vol. 9, no. 7, p. e102003, 2014.
- [110] R. Brambilla, A. Hurtado, T. Persaud, K. Esham, D. D. Pearse, M. Oudega, and J. R. Bethea, “Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B leads to increased axonal sparing and sprouting following spinal cord injury,” Journal of Neurochemistry, vol. 110, no. 2, pp. 765–778, 2009-07.
- [111] S. Quraisha, L. H. Forbes, and M. R. Andrews, “The Extracellular Environment of the CNS : Influence on Plasticity, Sprouting, and Axonal Regeneration after Spinal Cord Injury,” Neural Plasticity, vol. 2018, p. 2952386, 2018.
- [112] J. R. Faulkner, J. E. Herrmann, M. J. Woo, K. E. Tansey, N. B. Doan, and M. V. Sofroniew, “Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury,” The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 24, no. 9, pp. 2143–2155, 2004-03-03.
- [113] T. Yang, Y. Dai, G. Chen, and S. Cui, “Dissecting the Dual Role of the Glial Scar and Scar-Forming Astrocytes in Spinal Cord Injury,” Frontiers in Cellular Neuroscience, vol. 14, p. 78, 2020.
- [114] O. Sugar and R. W. Gerard, “Spinal cord regeneration in the rat,” Journal of Neurophysiology, vol. 3, no. 1, pp. 1–19, 1940-01-01.
- [115] C. D. Clemente and W. F. Windle, “Regeneration of severed nerve fibers in the spinal cord of the adult cat,” The Journal of Comparative Neurology, vol. 101, no. 3, pp. 691–731, 1954-12.
- [116] T. M. O’Shea, J. E. Burda, and M. V. Sofroniew, “Cell biology of spinal cord injury and repair,” The Journal of Clinical Investigation, vol. 127, no. 9, pp. 3259–3270, 2017-09-01.
- [117] M. V. Sofroniew, “Dissecting spinal cord regeneration,” Nature, vol. 557, no. 7705, pp. 343–350, 2018-05.
- [118] Y. Ren, Y. Ao, T. M. O’Shea, J. E. Burda, A. M. Bernstein, A. J. Brumm, N. Muthusamy, H. T. Ghashghaei, S. T. Carmichael, L. Cheng, and M. V. Sofroniew, “Ependymal cell contribution to scar formation after spinal cord injury is minimal, local and dependent on direct ependymal injury,” Scientific Reports, vol. 7, p. 41122, 2017-01-24.

- [119] C. E. Hill, M. S. Beattie, and J. C. Bresnahan, "Degeneration and sprouting of identified descending supraspinal axons after contusive spinal cord injury in the rat," Experimental Neurology, vol. 171, no. 1, pp. 153–169, 2001-09.
- [120] J. W. Rowland, G. W. J. Hawryluk, B. Kwon, and M. G. Fehlings, "Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies : Promise on the horizon," Neurosurgical Focus, vol. 25, no. 5, p. E2, 2008.
- [121] M. P. Coleman and V. H. Perry, "Axon pathology in neurological disease : A neglected therapeutic target," Trends in Neurosciences, vol. 25, no. 10, pp. 532–537, 2002-10.
- [122] M. D. Ehlers, "Deconstructing the axon : Wallerian degeneration and the ubiquitin-proteasome system," Trends in Neurosciences, vol. 27, no. 1, pp. 3–6, 2004-01.
- [123] J. M. Cregg, M. A. DePaul, A. R. Filous, B. T. Lang, A. Tran, and J. Silver, "Functional regeneration beyond the glial scar," Experimental Neurology, vol. 253, pp. 197–207, 2014-03.
- [124] J. Silver and J. H. Miller, "Regeneration beyond the glial scar," Nature Reviews. Neuroscience, vol. 5, no. 2, pp. 146–156, 2004-02.
- [125] F. De Winter, M. Oudega, A. J. Lankhorst, F. P. Hamers, B. Blits, M. J. Ruitenberg, R. J. Pasterkamp, W. H. Gispen, and J. Verhaagen, "Injury-induced class 3 semaphorin expression in the rat spinal cord," Experimental Neurology, vol. 175, no. 1, pp. 61–75, 2002-05.
- [126] C. Soderblom, X. Luo, E. Blumenthal, E. Bray, K. Lyapichev, J. Ramos, V. Krishnan, C. Lai-Hsu, K. K. Park, P. Tsoulfas, and J. K. Lee, "Perivascular fibroblasts form the fibrotic scar after contusive spinal cord injury," The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 33, no. 34, pp. 13882–13887, 2013-08-21.
- [127] C. Göritz, D. O. Dias, N. Tomilin, M. Barbacid, O. Shupliakov, and J. Frisé, "A pericyte origin of spinal cord scar tissue," Science (New York, N.Y.), vol. 333, no. 6039, pp. 238–242, 2011-07-08.
- [128] Y. Zhu, C. Soderblom, V. Krishnan, J. Ashbaugh, J. R. Bethea, and J. K. Lee, "Hematogenous macrophage depletion reduces the fibrotic scar and increases axonal growth after spinal cord injury," Neurobiology of Disease, vol. 74, pp. 114–125, 2015-02.

- [129] D. O. Dias and C. Göritz, “Fibrotic scarring following lesions to the central nervous system,” vol. 68-69, pp. 561–570, 2018-08.
- [130] I. B. Wanner, M. A. Anderson, B. Song, J. Levine, A. Fernandez, Z. Gray-Thompson, Y. Ao, and M. V. Sofroniew, “Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury,” The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 33, no. 31, pp. 12870–12886, 2013-07-31.
- [131] M. V. Sofroniew, “Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators,” The Neuroscientist : A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry, vol. 20, no. 2, pp. 160–172, 2014-04.
- [132] M. A. Anderson, Y. Ao, and M. V. Sofroniew, “Heterogeneity of reactive astrocytes,” Neuroscience Letters, vol. 565, pp. 23–29, 2014-04-17.
- [133] J. L. Zamanian, L. Xu, L. C. Foo, N. Nouri, L. Zhou, R. G. Giffard, and B. A. Barres, “Genomic analysis of reactive astrogliosis,” The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 32, no. 18, pp. 6391–6410, 2012-05-02.
- [134] M. Hara, K. Kobayakawa, Y. Ohkawa, H. Kumamaru, K. Yokota, T. Saito, K. Kijima, S. Yoshizaki, K. Harimaya, Y. Nakashima, and S. Okada, “Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury,” Nature Medicine, vol. 23, no. 7, pp. 818–828, 2017-07.
- [135] B. S. Khakh and M. V. Sofroniew, “Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits,” Nature Neuroscience, vol. 18, no. 7, pp. 942–952, 2015-07.
- [136] C. Escartin, O. Guillemaud, and M.-A. Carrillo-de Sauvage, “Questions and (some) answers on reactive astrocytes,” Glia, vol. 67, no. 12, pp. 2221–2247, 2019-12.
- [137] M. Stenudd, H. Sabelström, and J. Frisén, “Role of endogenous neural stem cells in spinal cord injury and repair,” JAMA neurology, vol. 72, no. 2, pp. 235–237, 2015-02.
- [138] H. Sabelström, M. Stenudd, P. Réu, D. O. Dias, M. Elfineh, S. Zdunek, P. Damberg, C. Göritz, and J. Frisén, “Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice,” Science (New York, N.Y.), vol. 342, no. 6158, pp. 637–640, 2013-11-01.

- [139] L. Q. Bundesen, T. A. Scheel, B. S. Bregman, and L. F. Kromer, “Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte-meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats,” The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 23, no. 21, pp. 7789–7800, 2003-08-27.
- [140] A. R. Hackett and J. K. Lee, “Understanding the NG2 Glial Scar after Spinal Cord Injury,” Frontiers in Neurology, vol. 7, p. 199, 2016.
- [141] J. Levine, “The reactions and role of NG2 glia in spinal cord injury,” Brain Research, vol. 1638, pp. 199–208, 2016-01-05.
- [142] G. J. Duncan, S. B. Manesh, B. J. Hilton, P. Assinck, J. R. Plemel, and W. Tetzlaff, “The fate and function of oligodendrocyte progenitor cells after traumatic spinal cord injury,” vol. 68, no. 2, pp. 227–245, 2020-02.
- [143] D. L. Sellers, D. O. Maris, and P. J. Horner, “Postinjury niches induce temporal shifts in progenitor fates to direct lesion repair after spinal cord injury,” The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 29, no. 20, pp. 6722–6733, 2009-05-20.
- [144] P. Assinck, G. J. Duncan, J. R. Plemel, M. J. Lee, J. A. Stratton, S. B. Manesh, J. Liu, L. M. Ramer, S. H. Kang, D. E. Bergles, J. Biernaskie, and W. Tetzlaff, “Myelinogenic Plasticity of Oligodendrocyte Precursor Cells following Spinal Cord Contusion Injury,” The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 37, no. 36, pp. 8635–8654, 2017-06-09.
- [145] K. Bartus, J. Galino, N. D. James, L. R. Hernandez-Miranda, J. M. Dawes, F. R. Fricker, A. N. Garratt, S. B. McMahon, M. S. Ramer, C. Birchmeier, D. L. H. Bennett, and E. J. Bradbury, “Neuregulin-1 controls an endogenous repair mechanism after spinal cord injury,” Brain : A Journal of Neurology, vol. 139, pp. 1394–1416, 2016-05.
- [146] J. L. Arteta, “Research on the regeneration of the spinal cord in the cat submitted to the action of pyrogenous substances (5 OR 3895) of bacterial origin,” The Journal of Comparative Neurology, vol. 105, no. 2, pp. 171–184, 1956-09.
- [147] M. A. Matthews, M. F. St Onge, C. L. Faciane, and J. B. Gelderd, “Spinal cord transection : A quantitative analysis of elements of the connective tissue matrix formed within the site of lesion following administration of piromen, cytoxan or trypsin,” Neuropathology and Applied Neurobiology, vol. 5, no. 3, pp. 161–180, 1979 May-Jun.

- [148] M. A. Anderson, J. E. Burda, Y. Ren, Y. Ao, T. M. O'Shea, R. Kawaguchi, G. Coppola, B. S. Khakh, T. J. Deming, and M. V. Sofroniew, "Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration," Nature, vol. 532, no. 7598, pp. 195–200, 2016-04-14.
- [149] R. J. McKeon, M. J. Juryneć, and C. R. Buck, "The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar," The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 19, no. 24, pp. 10778–10788, 1999-12-15.
- [150] A. M. Tan, W. Zhang, and J. M. Levine, "NG2 : A component of the glial scar that inhibits axon growth," Journal of Anatomy, vol. 207, no. 6, pp. 717–725, 2005-12.
- [151] L. Uhlin-Hansen, T. Wik, L. Kjellén, E. Berg, F. Forsdahl, and S. O. Kolset, "Proteoglycan metabolism in normal and inflammatory human macrophages," Blood, vol. 82, no. 9, pp. 2880–2889, 1993-11-01.
- [152] R. A. Asher, D. A. Morgenstern, M. C. Shearer, K. H. Adcock, P. Pesheva, and J. W. Fawcett, "Versican is upregulated in CNS injury and is a product of oligodendrocyte lineage cells," The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 22, no. 6, pp. 2225–2236, 2002-03-15.
- [153] K. L. Adams and V. Gallo, "The diversity and disparity of the glial scar," Nature Neuroscience, vol. 21, no. 1, pp. 9–15, 2018-01.
- [154] S. A. Liddelow, K. A. Guttenplan, L. E. Clarke, F. C. Bennett, C. J. Bohlen, L. Schirmer, M. L. Bennett, A. E. Münch, W.-S. Chung, T. C. Peterson, D. K. Wilton, A. Frouin, B. A. Napier, N. Panicker, M. Kumar, M. S. Buckwalter, D. H. Rowitch, V. L. Dawson, T. M. Dawson, B. Stevens, and B. A. Barres, "Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia," Nature, vol. 541, no. 7638, pp. 481–487, 2017-01-26.
- [155] D. Qian, L. Li, Y. Rong, W. Liu, Q. Wang, Z. Zhou, C. Gu, Y. Huang, X. Zhao, J. Chen, J. Fan, and G. Yin, "Blocking Notch signal pathway suppresses the activation of neurotoxic A1 astrocytes after spinal cord injury," Cell Cycle (Georgetown, Tex.), vol. 18, no. 21, pp. 3010–3029, 2019-11.
- [156] L. Wang, S. Pei, L. Han, B. Guo, Y. Li, R. Duan, Y. Yao, B. Xue, X. Chen, and Y. Jia, "Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Reduce A1 Astrocytes via Downregulation of Phosphorylated NFKB P65 Subunit in Spinal Cord Injury," Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, vol. 50, no. 4, pp. 1535–1559, 2018.

- [157] M. V. Sofroniew, "Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation," Nature Reviews. Neuroscience, vol. 16, no. 5, pp. 249–263, 2015-05.
- [158] S. Okada, M. Nakamura, H. Katoh, T. Miyao, T. Shimazaki, K. Ishii, J. Yamane, A. Yoshimura, Y. Iwamoto, Y. Toyama, and H. Okano, "Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury," Nature Medicine, vol. 12, no. 7, pp. 829–834, 2006-07.
- [159] N. Haan, B. Zhu, J. Wang, X. Wei, and B. Song, "Crosstalk between macrophages and astrocytes affects proliferation, reactive phenotype and inflammatory response, suggesting a role during reactive gliosis following spinal cord injury," Journal of Neuroinflammation, vol. 12, p. 109, 2015-05-30.
- [160] Y. Zhang, Y. Zhou, S. Chen, Y. Hu, Z. Zhu, Y. Wang, N. Du, T. Song, Y. Yang, A. Guo, and Y. Wang, "Macrophage migration inhibitory factor facilitates prostaglandin E2 production of astrocytes to tune inflammatory milieu following spinal cord injury," Journal of Neuroinflammation, vol. 16, no. 1, p. 85, 2019-04-13.
- [161] J. P. Rodriguez, M. Coulter, J. Miotke, R. L. Meyer, K.-I. Takemaru, and J. M. Levine, "Abrogation of β -catenin signaling in oligodendrocyte precursor cells reduces glial scarring and promotes axon regeneration after CNS injury," The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 34, no. 31, pp. 10285–10297, 2014-07-30.
- [162] D. O. Dias, H. Kim, D. Holl, B. Werne Solnestam, J. Lundeberg, M. Carlén, C. Göritz, and J. Frisé, "Reducing Pericyte-Derived Scarring Promotes Recovery after Spinal Cord Injury," Cell, vol. 173, no. 1, pp. 153–165.e22, 2018-03-22.
- [163] L. D. Hachem, A. J. Mothe, and C. H. Tator, "Unlocking the paradoxical endogenous stem cell response after spinal cord injury," Stem Cells (Dayton, Ohio), vol. 38, no. 2, pp. 187–194, 2020-02.
- [164] L. D. Hachem, A. J. Mothe, and C. H. Tator, "Glutamate Increases In Vitro Survival and Proliferation and Attenuates Oxidative Stress-Induced Cell Death in Adult Spinal Cord-Derived Neural Stem/Progenitor Cells via Non-NMDA Ionotropic Glutamate Receptors," Stem Cells and Development, vol. 25, no. 16, pp. 1223–1233, 2016-08-15.
- [165] L. D. Hachem, A. J. Mothe, and C. H. Tator, "Positive Modulation of AMPA Receptors Promotes Survival and Proliferation of Neural Stem/Progenitor Cells from the Adult Rat Spinal Cord," Stem Cells and Development, vol. 26, no. 23, pp. 1675–1681, 2017-01-12.

- [166] L. D. Hachem, A. J. Mothe, and C. H. Tator, "Effect of BDNF and Other Potential Survival Factors in Models of In Vitro Oxidative Stress on Adult Spinal Cord-Derived Neural Stem/Progenitor Cells," BioResearch Open Access, vol. 4, no. 1, pp. 146–159, 2015.
- [167] Y. Ma, M. Deng, and M. Liu, "Effect of Differently Polarized Macrophages on Proliferation and Differentiation of Ependymal Cells from Adult Spinal Cord," Journal of Neurotrauma, vol. 36, no. 15, pp. 2337–2347, 2019-01-08.
- [168] K. Suehiro, Y. Nakamura, S. Xu, Y. Uda, T. Matsumura, Y. Yamaguchi, H. Okamura, T. Yamashita, and Y. Takei, "Ecto-domain phosphorylation promotes functional recovery from spinal cord injury," Scientific Reports, vol. 4, p. 4972, 2014-05-15.
- [169] "Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice," Brain : A Journal of Neurology, vol. 126, pp. 1628–1637, 2003-07.
- [170] B. W. Festoff, S. Ameenuddin, P. M. Arnold, A. Wong, K. S. Santacruz, and B. A. Citron, "Minocycline neuroprotects, reduces microgliosis, and inhibits caspase protease expression early after spinal cord injury," Journal of Neurochemistry, vol. 97, no. 5, pp. 1314–1326, 2006-06.
- [171] H. Takahashi, M. Yamazaki, A. Okawa, T. Sakuma, K. Kato, M. Hashimoto, K. Hayashi, T. Furuya, T. Fujiyoshi, J. Kawabe, T. Yamauchi, C. Mannoji, T. Miyashita, R. Kadota, M. Hashimoto, Y. Ito, K. Takahashi, and M. Koda, "Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor for acute spinal cord injury : A phase I/IIa clinical trial," European Spine Journal : Official Publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society, vol. 21, no. 12, pp. 2580–2587, 2012-12.
- [172] G. Schwartz and M. G. Fehlings, "Evaluation of the neuroprotective effects of sodium channel blockers after spinal cord injury : Improved behavioral and neuroanatomical recovery with riluzole," Journal of Neurosurgery, vol. 94, pp. 245–256, 2001-04.
- [173] P. E. Batchelor, T. E. Wills, P. Skeers, C. R. Battistuzzo, M. R. Macleod, D. W. Howells, and E. S. Sena, "Meta-analysis of pre-clinical studies of early decompression in acute spinal cord injury : A battle of time and pressure," PloS One, vol. 8, no. 8, p. e72659, 2013.

- [174] N. A. Silva, N. Sousa, R. L. Reis, and A. J. Salgado, "From basics to clinical : A comprehensive review on spinal cord injury," Progress in Neurobiology, vol. 114, pp. 25–57, 2014-03.
- [175] A. M. Siddiqui, M. Khazaei, and M. G. Fehlings, "Translating mechanisms of neuroprotection, regeneration, and repair to treatment of spinal cord injury," Progress in Brain Research, vol. 218, pp. 15–54, 2015.
- [176] I. Fischer, J. N. Dulin, and M. A. Lane, "Transplanting neural progenitor cells to restore connectivity after spinal cord injury," vol. 21, no. 7, pp. 366–383, 2020-07.
- [177] Y. Shen, A. P. Tenney, S. A. Busch, K. P. Horn, F. X. Cuascat, K. Liu, Z. He, J. Silver, and J. G. Flanagan, "PTPsigma is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration," Science (New York, N.Y.), vol. 326, no. 5952, pp. 592–596, 2009-10-23.
- [178] N. Forgione and M. G. Fehlings, "Rho-ROCK inhibition in the treatment of spinal cord injury," World Neurosurgery, vol. 82, no. 3-4, pp. e535–539, 2014 Sep-Oct.
- [179] M. G. Fehlings, K. D. Kim, B. Aarabi, M. Rizzo, L. M. Bond, L. McKerracher, A. R. Vaccaro, and D. O. Okonkwo, "Rho Inhibitor VX-210 in Acute Traumatic Subaxial Cervical Spinal Cord Injury : Design of the SPinal Cord Injury Rho INhibition InvestiGation (SPRING) Clinical Trial," Journal of Neurotrauma, vol. 35, no. 9, pp. 1049–1056, 2018-01-05.
- [180] C. S. Ahuja, A. Mothe, M. Khazaei, J. H. Badhiwala, E. A. Gilbert, D. van der Kooy, C. M. Morshead, C. Tator, and M. G. Fehlings, "The leading edge : Emerging neuroprotective and neuroregenerative cell-based therapies for spinal cord injury," Stem Cells Translational Medicine, 2020-07-21.
- [181] C. S. Ahuja, J. R. Wilson, S. Nori, M. R. N. Kotter, C. Druschel, A. Curt, and M. G. Fehlings, "Traumatic spinal cord injury," Nature Reviews. Disease Primers, vol. 3, p. 17018, 2017-04-27.
- [182] A. J. Vincent, A. K. West, and M. I. Chuah, "Morphological and functional plasticity of olfactory ensheathing cells," Journal of Neurocytology, vol. 34, no. 1-2, pp. 65–80, 2005-03.
- [183] N. Guérout, C. Derambure, L. Drouot, N. Bon-Mardion, C. Duclos, O. Boyer, and J.-P. Marie, "Comparative gene expression profiling of olfactory ensheathing cells from olfactory bulb and olfactory mucosa," Glia, vol. 58, no. 13, pp. 1570–1580, 2010-10.

- [184] G. Raisman and Y. Li, "Repair of neural pathways by olfactory ensheathing cells," Nature Reviews. Neuroscience, vol. 8, no. 4, pp. 312–319, 2007-04.
- [185] A. Lakatos, R. J. Franklin, and S. C. Barnett, "Olfactory ensheathing cells and Schwann cells differ in their in vitro interactions with astrocytes," Glia, vol. 32, no. 3, pp. 214–225, 2000-12.
- [186] A. Mayeur, C. Duclos, A. Honoré, M. Gauberti, L. Drouot, J.-C. do Rego, N. Bon-Mardion, L. Jean, E. Vérin, E. Emery, S. Lemarchant, D. Vivien, O. Boyer, J.-P. Marie, and N. Guérout, "Potential of olfactory ensheathing cells from different sources for spinal cord repair," PloS One, vol. 8, no. 4, p. e62860, 2013.
- [187] D. Choi and K. Gladwin, "Olfactory ensheathing cells : Part II—source of cells and application to patients," World Neurosurgery, vol. 83, no. 2, pp. 251–256, 2015-02.
- [188] R. Doucette, "Immunohistochemical localization of laminin, fibronectin and collagen type IV in the nerve fiber layer of the olfactory bulb," International Journal of Developmental Neuroscience : The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience, vol. 14, no. 7-8, pp. 945–959, 1996-11.
- [189] W. Tetzlaff, E. B. Okon, S. Karimi-Abdolrezaee, C. E. Hill, J. S. Sparling, J. R. Plemel, W. T. Plunet, E. C. Tsai, D. Baptiste, L. J. Smithson, M. D. Kawaja, M. G. Fehlings, and B. K. Kwon, "A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury," Journal of Neurotrauma, vol. 28, no. 8, pp. 1611–1682, 2011-08.
- [190] P. Tabakow, W. Jarmundowicz, B. Czapiga, W. Fortuna, R. Miedzybrodzki, M. Czyz, J. Huber, D. Szarek, S. Okurowski, P. Szewczyk, A. Gorski, and G. Raisman, "Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury," Cell Transplantation, vol. 22, no. 9, pp. 1591–1612, 2013.
- [191] P. Tabakow, G. Raisman, W. Fortuna, M. Czyz, J. Huber, D. Li, P. Szewczyk, S. Okurowski, R. Miedzybrodzki, B. Czapiga, B. Salomon, A. Halon, Y. Li, J. Lipiec, A. Kulczyk, and W. Jarmundowicz, "Functional regeneration of supraspinal connections in a patient with transected spinal cord following transplantation of bulbar olfactory ensheathing cells with peripheral nerve bridging," Cell Transplantation, vol. 23, no. 12, pp. 1631–1655, 2014.
- [192] A. Chari, I. D. Hentall, M. C. Papadopoulos, and E. A. C. Pereira, "Surgical Neurostimulation for Spinal Cord Injury," Brain Sciences, vol. 7, no. 2, 2017-02-10.

- [193] “Spinal Cord Stimulator,” Pain management clinics in Las Vegas | Nevada Comprehensive Pain Center, 2013-03-08T03 :39 :28+00 :00.
- [194] P. J. Grahn, I. A. Lavrov, D. G. Sayenko, M. G. Van Straaten, M. L. Gill, J. A. Strommen, J. S. Calvert, D. I. Drubach, L. A. Beck, M. B. Linde, A. R. Thoreson, C. Lopez, A. A. Mendez, P. N. Gad, Y. P. Gerasimenko, V. R. Edgerton, K. D. Zhao, and K. H. Lee, “Enabling Task-Specific Volitional Motor Functions via Spinal Cord Neuromodulation in a Human With Paraplegia,” Mayo Clinic Proceedings, vol. 92, no. 4, pp. 544–554, 2017-04.
- [195] M. L. Gill, P. J. Grahn, J. S. Calvert, M. B. Linde, I. A. Lavrov, J. A. Strommen, L. A. Beck, D. G. Sayenko, M. G. Van Straaten, D. I. Drubach, D. D. Veith, A. R. Thoreson, C. Lopez, Y. P. Gerasimenko, V. R. Edgerton, K. H. Lee, and K. D. Zhao, “Neuromodulation of lumbosacral spinal networks enables independent stepping after complete paraplegia,” Nature Medicine, vol. 24, no. 11, pp. 1677–1682, 2018-11.
- [196] R. van den Brand, J. Heutschi, Q. Barraud, J. DiGiovanna, K. Bartholdi, M. Huerlimann, L. Friedli, I. Vollenweider, E. M. Moraud, S. Duis, N. Dominici, S. Micera, P. Musienko, and G. Courtine, “Restoring voluntary control of locomotion after paralyzing spinal cord injury,” Science (New York, N.Y.), vol. 336, no. 6085, pp. 1182–1185, 2012-06-01.
- [197] F. B. Wagner, J.-B. Mignardot, C. G. Le Goff-Mignardot, R. Demesmaeker, S. Komi, M. Capogrosso, A. Rowald, I. Seáñez, M. Caban, E. Pirondini, M. Vat, L. A. McCracken, R. Heimgartner, I. Fodor, A. Watrin, P. Seguin, E. Paoles, K. Van Den Keybus, G. Eberle, B. Schurch, E. Pralong, F. Becce, J. Prior, N. Buse, R. Buschman, E. Neufeld, N. Kuster, S. Carda, J. von Zitzewitz, V. Delattre, T. Denison, H. Lambert, K. Minassian, J. Bloch, and G. Courtine, “Targeted neurotechnology restores walking in humans with spinal cord injury,” Nature, vol. 563, no. 7729, pp. 65–71, 2018-11.
- [198] M. A. Nitsche and W. Paulus, “Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation,” The Journal of Physiology, vol. 527 Pt 3, pp. 633–639, 2000-09-15.
- [199] R. Nardone, Y. Höller, A. Taylor, A. Thomschewski, A. Orioli, V. Frey, E. Trinka, and F. Brigo, “Noninvasive Spinal Cord Stimulation : Technical Aspects and Therapeutic Applications,” Neuromodulation, vol. 18, no. 7, pp. 580–591 ; discussion 590–591, 2015-10.
- [200] J. Finnegan and H. Ye, “Cell therapy for spinal cord injury informed by electromagnetic waves,” vol. 11, no. 7, pp. 675–691, 2016-10.

- [201] M. K. Sohn, S. J. Jee, and Y. W. Kim, "Effect of transcranial direct current stimulation on postural stability and lower extremity strength in hemiplegic stroke patients," Annals of Rehabilitation Medicine, vol. 37, no. 6, pp. 759–765, 2013-12.
- [202] S. S. Ayache, U. Palm, M. A. Chalah, T. Al-Ani, A. Brignol, M. Abdellaoui, D. Dimitri, M. Sorel, A. Créange, and J.-P. Lefaucheur, "Prefrontal tDCS Decreases Pain in Patients with Multiple Sclerosis," Frontiers in Neuroscience, vol. 10, p. 147, 2016.
- [203] S. Rossi, M. Hallett, P. M. Rossini, A. Pascual-Leone, and Safety of TMS Consensus Group, "Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research," Clinical Neurophysiology : Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology, vol. 120, no. 12, pp. 2008–2039, 2009-12.
- [204] J. E. Becker, E. K. B. Shultz, and C. T. Maley, "Transcranial Magnetic Stimulation in Conditions Other than Major Depressive Disorder," Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America, vol. 28, no. 1, pp. 45–52, 2019-01.
- [205] A. Dionísio, I. C. Duarte, M. Patrício, and M. Castelo-Branco, "The Use of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation for Stroke Rehabilitation : A Systematic Review," Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases : The Official Journal of National Stroke Association, vol. 27, no. 1, pp. 1–31, 2018-01.
- [206] F. Torres, E. Villalon, P. Poblete, R. Moraga-Amaro, S. Linsam Barth, R. Riquelme, A. Zangen, and J. Stehberg, "Retrospective Evaluation of Deep Transcranial Magnetic Stimulation as Add-On Treatment for Parkinson's Disease," Frontiers in Neurology, vol. 6, p. 210, 2015.
- [207] J. M. Rabey and E. Dobronevsky, "Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) combined with cognitive training is a safe and effective modality for the treatment of Alzheimer's disease : Clinical experience," Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996), vol. 123, no. 12, pp. 1449–1455, 2016-12.
- [208] M. C. Ridding and J. C. Rothwell, "Is there a future for therapeutic use of transcranial magnetic stimulation?," Nature Reviews. Neuroscience, vol. 8, no. 7, pp. 559–567, 2007-07.
- [209] Y. Roth, A. Amir, Y. Levkovitz, and A. Zangen, "Three-dimensional distribution of the electric field induced in the brain by transcranial magnetic stimulation using figure-

- 8 and deep H-coils,” Journal of Clinical Neurophysiology : Official Publication of the American Electroencephalographic Society, vol. 24, no. 1, pp. 31–38, 2007-02.
- [210] A. Valero-Cabré, A. Pascual-Leone, and O. A. Coubard, “[transcranial magnetic stimulation (tms) in basic and clinical neuroscience research],” Revue Neurologique, vol. 167, no. 4, pp. 291–316, 2011-04.
- [211] B. Glize, D. Guehl, P. Dehail, and I. Sibon, “Stimulation magnétique transcrânienne et accident vasculaire cérébral,” MISE AU POINT, p. 4.
- [212] D. H. Wilson and P. Jagadeesh, “Experimental regeneration in peripheral nerves and the spinal cord in laboratory animals exposed to a pulsed electromagnetic field,” Paraplegia, vol. 14, no. 1, pp. 12–20, 1976-05.
- [213] M. G. Orgel, W. J. O’Brien, and H. M. Murray, “Pulsing electromagnetic field therapy in nerve regeneration : An experimental study in the cat,” Plastic and Reconstructive Surgery, vol. 73, no. 2, pp. 173–183, 1984-02.
- [214] M. J. Crowe, Z.-P. Sun, J. H. Battocletti, M. Y. Macias, F. A. Pintar, and D. J. Maiman, “Exposure to pulsed magnetic fields enhances motor recovery in cats after spinal cord injury,” Spine, vol. 28, no. 24, pp. 2660–2666, 2003-12-15.
- [215] A.-L. Poirrier, Y. Nyssen, F. Scholtes, S. Multon, C. Rinkin, G. Weber, D. Bouhy, G. Brook, R. Franzen, and J. Schoenen, “Repetitive transcranial magnetic stimulation improves open field locomotor recovery after low but not high thoracic spinal cord compression-injury in adult rats,” Journal of Neuroscience Research, vol. 75, no. 2, pp. 253–261, 2004-01-15.
- [216] Z. Ahmed and A. Wieraszko, “Combined effects of acrobatic exercise and magnetic stimulation on the functional recovery after spinal cord lesions,” Journal of Neurotrauma, vol. 25, no. 10, pp. 1257–1269, 2008-10.
- [217] T. Tazoe and M. A. Perez, “Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on recovery of function after spinal cord injury,” Archives of Physical Medicine and Rehabilitation, vol. 96, pp. S145–155, 2015-04.
- [218] A. Kuppuswamy, A. V. Balasubramaniam, R. Maksimovic, C. J. Mathias, A. Gall, M. D. Craggs, and P. H. Ellaway, “Action of 5 Hz repetitive transcranial magnetic stimulation on sensory, motor and autonomic function in human spinal cord injury,”

- Clinical Neurophysiology : Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology, vol. 122, no. 12, pp. 2452–2461, 2011-12.
- [219] J. Benito, H. Kumru, N. Murillo, U. Costa, J. Medina, J. M. Tormos, A. Pascual-Leone, and J. Vidal, “Motor and gait improvement in patients with incomplete spinal cord injury induced by high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation,” Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation, vol. 18, no. 2, pp. 106–112, 2012.
- [220] M. Belci, M. Catley, M. Husain, H. L. Frankel, and N. J. Davey, “Magnetic brain stimulation can improve clinical outcome in incomplete spinal cord injured patients,” Spinal Cord, vol. 42, no. 7, pp. 417–419, 2004-07.
- [221] T. Niu, C. J. Bennett, T. L. Keller, J. C. Leiter, and D. C. Lu, “A Proof-of-Concept Study of Transcutaneous Magnetic Spinal Cord Stimulation for Neurogenic Bladder,” Scientific Reports, vol. 8, no. 1, p. 12549, 2018-08-22.
- [222] G. Cirillo, G. Di Pino, F. Capone, F. Ranieri, L. Florio, V. Todisco, G. Tedeschi, K. Funke, and V. Di Lazzaro, “Neurobiological after-effects of non-invasive brain stimulation,” Brain Stimulation, vol. 10, no. 1, pp. 1–18, 2017 Jan - Feb.
- [223] F. J. Medina and I. Túnez, “Mechanisms and pathways underlying the therapeutic effect of transcranial magnetic stimulation,” Reviews in the Neurosciences, vol. 24, no. 5, pp. 507–525, 2013.
- [224] C. L. Ross, I. Syed, T. L. Smith, and B. S. Harrison, “The regenerative effects of electromagnetic field on spinal cord injury,” Electromagnetic Biology and Medicine, vol. 36, no. 1, pp. 74–87, 2017.
- [225] A. V. Chervyakov, A. Y. Chernyavsky, D. O. Sinitsyn, and M. A. Piradov, “Possible Mechanisms Underlying the Therapeutic Effects of Transcranial Magnetic Stimulation,” vol. 9, p. 303, 2015.
- [226] E. Ueyama, S. Ukai, A. Ogawa, M. Yamamoto, S. Kawaguchi, R. Ishii, and K. Shinosaki, “Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation increases hippocampal neurogenesis in rats,” Psychiatry and Clinical Neurosciences, vol. 65, no. 1, pp. 77–81, 2011-02.
- [227] C. Perruisseau-Carrier, M. Jurga, N. Forraz, and C. P. McGuckin, “miRNAs stem cell reprogramming for neuronal induction and differentiation,” Molecular Neurobiology, vol. 43, no. 3, pp. 215–227, 2011-06.

- [228] J. O. Brett, V. M. Renault, V. A. Rafalski, A. E. Webb, and A. Brunet, "The microRNA cluster miR-106b~25 regulates adult neural stem/progenitor cell proliferation and neuronal differentiation," *Aging*, vol. 3, no. 2, pp. 108–124, 2011-02.
- [229] F. Guo, X. Han, J. Zhang, X. Zhao, J. Lou, H. Chen, and X. Huang, "Repetitive transcranial magnetic stimulation promotes neural stem cell proliferation via the regulation of MiR-25 in a rat model of focal cerebral ischemia," *PloS One*, vol. 9, no. 10, p. e109267, 2014.
- [230] Y.-h. Chen, R.-g. Zhang, F. Xue, H.-n. Wang, Y.-c. Chen, G.-t. Hu, Y. Peng, Z.-w. Peng, and Q.-r. Tan, "Quetiapine and repetitive transcranial magnetic stimulation ameliorate depression-like behaviors and up-regulate the proliferation of hippocampal-derived neural stem cells in a rat model of depression : The involvement of the BDNF/ERK signal pathway," *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, vol. 136, pp. 39–46, 2015-09.
- [231] M. Cui, H. Ge, H. Zhao, Y. Zou, Y. Chen, and H. Feng, "Electromagnetic Fields for the Regulation of Neural Stem Cells," *Stem Cells Int*, vol. 2017, p. 9898439, 2017.
- [232] C. K. Tong, J. Chen, A. Cebrián-Silla, Z. Mirzadeh, K. Obernier, C. D. Guinto, L. H. Tecott, J. M. García-Verdugo, A. Kriegstein, and A. Alvarez-Buylla, "Axonal control of the adult neural stem cell niche," *Cell Stem Cell*, vol. 14, no. 4, pp. 500–511, 2014-04-03.
- [233] N. Alenina and F. Klempin, "The role of serotonin in adult hippocampal neurogenesis," *Behavioural Brain Research*, vol. 277, pp. 49–57, 2015-01-15.
- [234] A. Zangen and K. Hyodo, "Transcranial magnetic stimulation induces increases in extracellular levels of dopamine and glutamate in the nucleus accumbens," *Neuroreport*, vol. 13, no. 18, pp. 2401–2405, 2002-12-20.
- [235] S. Grehl, H. M. Viola, P. I. Fuller-Carter, K. W. Carter, S. A. Dunlop, L. C. Hool, R. M. Sherrard, and J. Rodger, "Cellular and molecular changes to cortical neurons following low intensity repetitive magnetic stimulation at different frequencies," *Brain Stimulation*, vol. 8, no. 1, pp. 114–123, 2015 Jan-Feb.
- [236] J. Xiao, A. W. Wong, M. M. Willingham, M. van den Buuse, T. J. Kilpatrick, and S. S. Murray, "Brain-derived neurotrophic factor promotes central nervous system myelination via a direct effect upon oligodendrocytes," *Neuro-Signals*, vol. 18, no. 3, pp. 186–202, 2010.

- [237] M. A. Sherafat, M. Heibatollahi, S. Mongabadi, F. Moradi, M. Javan, and A. Ahmadiani, "Electromagnetic field stimulation potentiates endogenous myelin repair by recruiting subventricular neural stem cells in an experimental model of white matter demyelination," Journal of molecular neuroscience : MN, vol. 48, no. 1, pp. 144–153, 2012-09.
- [238] C. L. Cullen, M. Senesi, A. D. Tang, M. T. Clutterbuck, L. Auderset, M. E. O'Rourke, J. Rodger, and K. M. Young, "Low-intensity transcranial magnetic stimulation promotes the survival and maturation of newborn oligodendrocytes in the adult mouse brain," Glia, vol. 67, no. 8, pp. 1462–1477, 2019-08.
- [239] A. Prasad, D. B. L. Teh, A. Blasiak, C. Chai, Y. Wu, P. M. Gharibani, I. H. Yang, T. T. Phan, K. L. Lim, H. Yang, X. Liu, and A. H. All, "Static Magnetic Field Stimulation Enhances Oligodendrocyte Differentiation and Secretion of Neurotrophic Factors," Scientific Reports, vol. 7, no. 1, p. 6743, 2017-07-27.
- [240] F. Gao, S. Wang, Y. Guo, J. Wang, M. Lou, J. Wu, M. Ding, M. Tian, and H. Zhang, "Protective effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in a rat model of transient cerebral ischaemia : A microPET study," European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, vol. 37, no. 5, pp. 954–961, 2010-05.
- [241] K. J. Yoon, Y.-T. Lee, and T. R. Han, "Mechanism of functional recovery after repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in the subacute cerebral ischemic rat model : Neural plasticity or anti-apoptosis?," Experimental Brain Research, vol. 214, no. 4, pp. 549–556, 2011-10.
- [242] G. Vangeison, D. Carr, H. J. Federoff, and D. A. Rempe, "The good, the bad, and the cell type-specific roles of hypoxia inducible factor-1 alpha in neurons and astrocytes," The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 28, no. 8, pp. 1988–1993, 2008-02-20.
- [243] F. Vincenzi, A. Ravani, S. Pasquini, S. Merighi, S. Gessi, S. Setti, R. Cadossi, P. A. Borea, and K. Varani, "Pulsed Electromagnetic Field Exposure Reduces Hypoxia and Inflammation Damage in Neuron-Like and Microglial Cells," Journal of Cellular Physiology, vol. 232, no. 5, pp. 1200–1208, 2017-05.
- [244] X. Yang, L. Song, and Z. Liu, "The effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on a model rat of Parkinson's disease," Neuroreport, vol. 21, no. 4, pp. 268–272, 2010-03-10.

- [245] G. Courtine, R. van den Brand, and P. Musienko, "Spinal cord injury : Time to move," Lancet (London, England), vol. 377, no. 9781, pp. 1896–1898, 2011-06-04.
- [246] F. W. Petraglia, S. H. Farber, R. Gramer, T. Verla, F. Wang, S. Thomas, B. Parente, and S. P. Lad, "The Incidence of Spinal Cord Injury in Implantation of Percutaneous and Paddle Electrodes for Spinal Cord Stimulation," Neuromodulation : Journal of the International Neuromodulation Society, vol. 19, no. 1, pp. 85–90, 2016-01.
- [247] Z. Li, Z.-Y. Fang, L. Xiong, and X.-L. Huang, "Spinal cord injury-induced astrocyte migration and glial scar formation : Effects of magnetic stimulation frequency," Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, vol. 47, no. 6, pp. 359–363, 2010-12.
- [248] J. Y. Kim, G.-S. Choi, Y.-W. Cho, H. Cho, S.-J. Hwang, and S.-H. Ahn, "Attenuation of spinal cord injury-induced astroglial and microglial activation by repetitive transcranial magnetic stimulation in rats," Journal of Korean Medical Science, vol. 28, no. 2, pp. 295–299, 2013-02.
- [249] Y. S. Gwak and C. E. Hulsebosch, "Remote astrocytic and microglial activation modulates neuronal hyperexcitability and below-level neuropathic pain after spinal injury in rat," Neuroscience, vol. 161, no. 3, pp. 895–903, 2009-07-07.
- [250] W. Gao, L.-G. Yu, Y.-L. Liu, Y.-Z. Wang, and X.-L. Huang, "Mechanism of GABA receptors involved in spasticity inhibition induced by transcranial magnetic stimulation following spinal cord injury," Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban, vol. 35, no. 2, pp. 241–247, 2015-04.
- [251] A. S. Hunanyan, H. A. Petrosyan, V. Alessi, and V. L. Arvanian, "Repetitive spinal electromagnetic stimulation opens a window of synaptic plasticity in damaged spinal cord : Role of NMDA receptors," Journal of Neurophysiology, vol. 107, no. 11, pp. 3027–3039, 2012-06.
- [252] Z. Ahmed, M. Wagdy, M. Benjamin, S. Mohamed, H. Mohamed, S. Ahmed, B. Kanjilal, and A. Wieraszko, "Therapeutic effects of acrobatic exercise and magnetic field exposure on functional recovery after spinal cord injury in mice," Bioelectromagnetics, vol. 32, no. 1, pp. 49–57, 2011-01.
- [253] M. Leydeker, S. Delva, I. Tserlyuk, J. Yau, M. Wagdy, A. Hawash, S. Bendaoud, S. Mohamed, A. Wieraszko, and Z. Ahmed, "The effects of 15 Hz trans-spinal magnetic

- stimulation on locomotor control in mice with chronic contusive spinal cord injury,” Electromagnetic Biology and Medicine, vol. 32, no. 2, pp. 155–164, 2013-06.
- [254] B. V. Jacquet, N. Muthusamy, L. J. Sommerville, G. Xiao, H. Liang, Y. Zhang, M. J. Holtzman, and H. T. Ghashghaei, “Specification of a Foxj1-dependent lineage in the forebrain is required for embryonic-to-postnatal transition of neurogenesis in the olfactory bulb,” The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 31, no. 25, pp. 9368–9382, 2011-06-22.
- [255] N. Guérout, C. Duclos, L. Drouot, O. Abramovici, N. Bon-Mardion, Y. Lacoume, L. Jean, O. Boyer, and J.-P. Marie, “Transplantation of olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration and functional recovery of peripheral nerve lesion in rats,” Muscle & Nerve, vol. 43, no. 4, pp. 543–551, 2011-04.
- [256] A. Honoré, S. Le Corre, C. Derambure, R. Normand, C. Duclos, O. Boyer, J.-P. Marie, and N. Guérout, “Isolation, characterization, and genetic profiling of subpopulations of olfactory ensheathing cells from the olfactory bulb,” Glia, vol. 60, no. 3, pp. 404–413, 2012-03.
- [257] E. H. P. Franssen, F. M. de Bree, and J. Verhaagen, “Olfactory ensheathing glia : Their contribution to primary olfactory nervous system regeneration and their regenerative potential following transplantation into the injured spinal cord,” Brain Research Reviews, vol. 56, no. 1, pp. 236–258, 2007-11.
- [258] J. R. Wilson, D. W. Cadotte, and M. G. Fehlings, “Clinical predictors of neurological outcome, functional status, and survival after traumatic spinal cord injury : A systematic review,” Journal of Neurosurgery. Spine, vol. 17, pp. 11–26, 2012-09.
- [259] A. Alizadeh, S. M. Dyck, and S. Karimi-Abdolrezaee, “Traumatic Spinal Cord Injury : An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms,” Frontiers in Neurology, vol. 10, p. 282, 2019.
- [260] A. Campbell, T. Brieva, L. Raviv, J. Rowley, K. Niss, H. Brandwein, S. Oh, and O. Karnieli, “Concise Review : Process Development Considerations for Cell Therapy,” Stem Cells Translational Medicine, vol. 4, no. 10, pp. 1155–1163, 2015-10.
- [261] S. Nori, Y. Okada, S. Nishimura, T. Sasaki, G. Itakura, Y. Kobayashi, F. Renault-Mihara, A. Shimizu, I. Koya, R. Yoshida, J. Kudoh, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Ikeda, Y. Toyama, M. Nakamura, and H. Okano, “Long-term safety issues of ipsc-based cell therapy in

- a spinal cord injury model : Oncogenic transformation with epithelial-mesenchymal transition,” Stem Cell Reports, vol. 4, no. 3, pp. 360–373, 2015-03-10.
- [262] M. Yousefifard, V. Rahimi-Movaghar, F. Nasirinezhad, M. Baikpour, S. Safari, S. Saadat, A. Moghadas Jafari, H. Asady, S. M. T. Razavi Tousi, and M. Hosseini, “Neural stem/progenitor cell transplantation for spinal cord injury treatment; A systematic review and meta-analysis,” Neuroscience, vol. 322, pp. 377–397, 2016-05-13.
- [263] H. S. Sohn, J. S. Heo, H.-S. Kim, Y. Choi, and H. O. Kim, “Duration of in vitro storage affects the key stem cell features of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for clinical transplantation,” Cytotherapy, vol. 15, no. 4, pp. 460–466, 2013-04.
- [264] A. Badner, A. M. Siddiqui, and M. G. Fehlings, “Spinal cord injuries : How could cell therapy help ?,” Expert Opinion on Biological Therapy, vol. 17, no. 5, pp. 529–541, 2017-05.
- [265] E. Rejc and C. A. Angeli, “Spinal Cord Epidural Stimulation for Lower Limb Motor Function Recovery in Individuals with Motor Complete Spinal Cord Injury,” Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America, vol. 30, no. 2, pp. 337–354, 2019-05.
- [266] W. Song and J. H. Martin, “Spinal cord direct current stimulation differentially modulates neuronal activity in the dorsal and ventral spinal cord,” Journal of Neurophysiology, vol. 117, no. 3, pp. 1143–1155, 2017-01-03.
- [267] F. Müller-Dahlhaus and A. Vlachos, “Unraveling the cellular and molecular mechanisms of repetitive magnetic stimulation,” Frontiers in Molecular Neuroscience, vol. 6, p. 50, 2013.
- [268] A. Opitz, M. Windhoff, R. M. Heidemann, R. Turner, and A. Thielscher, “How the brain tissue shapes the electric field induced by transcranial magnetic stimulation,” NeuroImage, vol. 58, no. 3, pp. 849–859, 2011-10-01.
- [269] T. Nakanishi, Y. Fujita, T. Tanaka, and T. Yamashita, “Anti-repulsive guidance molecule-a antibody treatment and repetitive transcranial magnetic stimulation have synergistic effects on motor recovery after spinal cord injury,” Neuroscience Letters, vol. 709, p. 134329, 2019-09-14.
- [270] Z. Li, F. Yao, L. Cheng, W. Cheng, L. Qi, S. Yu, L. Zhang, X. Zha, and J. Jing, “Low frequency pulsed electromagnetic field promotes the recovery of neurological function

- after spinal cord injury in rats,” Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society, vol. 37, no. 2, pp. 449–456, 2019-02.
- [271] H. A. Petrosyan, V. Alessi, A. S. Hunanyan, S. A. Sisto, and V. L. Arvanian, “Spinal electro-magnetic stimulation combined with transgene delivery of neurotrophin NT-3 and exercise : Novel combination therapy for spinal contusion injury,” Journal of Neurophysiology, vol. 114, no. 5, pp. 2923–2940, 2015-11.
- [272] K. Makowiecki, A. R. Harvey, R. M. Sherrard, and J. Rodger, “Low-intensity repetitive transcranial magnetic stimulation improves abnormal visual cortical circuit topography and upregulates BDNF in mice,” The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 34, no. 32, pp. 10780–10792, 2014-08-06.
- [273] M. E. Bechler, M. Swire, and C. Ffrench-Constant, “Intrinsic and adaptive myelination- A sequential mechanism for smart wiring in the brain,” Developmental Neurobiology, vol. 78, no. 2, pp. 68–79, 2018-02.
- [274] J. H. Hines, A. M. Ravanelli, R. Schwindt, E. K. Scott, and B. Appel, “Neuronal activity biases axon selection for myelination in vivo,” Nature Neuroscience, vol. 18, no. 5, pp. 683–689, 2015-05.
- [275] A. D. Gaudet and L. K. Fonken, “Glial Cells Shape Pathology and Repair After Spinal Cord Injury,” Neurotherapeutics : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, vol. 15, no. 3, pp. 554–577, 2018-07.
- [276] C. L. Cullen and K. M. Young, “How Does Transcranial Magnetic Stimulation Influence Glial Cells in the Central Nervous System ?,” Frontiers in Neural Circuits, vol. 10, p. 26, 2016.
- [277] Z.-C. Zhang, F. Luan, C.-Y. Xie, D.-D. Geng, Y.-Y. Wang, and J. Ma, “Low-frequency transcranial magnetic stimulation is beneficial for enhancing synaptic plasticity in the aging brain,” Neural Regeneration Research, vol. 10, no. 6, pp. 916–924, 2015-06.
- [278] M. Cui, H. Ge, H. Zeng, H. Yan, L. Zhang, H. Feng, and Y. Chen, “Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Promotes Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation after Intracerebral Hemorrhage in Mice,” Cell Transplantation, vol. 28, no. 5, pp. 568–584, 2019-05.
- [279] M. T. Filbin, “Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS,” Nature Reviews. Neuroscience, vol. 4, no. 9, pp. 703–713, 2003-09.

-
- [280] D. M. Stein, J. A. Pineda, V. Roddy, and W. A. Knight, "Emergency Neurological Life Support : Traumatic Spine Injury," Neurocritical Care, vol. 23 Suppl 2, pp. S155–164, 2015-12.
- [281] L. D. Hachem, C. S. Ahuja, and M. G. Fehlings, "Assessment and management of acute spinal cord injury : From point of injury to rehabilitation," The Journal of Spinal Cord Medicine, vol. 40, no. 6, pp. 665–675, 2017-11.

