



HAL
open science

Lésion médullaire traumatique : Etude des modifications cérébrales et des propriétés neuro-régénératives des cellules gliales olfactives

Quentin Delarue

► To cite this version:

Quentin Delarue. Lésion médullaire traumatique : Etude des modifications cérébrales et des propriétés neuro-régénératives des cellules gliales olfactives. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMR098 . tel-04061938

HAL Id: tel-04061938

<https://theses.hal.science/tel-04061938>

Submitted on 7 Apr 2023

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 SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Lésion médullaire traumatique : Etude des modifications cérébrales et des propriétés neuro-régénératives des cellules gliales olfactives

Présentée et soutenue par
QUENTIN DELARUE

Thèse soutenue le 06/12/2022
devant le jury composé de

M. JEAN-PHILIPPE HUGNOT	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE MONTPELLIER 2 SCIENCES ET TECH DU LANGUEDOC	Rapporteur du jury
MME MEHRNAZ JAFARIAN-TEHRANI	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE PARIS CITE	Rapporteur du jury
MME CATALINA ABAD RABAT	, Université de Rouen Normandie	Membre du jury
MME FATIHA NOTHIAS	DIRECTEUR DE RECHERCHE, SORBONNE UNIVERSITE	Membre du jury
M. MICHEL SALZET	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE LILLE 1 SCIENCES ET TECHNOLOGIE	Membre du jury
M. PIERRICK GANDOLFO	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Rouen Normandie	Président du jury
M. NICOLAS GUEROUT	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE PARIS CITE	Directeur de thèse

Thèse dirigée par NICOLAS GUEROUT (GROUPE DE RECHERCHE SUR LE HANDICAP VENTILATOIRE ET NEUROLOGIQUE)



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Lésion médullaire traumatique : Etude des modifications cérébrales et des propriétés neuro-régénératives des cellules gliales olfactives

Présentée et soutenue par
QUENTIN DELARUE

Thèse soutenue le 06/12/2022
devant le jury composé de

M. JEAN-PHILIPPE HUGNOT	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE MONTPELLIER 2 SCIENCES ET TECH DU LANGUEDOC	Rapporteur du jury
MME MEHRNAZ JAFARIAN-TEHRANI	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE PARIS CITE	Rapporteur du jury
MME CATALINA ABAD RABAT	INGENIEUR, Université de Rouen Normandie	Membre du jury
M. PIERRICK GANDOLFO	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Rouen Normandie	Membre du jury
MME FATIHA NOTHIAS	DIRECTEUR DE RECHERCHE, SORBONNE UNIVERSITE	Membre du jury
M. MICHEL SALZET	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE LILLE 1 SCIENCES ET TECHNOLOGIE	Membre du jury
M. NICOLAS GUEROUT	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE PARIS CITE	Directeur de thèse

Thèse dirigée par NICOLAS GUEROUT (GROUPE DE RECHERCHE SUR LE HANDICAP VENTILATOIRE ET NEUROLOGIQUE)

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier le Professeur Jean Paul Marie de m'avoir accueilli dans le laboratoire pendant ces six années. J'ai apprécié échanger avec vous aussi bien professionnellement que personnellement. Vous côtoyer, m'a permis d'apprendre et de mieux appréhender mon avenir professionnel.

J'adresse mes remerciements au Professeur Mehrnaz Jafarian-Tehrani et au Professeur Jean-Phillipe Hugnot, pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse en tant que rapporteur.

Je remercie le Docteur Fatiha Nothias, le Docteur Catalina Abad Rabat, le Professeur Michel Salzet et le Professeur Pierrick Gandolfo d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant qu'examineurs. Je tiens aussi à remercier le Professeur Michel Salzet pour avoir accepté d'être membre de mon CSI et de m'avoir orienté durant ma thèse.

Je tiens particulièrement à remercier l'ensemble de mon équipe et toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler et qui ont égayé mon doctorat Xiaofei, Axel, Gaëtan, Benjamin, Axelle, Amandine, Hugo, Pauline, Alizée, Laurine, Emma, Maëlle, Julien, Juliette, Hugo, Léa et Clémence, ainsi que Marie-Anne, Marie, Matthieu, Coraline, Theo, Chloé et Léa.

Je souhaite également remercier Célia et Sophia pour m'avoir aidé, soutenu et motivé lors de la rédaction de ce manuscrit.

Un très grand merci à Nicolas Guérout pour m'avoir fait confiance depuis le Master. Apprendre de toi a été ce qu'il pouvait m'arriver de mieux. Je ne peux pas imaginer ce qu'aurait été mon doctorat avec quelqu'un d'autre. En plus de m'enrichir professionnellement, tu as été là personnellement et émotionnellement. Tu es bien plus que mon directeur de thèse, tu es un vrai ami.

Je remercie ma mère d'avoir passé des heures à lire et à relire ce manuscrit. Tu as nettement contribué à son élaboration. Je suis content que maintenant tu maîtrises parfaitement le sujet.

Enfin je désire remercier tout particulièrement ma grande famille sans qui je n'aurais jamais pu réussir à arriver jusque-là. Merci à mes parents, mes frères et mes beaux-parents,

ainsi qu'Agathe, Alexis, Aurélien, Camille, Elodie, Fabien, Florian, Floriane, Jules, Laetitia, Laura, Mathieu, Matthieu, Paul, Pauline, Pierre, Romain, Thomas et les petites dernières Eléa, Ambre et Noélie.

Pour finir, Adeline, merci d'être là depuis le premier jour de ce doctorat. En ta compagnie tout est facile et réalisable.

SOMMAIRE

LISTE DES PUBLICATIONS.....	5
LISTE DES FIGURES.....	7
LISTE DES ABREVIATIONS.....	9
AVANT-PROPOS.....	13
INTRODUCTION.....	18
Chapitre I : Le système nerveux central.....	19
1. La moelle spinale.....	20
1.1. Anatomie et fonction.....	20
1.2. Structure tissulaire.....	22
1.2.1. Substance grise.....	22
1.2.2. Substance blanche.....	24
1.2.3. Canal central.....	29
1.2.4. Nerfs spinaux.....	30
1.2.5. Méninges.....	32
1.2.6. Réseau sanguin.....	33
1.2.7. Réseau glymphatique.....	36
1.2.8. Le système ventriculaire.....	39
1.3. Composition cellulaire.....	42
1.3.1. Neurones et axones.....	42
1.3.2. Cellules gliales.....	45
2. Encéphale.....	72
2.1. Bulbes olfactifs.....	72
2.1.1. Structure.....	72
2.1.2. Cellules gliales olfactives.....	74
2.2. Hippocampe.....	76
2.2.1. Structure.....	77
2.2.2. Mémoire.....	78
2.2.3. Neurogenèse.....	79
2.3. Zone ventriculaire, sous ventriculaire et RMS.....	82
2.3.1. Structure et neurogenèse.....	82
Chapitre II : Les lésions médullaires traumatiques.....	85
1. Etiologie.....	86
2. Mortalité et complications.....	88
3. Physiopathologie.....	88

3.1. Inflammation, réponse immunitaire et formation de la cicatrice médullaire.....	89
3.1.1. Hémorragie et ischémie.....	89
3.1.2. Phase immédiate.....	89
3.1.3. Phase aiguë.....	91
3.1.4. Cicatrice médullaire.....	94
3.1.5. Régénération.....	97
4. Conséquences périphériques	101
5. Conséquences cérébrales.....	103
Chapitre III : Stratégies thérapeutiques.....	107
1. Pratiques cliniques actuelles.....	109
2. Thérapies étudiées	113
2.1. Approche pharmacologie.....	113
2.1.1. Modulation de la matrice extracellulaire	113
2.1.2. Anti-inflammatoire	113
2.1.3. Neuroprotection et neurorégénération.....	116
2.2. Stimulation électrique.....	118
2.3. Stimulation magnétique.....	120
2.4. Transplantation cellulaire	123
2.4.1. Cellules de Schwann.....	124
2.4.2. Cellules souches embryonnaires.....	125
2.4.3. Cellules souches pluripotentes induites.....	127
2.4.4. Cellules souches neurales ou progéniteurs neuronaux	128
2.4.5. Cellules souches mésenchymateuses.....	129
2.4.6. Cellules gliales olfactives	130
OBJECTIFS DE THESE.....	137
RÉSULTATS	140
Article I - Resident neural stem cells guarantee the regeneration promoted by bulbar olfactory ensheathing cell transplantation after spinal cord injury.....	141
Introduction article I.....	142
Article II - Spinal cord Injury: Can the lesion alter the therapeutic potential of the transplanted cells in an autograft model.....	144
Introduction article II.....	145
Article III - Repetitive Trans Spinal Magnetic Stimulation Improves Functional Recovery and Tissue Repair in Contusive and Penetrating Spinal Cord Injury Models in Rats.....	259
Introduction article III	260
Article IV - Comparison of the effects of two therapeutic strategies based on olfactory ensheathing cell transplantation and repetitive magnetic stimulation after spinal cord injury in female mice ...	279
Introduction article IV	280

DISCUSSION	297
CONCLUSION	325
BIBLIOGRAPHIE	329
ANNEXES	365
ANNEXE I - The Regenerative Effect of Trans-spinal Magnetic Stimulation After Spinal Cord Injury: Mechanisms and Pathways Underlying the Effect.	366
ANNEXE II - Spinal cord injury: can we repair spinal cord non-invasively by using magnetic stimulation?	387
ANNEXE III - Inhibition of ADAMTS-4 Expression in Olfactory Ensheathing Cells Enhances Recovery after Transplantation within Spinal Cord Injury	391

LISTE DES PUBLICATIONS

Travaux principaux :

1- **Delarue, Q.**, Brodier, M., Robac, A., Blondin, A., Guillou, C., Duclos, C., Pileyre, B., Moncomble, L., Lecras, P., Hugede, A., et al. Spinal cord Injury: Can the lesion alter the therapeutic potential of the transplanted cells in an autograft model. En écriture

2- Li, X.*, Honore, A.*, **Delarue, Q.***, Chalfouh, C., Di Giovanni, M., Vaudry, D., Salaun, M., Marie, J.P., A., Barnabé-Heider, F., Guérout, N Resident neural stem cells guarantee the regeneration promoted by bulbar olfactory ensheathing cell transplantation after spinal cord injury. En écriture

3- **Delarue Q**, Robac A, Massardier R, Marie JP, Guérout N. Comparison of the effects of two therapeutic strategies based on olfactory ensheathing cell transplantation and repetitive magnetic stimulation after spinal cord injury in female mice. J Neurosci Res. 2021 Jul;99(7):1835-1849. doi: 10.1002/jnr.24836. Epub 2021 May 7. PMID: 33960512; PMCID: PMC8359979.

4- **Delarue Q***, Mayeur A*, Chalfouh C, Honoré A, Duclos C, Di Giovanni M, Li X, Salaun M, Dampierre J, Vaudry D, Marie JP, Guérout N. Inhibition of ADAMTS-4 Expression in Olfactory Ensheathing Cells Enhances Recovery after Transplantation within Spinal Cord Injury. J Neurotrauma. 2020 Feb 1;37(3):507-516. doi: 10.1089/neu.2019.6481. Epub 2019 Aug 27. PMID: 31264504

5- Robac A, Neveu P, Hugede A, Garrido E, Nicol L, **Delarue Q**, Guérout N. Repetitive Trans Spinal Magnetic Stimulation Improves Functional Recovery and Tissue Repair in Contusive and Penetrating Spinal Cord Injury Models in Rats. Biomedicines. 2021 Dec 3;9(12):1827. doi: 10.3390/biomedicines9121827. PMID: 34944643; PMCID: PMC8698720.

6- Chir, M., Duclos, C., Marie, J.-P., Guérout, N., and **Delarue, Q.** Magnetic Stimulation improves Sciatic Nerve Regeneration and the Remodeling of Gastrocnemius Muscle by Modulation of Macrophages Polarization. En écriture

Travaux annexes :

7- Chalfouh C, Guillou C, Hardouin J, **Delarue Q**, Li X, Duclos C, Schapman D, Marie JP, Cosette P, Guérout N. The Regenerative Effect of Trans-spinal Magnetic Stimulation After Spinal Cord Injury: Mechanisms and Pathways Underlying the Effect. Neurotherapeutics. 2020 Oct;17(4):2069-2088. doi: 10.1007/s13311-020-00915-5. PMID: 32856173; PMCID: PMC7851265

8- Chevalier, E., Duclos, C., Guérout, N., **Delarue, Q.**, and Marie, J.-P. Facial Nerve Injury: Silk Interposition Sleeve to Improve Axonal Regrowth and Myelination. En écriture

9- Garrido, E., Robac, A., Hugede, A., Neveu, P., **Delarue, Q.**, Duclos, C., Marie, J.-P., Derrey, S., and Guérout, N. Repetitive Trans-Spinal Magnetic Stimulation Effects Can Be Applied as Long-Term Therapie to Improve Functional Recovery After Severe Spinal Cord Injury in Rats. En soumission

10- Bense F, Montava M, Duclos C, Bisson A, **Delarue Q**, Mardion NB, Boyer O, Féron F, Guérout N, Marie JP. Syngeneic Transplantation of Rat Olfactory Stem Cells in a Vein Conduit Improves Facial Movements and Reduces Synkinesis after Facial Nerve Injury. *Plast Reconstr Surg.* 2020 Dec;146(6):1295-1305. doi: 10.1097/PRS.00000000000007367. PMID: 33234960.

11- Chevreau R, Ghazale H, Ripoll C, Chalfouh C, **Delarue Q**, Hemonnot-Girard AL, Mamaeva D, Hirbec H, Rothhut B, Wahane S, Perrin FE, Noristani HN, Guerout N, Hugnot JP. RNA Profiling of Mouse Ependymal Cells after Spinal Cord Injury Identifies the Oncostatin Pathway as a Potential Key Regulator of Spinal Cord Stem Cell Fate. *Cells.* 2021 Nov 27;10(12):3332. doi: 10.3390/cells10123332. PMID: 34943841; PMCID: PMC8699053.

Revues :

12- **Delarue, Q.**; Guérout, N. Transplantation of Olfactory Ensheathing Cells: Properties and Therapeutic Effects after Transplantation into the Lesioned Nervous System. *Neuroglia* 2022, 3, 1–22. <https://doi.org/10.3390/neuroglia3010001>

13- **Delarue Q**, Chalfouh C, Guérout N. Spinal cord injury: can we repair spinal cord non-invasively by using magnetic stimulation? *Neural Regen Res.* 2021 Dec;16(12):2429-2430. doi: 10.4103/1673-5374.313033. PMID: 33907030; PMCID: PMC8374589.

*contribution égale

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Planche anatomique représentant les segments vertébraux de la colonne vertébrale humaine en vue antérieure, latéral gauche et postérieur

Figure 2 : Représentation schématique de la croissance différentielle de la colonne vertébrale et de la moelle spinale

Figure 3 : Représentation schématique des segments médullaires comparés aux segments vertébraux

Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation cytoarchitecturale de la substance grise des segments cervicaux de la moelle spinale

Figure 5 : Représentation schématique des *laminae* de Rexed et des projections axonales correspondante

Figure 6 : Illustration des principaux territoires de la substance blanche parcourus par les faisceaux sensitifs et moteurs

Figure 7 : Représentation schématique de la voie cortico-spinale

Figure 8 : Représentation schématique des voies de la sensibilité mécanique et de la sensibilité thermique et nociceptive

Figure 9 : Représentation schématique de la formation des nerfs spinaux

Figure 10 : Illustration des différents dermatomes chez l'Homme adulte

Figure 11 : Représentation schématique des couches constituant les méninges

Figure 12 : Représentation du réseau artériel de la moelle spinale

Figure 13 : Représentation du réseau veineux de la moelle spinale

Figure 14 : Représentation schématique représentant la perfusion intramédullaire

Figure 15 : Représentation schématique du système péri-vasculaire et glymphatique au sein du parenchyme et des méninges

Figure 16 : Représentation schématique du réseau glymphatique et lymphatique cérébral

Figure 17 : Représentation schématique du système ventriculaire

Figure 18 : Représentation schématique de la communication LCS – sang via les tanocytes

Figure 19 : Schéma représentant le transport antérograde et rétrograde axonal

Figure 20 : Représentation des différents types de neurones en fonction de leur morphologie

Figure 21 : Représentation schématique d'un neurone myélinisé

Figure 22 : Représentation schématique des régions de la gaine de myéline

Figure 23 : Dessin représentant les astrocytes protoplasmiques et fibreux

Figure 24 : Schéma représentant les interactions au sein du syncytium glial

Figure 25 : Schéma représentant la formation de la barrière hémato spinale

Figure 26 : Représentation schématique de la synapse tripartite

Figure 27 : Photo prise par microscopie électronique du canal central

Figure 28 : Représentation des coupes réalisées pour la culture de neurosphères et l'identification des zones médullaire ayant une potentielle souche

Figure 29 : Chronologie de la colonisation de SNC par les cellules microgliales et les macrophages chez la souris

Figure 30 : Représentation schématique la communication entre les cellules microgliales et les neurones

Figure 31 : Structure tissulaire et organisation cellulaire du bulbe olfactif

Figure 32 : Représentation schématique de la glia limitans séparant la muqueuse du bulbe olfactif

Figure 33 : Représentation schématique de la répartition et du rôle présumé des cellules gliales olfactives dans le système olfactif primaire

Figure 34 : Représentation des circuits hippocampiques et des types de mémoires associées

Figure 35 : Schéma représentant la neurogenèse hippocampique

Figure 36 : Schéma représentant l'organisation cellulaire de la V-SVZ

Figure 37 : Illustration des étages médullaires et des conséquences cliniques de leurs atteintes

Figure 38 : Représentation schématique de la physiopathologie de la LMT lors des phases immédiates et aiguës

Figure 39 : Représentation schématique de la cicatrice médullaire

Figure 40 : Chronologie d'apparition des événements cellulaires et moléculaires se déroulant après la LMT

Figure 41 : Schéma représentant les différentes voies d'entrée des lymphocytes dans le parenchyme cérébral

Figure 42 : Page de "The Edwyn Smith surgical papyrus" décrivant les LMTs sous l'Égypte ancienne en 1700 avant notre ère

Figure 43 : Support à destination du clinicien permettant de tester les fonctions motrices et sensorielles du patient afin de déterminer le score AIS

Figure 44 : Schéma résumant les principales caractéristiques des biogels

Figure 45 : Schéma représentant l'installation du dispositif de stimulation électrique épidurale

Figure 46 : Schéma représentant l'application de la TMS dans le traitement des désordres neurologiques

Figure 47 : Schéma représentant les stades de différenciation des cellules souches

Figure 48 : Schéma représentant les types cellulaires utilisés dans la génération d'iPSC et les cellules différenciées obtenues à partir des iPSCs permettant la réalisation de transplantation cellulaire chez des patients souffrant d'une LMT

LISTE DES ABBREVIATIONS

AIR : récepteur à l'adénosine 1	Caspr : <i>contactin associated-protein like 1</i>
AAV : <i>adeno-associated virus</i>	CD : <i>cluster of différenciation</i>
ADAMTS-4 : <i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4</i>	EC : cortex entorhinal
ADO : adénosine	ECM : cortex entorhinal médian
AIS : <i>ASIA impairment scale</i>	CGO : cellule gliale olfactive
AKT : protéine kinase B	CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
Aldh1L1 : <i>aldéhydes déshydrogénase 1 family member 1</i>	CNP : <i>2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase</i>
AMPA s : <i>α-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate receptors</i>	CNTF : <i>ciliary neurotrophic factor</i>
ADN : acide désoxyribonucléique	CPG : <i>central pattern generators</i>
ANG : angiopoïétine	NGFR : <i>nerve growth factor receptor</i>
ANLS : <i>Astrocyte – Neuron Lactate Shuttle</i>	CREB : <i>C-AMP response element-binding protein</i>
AP : <i>adaptor complex</i>	CSE : cellule souche embryonnaire
ApoE : apolipoprotéine	CSF-cNs : <i>cerebrospinal fluid contacting neurons</i>
APR : <i>acute phase response</i>	CSPG : <i>chondroitin sulfate proteoglycan</i>
AQP : aquaporine	CSs : cellule de Schwann
AR : acide rétinoïque	CST : <i>corticospinal tract</i>
ARA : acide arachidonique	Cx : connexine
ASIA : <i>american spinal cord injury association</i>	CXCL : <i>C-X-C motif chemokine ligand</i>
ATP : adénosine tri-phosphate	CXCR : <i>C-X-C motif chemokine receptor</i>
BBB : <i>blood brain barrier</i>	DAPI2 : <i>DNAX-Activation Protein 12</i>
bCGOs : cellules gliales olfactives du bulbe olfactif	DCX : doublecortine
BCIs : <i>brain-computer interface</i>	DG : gyrus denté
BDNF : <i>brain derived neurotrophic factor</i>	DRG : <i>dorsal root ganglion</i>
BMP : <i>bone morphogenetic proteins</i>	EAAT : <i>excitatory amino acid transporter</i>
BO : bulbe olfactif	EET : <i>epoxyeicosatrienoic acid</i>
C1q : <i>complement component 1, subcomponent Q</i>	EGF : <i>epidermal growth factor</i>
C3 : <i>complement component 3</i>	EEG : électro-encéphalogramme
CA : corne d'Ammon	EPL : couche plexiforme externe
	ERK : <i>extracellular signal-regulated kinases</i>
	ES : <i>electrical stimulation</i>

ET : cellule touffue extérieure

FGF : *fibroblast growth factor*

GABAA : *γ-aminobutyric acid type A*

GAP43 : *growth associated protein 43*

GCL : couche de cellules granulaires

GDNF : *glia-derived neurotrophic factor*

GFAP : *glial fibrillary acidic protein*

GL : couche glomérulaire

GLAST : *glial high-affinity glutamate transporter*

GLT-1 : transporteur de glutamate de type 1

GLUT : transporteur de glucose

GlyP : glycogène phosphorylase

GlyS : glycogène synthase

Gpc : *heparan sulfate proteoglycans glypican*

Hes : *hairless and enhancer-of-split*

HGF : *hepatocyte growth factor*

HRP : *horseradish peroxidase*

ICAM : *intercellular adhesion molecules*

IFN-γ : interféron gamma

IGF-1 : *insulin-like growth factor-1*

IL : interleukine

IPL : *couche plexiforme interne*

IRM : imageries à résonance magnétique

ITAM : *immuno-tyrosine activation motif*

JAM : *junctional adhesion molecule*

JGC : cellule juxtaglomérulaire

KARs : *kainate receptors*

Kir : *inwardly rectifying potassium*

KO : *knock out*

Lac : lactate

LAM : *leukocyte adhesion molecules*

LB : lymphocyte B

LCS : liquide cérébrospinal

LIS : liquide interstitiel

LMT : lésion médullaire traumatique

LOT : tractus olfactif latéral

LTD : *long term depression*

LT : lymphocyte T

LTP : *long term potentiation*

MAG : *myelin associated glycoprotein*

MAGK : *membrane associated guanylate kinase*

MBP : *myelin basic protein*

MCL : couche de cellules mitrales

MCT1 : *monocarboxylate transporter 1*

MEC : matrice extracellulaire

megf10 : *multiple epidermal growth factor-like domains protein 10*

Mertk : *myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase*

MFG-E8 : *milk-fat globule E8*

mGluRs : *metabotropic glutamate receptors*

Mi-MΦ : microglie-macrophage

MIF : *macrophage migration inhibitory factor*

MMP : *matrix metalloproteinase*

mCGO : cellule gliale olfactive de la muqueuse olfactive

MOG : *myelin oligodendrocyte glycoprotein*

MPD : methylprednisolone

MPPs : *membrane palmitoylated protein*

MSC : mesenchymal stem cells

NASCIS : *National Acute Spinal Cord Injury Study*

NG2 : *neural/glial antigen 2*

NGF : *nerve growth factor*

NMDARs ; *N-methyl-D-aspartate receptors*

NO : *nitric oxide*

NOP : neurone olfactif primaire

NOS : *nitric oxide synthase*

NSC : *nervous stem cells*
NT : neurotransmetteur
NT-3 : neurotrophine 3
ONF : fibroblaste nerveux olfactif
ONL : couche nerveuse olfactive
ON : nerf olfactif
OPC : *oligodendrocyte progenitor cells*
OR : récepteur olfactif
PA : potentiel d'action
PDGF : *platelet-derived growth factor*
PG : prostaglandine
PGC : cellules périglomérulaire
PKB : protéine kinase B
PLA2 : phospholipase A2
PLP : *myelin proteolipid protein*
PM : potentiel membranaire
PCP : polarité cellulaire planaire
PSA-NCAM : *polysialylated-neural cell adhesion molecule*
PTDSR : *phosphatidylserine receptor*
RIM : *rab3-interacting molecules*
RMS : *rostral migratory stream*
RT-qPCR : *real-time quantitative polymerase chain reaction*
SAS : *subarachnoid space*
SDF-1 : *stromal cell-derived factor 1*
SEZ : *subependymal zone*
SGZ : *subgranular zone*
Shh : *sonic hedgehog*
SIRP α : *signal-regulatory protein alpha*
SM : stimulation magnétique
SNC : système nerveux central
sSA : cellules superficielles à court axone
TES : *transcutaneous electrical stimulation*
TGF- β : *transforming growth factor β*
TIMP : *tissue inhibitor of metalloproteinases*
TLR : *tool like receptor*
TMS : *transcranial magnetic stimulation*
TNF : *tumor necrosis factor*
TREM2 : *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*
TrkB : *tropomyosin receptor kinase B*
TSP : thrombospondines
vAChTs : *vesicular acetylcholine transportors*
VEGF : *vascular endothelial growth factor*
vGATs : *vesicular GABA transportors*
vGluTs : *vesicular glutamate transportors*
VIP : *vasactive intestinal peptide*
vMATs : *vesicular monoamine transportors*
vNUTs : *vesicular nucleotide transportors*
VPL : ventro-postérieur-latéral
V-SVZ : *ventricular – subventricular zone*
ZO-1 : *zonula occludens-1*

AVANT-PROPOS

La moelle spinale est un tissu essentiel du système nerveux central (SNC). Elle est le relai de la communication entre le cerveau et les organes périphériques. Bien qu'elle soit protégée par la colonne vertébrale, une atteinte physique résultant d'un accident de voiture, d'une chute domestique ou encore de violences physiques, peut l'endommager et occasionner des dégâts graves souvent incurables. La lésion médullaire traumatique (LMT) désigne les atteintes physiques de la moelle spinale engendrant un étirement, une compression ou encore une destruction du tissu médullaire et des axones le parcourant. Elle provoque la perturbation des voies sensitives ascendantes et des voies motrices descendantes entraînant une perte de fonctions des membres inférieurs et/ou supérieurs ainsi que des organes liés à un dysfonctionnement du système autonome. Les pertes fonctionnelles sont déterminées par le niveau médullaire atteint et la gravité de la lésion. Une atteinte des segments cervicaux provoquant une lésion complète, entraîne des complications dévastatrices pour le patient, bien souvent associées à une plus faible espérance de vie. Selon l'OMS, on compte 250 000 à 500 000 nouveaux cas par an de LMTs dans le monde. Elle touche particulièrement les jeunes adultes entre 16 et 29 ans ainsi que les personnes de plus de 60 ans. La physiopathologie de la LMT est divisée en deux phases, la phase primaire provoquée par l'atteinte physique engendrant des pertes neurologiques immédiates, et la phase secondaire caractérisée par la mise en place des mécanismes physiopathologiques provoquant une exacerbation des dégâts tissulaires. Récemment, il a été découvert que les conséquences de la LMT ne résultaient pas seulement d'une perte fonctionnelle liée à la rupture des axones. En effet, la propagation de molécules de communication cellulaire depuis la moelle spinale et le dysfonctionnement du système immunitaire, provoquent des perturbations dans l'ensemble de l'organisme. Le cerveau, en communication avec la moelle spinale par le sang, le liquide céphalorachidien (LCR) et les réseaux axonaux, est particulièrement touché. La LMT provoque des déficits cognitifs et des états anxieux et dépressifs indépendants de la prise en compte psychologique du traumatisme par le patient. L'amélioration des techniques médicales et des connaissances de la pathologie a permis d'améliorer la prise en charge des patients augmentant ainsi leur espérance et leur confort de vie. Cependant il n'existe pas, à l'heure actuelle, de thérapie permettant de soigner cette pathologie et ou bien d'entraîner une récupération complète des fonctions sensori-motrices.

La régénération de la moelle spinale après une lésion, fait intervenir un grand nombre d'acteurs cellulaires et moléculaires dont les actions complexes ne sont pas toutes encore connues. Du fait de l'aspect multifactoriel de la réponse physiopathologique qui suit une lésion médullaire, une variété de traitements s'intéressant à des approches différentes sont à l'étude. Parmi ces approches, on distingue notamment la transplantation cellulaire. Bien souvent, la réalisation d'études chez l'Homme à partir de thérapies cellulaires ayant montré des effets encourageants chez l'animal, se soldent par une déception quant à leurs effets thérapeutiques cliniques. De nombreuses raisons comme les différences génétiques ou encore la physiologie entre les modèles animaux et l'Homme, expliquent les discordances observées. La prise en compte récente de la propagation du traumatisme à l'ensemble de l'organisme et le fait que dans les études chez l'animal il est rare que les transplantations soient autologues alors que c'est le cas dans les études cliniques, soulèvent une question. Est-ce que la transplantation de cellules prélevées sur un patient souffrant d'une lésion médullaire, diminue la qualité thérapeutique des cellules du fait de la réactivité générale de l'organisme ?

L'objectif principal des travaux présentés dans ce manuscrit de thèse était de répondre à cette question.

La première partie de ce manuscrit est divisée en trois chapitres. Le premier présente des rappels bibliographiques sur la physiologie de la moelle épinière. Tout d'abord, nous reviendrons sur l'anatomie générale de la moelle spinale, sur les cellules qui la composent et leurs fonctions dans le SNC. Ces rappels sur la moelle spinale seront complétés par une description identique des bulbes olfactifs (BO) et de l'hippocampe. Le second chapitre décrira la LMT chez l'Homme, appuyé par des données obtenues chez des modèles animaux. Nous nous intéresserons à la physiopathologie de la LMT en décrivant les mécanismes et les réponses cellulaires mis en place. Nous le conclurons en abordant les conséquences périphériques et cérébrales induites par la lésion médullaire. Enfin, nous terminerons cette partie par un troisième chapitre consacré à la prise en charge médicale actuelle et les thérapies à l'étude en citant des exemples de différentes stratégies thérapeutiques. Nous décrirons plus précisément les transplantations cellulaires et particulièrement la transplantation de cellules gliales olfactives (CGO).

Dans la seconde partie de ce manuscrit, nous exposerons les différents résultats obtenus au cours de cette thèse, divisés en trois sections. Dans la première section s'intéressant aux conséquences de la LMT sur le potentiel thérapeutique lors de la réalisation d'autogreffes, les résultats seront présentés sous la forme d'un article scientifique au format « pré-soumission ».

Dans la deuxième section, décrivant l'intérêt thérapeutique de la stimulation magnétique répétitive trans-spinale (rTSMS), un article scientifique détaillant les effets de la rTSMS dans un modèle de LMT chez le rat sera tout d'abord présenté. Il sera appuyé par une perspective présente en annexe, discutant des résultats obtenus dans un modèle de LMT chez la souris et complétée par une description de ces futures applications. La troisième section présentera sous forme d'un article scientifique les résultats obtenus en comparant les effets thérapeutiques de la transplantation de CGO et de la rTSMS. Pour terminer la troisième partie consistera en une discussion générale des trois sections. Nous reviendrons sur les résultats de chacune des études et nous appuyant sur des données bibliographiques, nous essayerons d'expliquer les différents phénomènes observés. Nous terminerons la discussion par une mise en perspective de ces nouvelles connaissances et de leur intérêt dans la prise en charge thérapeutique des LMTs. Enfin ce manuscrit se terminera par une conclusion générale.

INTRODUCTION

Chapitre I : Le système nerveux central

Le système nerveux central (SNC) se divise en deux structures : l'encéphale localisé dans la boîte crânienne et la moelle spinale confinée au sein du canal vertébral de la colonne vertébrale. La moelle spinale débute à la base du tronc cérébral et se termine au niveau des lombaires. Ces deux structures sont en communication directe via les neurones et leurs axones mais aussi grâce au réseau vasculaire, lymphatique et au liquide cébrospinal (LCS). La considération et la compréhension de la communication entre l'encéphale et la moelle spinale, est essentielle afin de pouvoir développer des thérapies efficaces pour les pathologies du SNC.

1. La moelle spinale

1.1. Anatomie et fonction

La moelle spinale est un tissu fragile essentiel à la communication bidirectionnelle entre l'encéphale et les organes périphériques. C'est pour cela qu'elle se situe au centre de la colonne vertébrale, qui la protège des chocs et des contraintes mécaniques. La colonne vertébrale est une structure osseuse constituée d'une succession de 33 vertèbres divisées en segments vertébraux : les vertèbres cervicales (C1-C7), thoraciques (T1-T12), lombaires (L1-L5), sacrales (S1-S5) et coccygiennes (1-4) (**Figure 1**) (Absinta *et al.*, 2017). L'ensemble de ces vertèbres est attaché et articulé par des systèmes interdépendants composés de disques intervertébraux, de joints articulés et de ligaments contrôlés par l'activation musculaire (Miele *et al.*, 2012). Cette configuration ostéoligamenteuse induit une stabilité et une mobilité permettant des mouvements de flexion et de rotation du tronc.

La croissance différentielle lors du développement embryonnaire entre la colonne vertébrale et la moelle spinale induit un décalage entre les étages vertébraux et médullaires (**Figure 2**). On compte seulement 31 segments médullaires, 8 cervicales, 12 thoraciques, 5 lombaires et 1 coccygien. Le décalage commence au niveau du segment médullaire C8. A ce niveau, les nerfs spinaux sortent du canal vertébral par un orifice nommé foramen intervertébral, entre les segments C7 et T1. Il va s'accroître progressivement tout le long de la moelle spinale, on observe le décalage le plus important au niveau du cône médullaire. Le segment médullaire L5 se retrouve au niveau des vertèbres T12-L1 alors que les nerfs spinaux provenant de ce segment sortent par le foramen intervertébral des segments L5 et S1 (**Figure 3**) (Langman & Sadler, 2008).

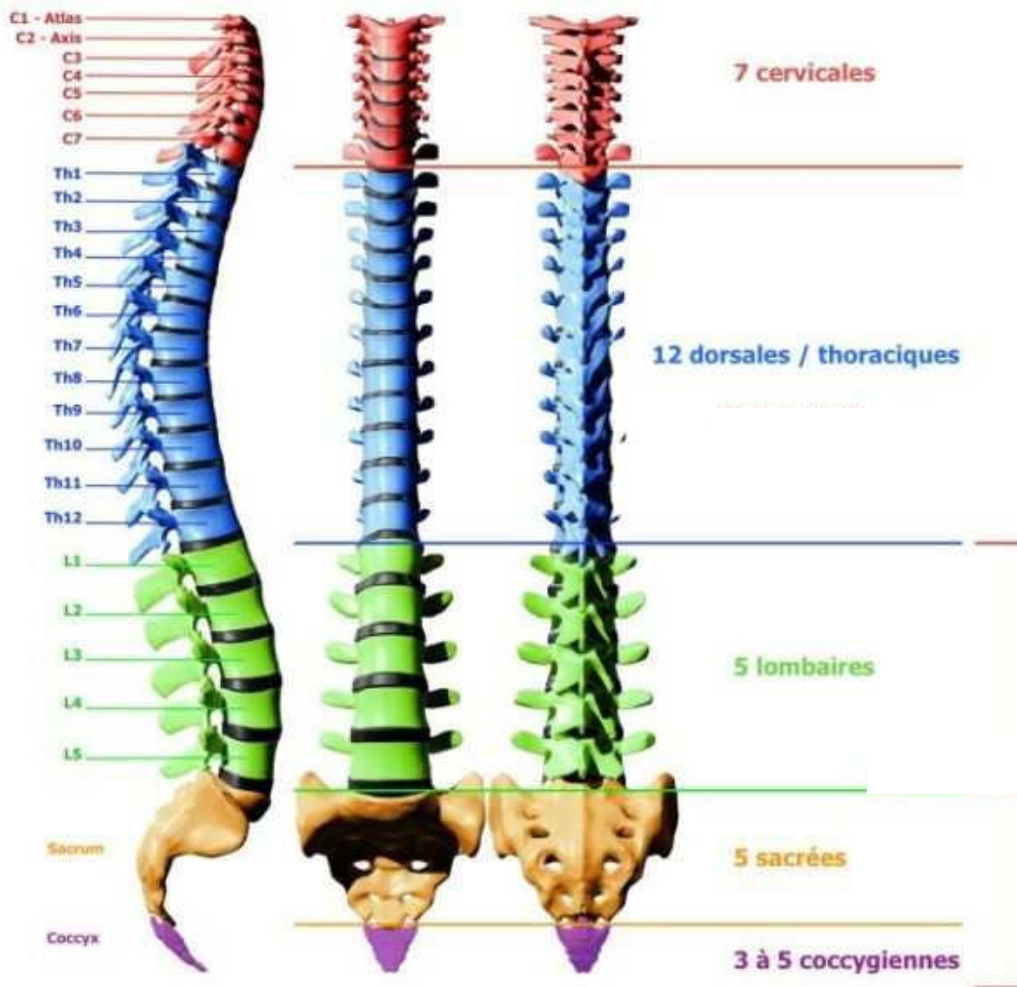


Figure 1 : Planche anatomique représentant les segments vertébraux de la colonne vertébrale humaine en vue antérieure, latérale gauche et postérieure. Vertèbres cervicales (C1-C7), thoraciques (T1-T12), lombaires (L1-L5), sacrales (S1-S5) et vertèbres coccygiennes (1-4) (Yabka, 2019, modifié).

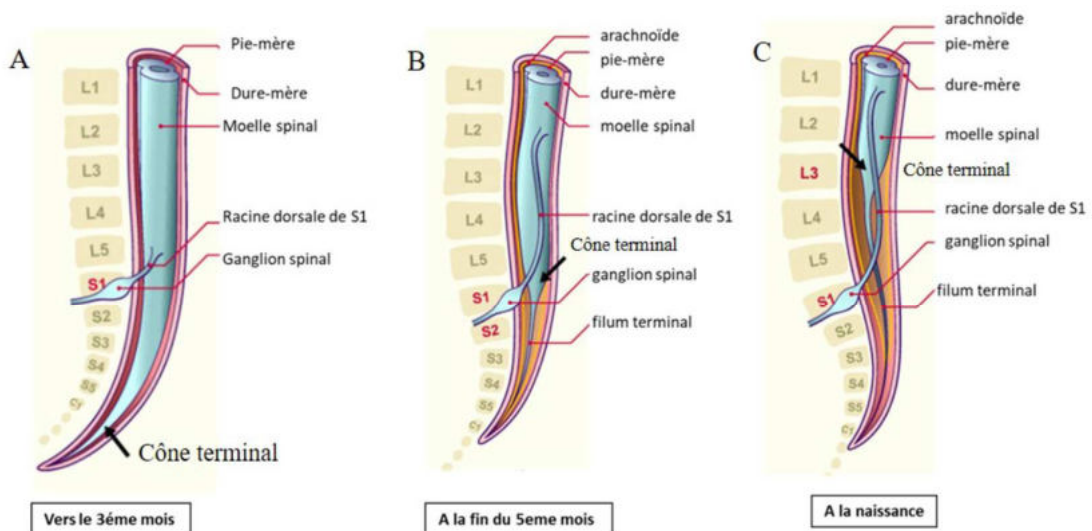


Figure 2 : Représentation schématique de la croissance différentielle de la colonne vertébrale et de la moelle spinale. Au 3^{ème} mois de l'embryogenèse la moelle spinale et la colonne vertébrale font la même taille et les segments vertébraux sont alignés aux segments médullaires (A). Le décalage est observable à partir du 5^{ème} mois induit par une croissance plus rapide de la colonne vertébrale et de la dure-mère (B). A la naissance, le cône terminal et le segment médullaire S1 sont alignés avec le segment vertébral L3 (C) (Langman, 2008).

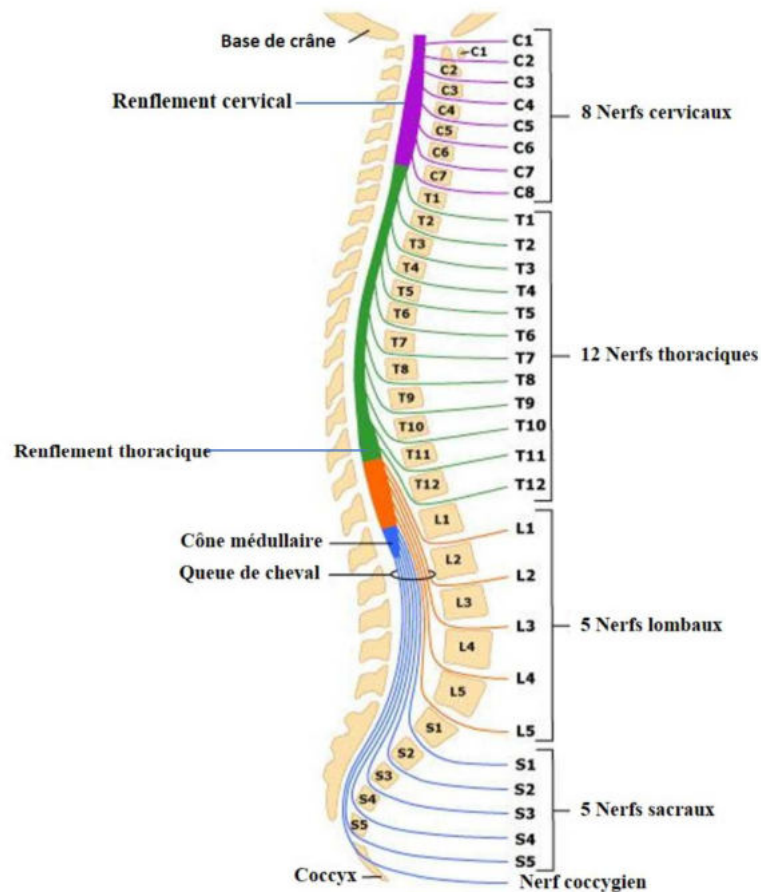


Figure 3 : Représentation schématique des segments médullaires comparés aux segments vertébraux. Il existe 31 segments médullaires, 8 cervicaux, 12 thoraciques, 5 lombaires, 5 sacrés et 1 coccygien. La moelle spinale est située entre les segments vertébraux C1 et L1. Le décalage entre segments médullaires et vertébraux débute au niveau C8 et s'accroît jusqu'au cône médullaire (Cochard, 2015).

1.2. Structure tissulaire

La structure tissulaire de la moelle spinale peut être divisée en cinq parties distinctes : la substance grise, la substance blanche, les méninges, le canal central et le réseau vasculaire/lymphatique. Chacune de ces parties a une fonctionnalité et une organisation cellulaire précise.

1.2.1. Substance grise

La substance grise est composée essentiellement par le corps cellulaire des neurones et des cellules gliales maintenant les arbres dendritiques de ces neurones. Elle est constituée de deux hémisphères symétriques, reliés par une commissure de substance grise dans laquelle passe le canal épendymaire. Chacun de ces hémisphères est composé de deux expansions. Au niveau ventral, celle-ci est appelée corne antérieure alors qu'au niveau dorsal elle est appelée

corne postérieure. Ces deux cornes sont séparées au centre par la substance grise intermédiaire (Cho, 2015).

Lors d'une coupe transversale on peut facilement identifier cette structuration de la substance grise grâce à son organisation en « papillon » ou en « H ». Cette description macroscopique peut être complétée par une description microscopique des neurones en territoire ou *lamina*. En 1952, Rexed est le premier à décrire cette organisation liée à la cytoarchitecture des neurones chez le chat (Rexed, 1954). On distingue 10 *laminae*, la première est située au niveau de l'apex de la corne postérieure puis les *laminae* se succèdent jusqu'à la 9^{ème} au niveau de l'apex de la corne antérieure. La 10^{ème} correspond à la zone entourant le canal central (**Figure 4**) (Diaz & Morales, 2016).

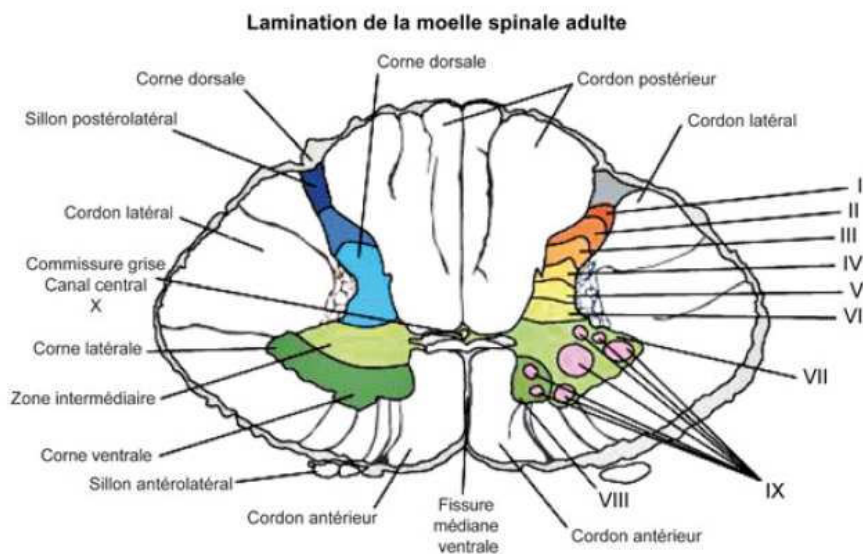


Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation cytoarchitecturale de la substance grise des segments cervicaux de la moelle spinale. Dans la représentation de Redex, la substance grise est divisée en 10 *laminae*. Les *laminae* I à VI sont situées dans les cornes dorsales. Les *laminae* VII à IX sont situées dans les cornes ventrales. Enfin la *lamina* X représente la zone entourant le canal central (Britannica encyclopedia, 2007).

L'enchaînement des *laminae* est quasiment similaire tout le long de la moelle spinale, mais la prédominance de chacun de ces territoires va varier en fonction du segment médullaire et de la densité des projections axonales périphériques. Chaque *lamina* est composée du corps cellulaire de neurones de projections, d'interneurones excitateurs ou d'interneurones inhibiteurs, permettant de faire le relai entre les nerfs périphériques et l'encéphale. Les *laminae* I à VI sont situées dans la corne postérieure. Les *laminae* I et II sont le relai des processus douloureux et de la température. Les *laminae* III et IV transmettent les informations relatives au toucher telles que la vibration et à la pression. Les afférences sensorielles provenant de la peau, des muscles et des viscères sont relayées par la *lamina* V. Quant à la *lamina* VI, elle est

impliquée dans les réflexes de flexion et de retrait liés aux stimuli douloureux (Cramer & Darby, 2003). La *lamina* VII située dans la zone intermédiaire, relaie les informations proprioceptives et est aussi composée d'interneurones se projetant sur les autres *laminae* permettant les mouvements réflexes et automatiques. Enfin les *laminae* VIII et IX, situées dans la corne antérieure, ont un rôle dans le relai des informations motrices. La *lamina* VIII est composée d'interneurones et de neurones proprioceptifs impliqués dans la fonction locomotrice et est en contact avec la *lamina* IX composée majoritairement de motoneurones (**Figure 5**) (Mai & George, 2011; Diaz & Morales, 2016). Cependant les fonctions des *laminae* ne sont pas figées et de nombreuses connexions existent entre elles via des interneurones permettant l'ajustement de mouvements complexes ou bien la formation d'arcs réflex.

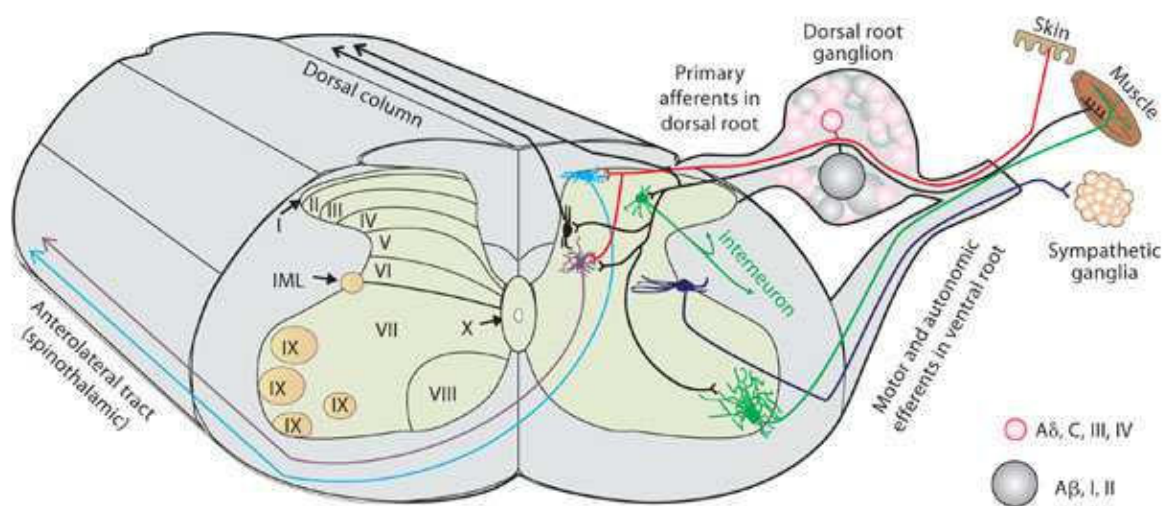


Figure 5 : Représentation schématique des *laminae* de Rexed et des projections axonales correspondantes. Les cornes postérieures sont constituées des *laminae* I à VI. Elles reçoivent les informations sensorielles véhiculées par les neurones des ganglions de la racine dorsale, *dorsal root ganglion* (DRG). La *lamina* VII se situe dans la substance grise intermédiaire et est composée d'interneurones se projetant sur les autres *laminae*. Les cornes antérieures sont impliquées dans le relai d'informations motrices via les motoneurones, elles sont constituées des *laminae* VIII et IX (Andrew J Thorpe, 2011).

1.2.2. Substance blanche

A l'opposé de la substance grise, on ne retrouve pas de soma de neurone dans la substance blanche. On retrouve dans cette substance, les axones des neurones situés dans la substance grise et les axones de premier ordre ne faisant pas synapse dans la moelle et allant directement se projeter sur les structures cérébrales. Les axones sont regroupés en faisceaux de fonction commune et occupent des territoires précis de la substance blanche (**Figure 6**).

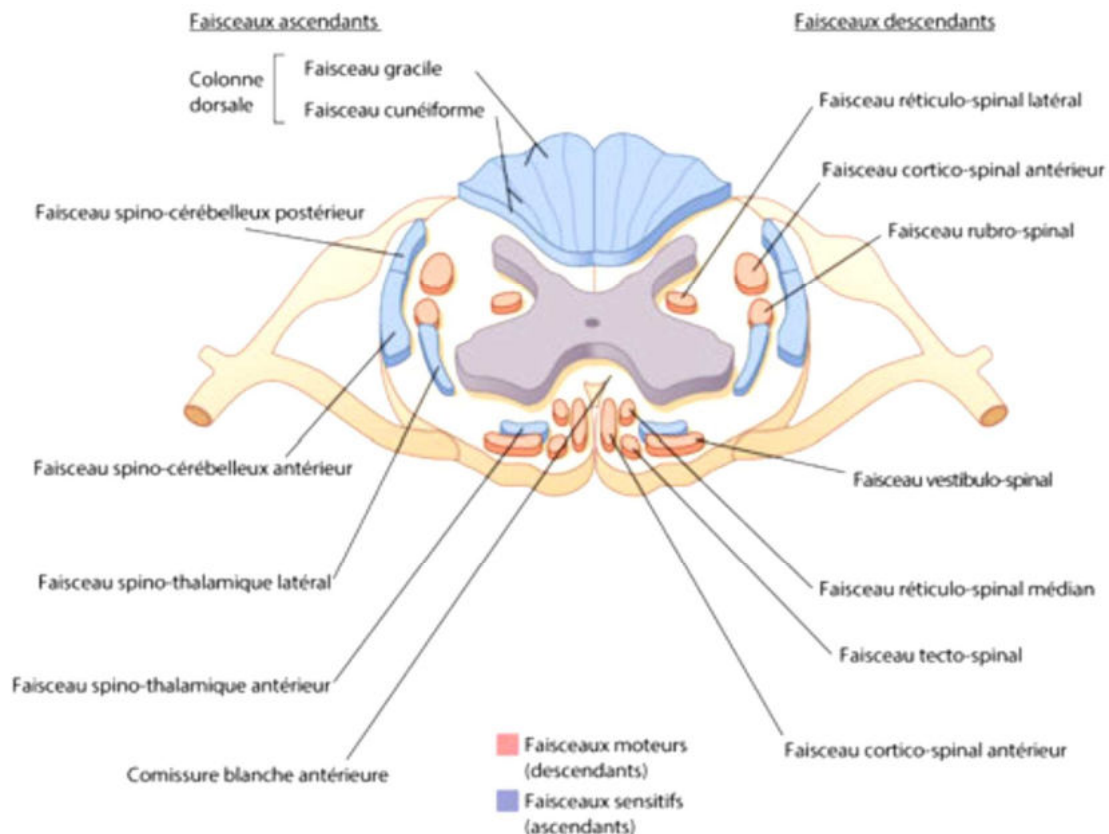


Figure 6 : Illustration des principaux territoires de la substance blanche parcourus par les faisceaux sensitifs et moteurs. Chaque tractus a une position précise dans la substance blanche. Les faisceaux sensitifs (ascendants) sont particulièrement présents dans la substance blanche postérieure alors que les faisceaux moteurs (descendants) sont essentiellement situés dans la substance blanche ventrale. Les zones latérales de la substance blanche contiennent à la fois des faisceaux sensitifs et moteurs (Sheerin, 2004).

On définit généralement deux systèmes, le système nerveux somatique et le système nerveux végétatif.

a. Système nerveux somatique

Dans le système nerveux somatique, on distingue différents tractus définis par le regroupement d'axones en faisceaux relayant des informations de même nature. Ces tractus sont divisés en deux systèmes, le système descendant et ascendant.

Le système descendant :

Le système descendant regroupe les tractus contrôlant la motricité. Ce système est composé de deux sous-systèmes.

Le système moteur pyramidal comprend le tractus cortico spinal (CST) contrôlant les mouvements volontaires. Il est composé de neurones localisés dans les cortex prémoteur et moteur primaire, se projetant sur les motoneurones des cornes antérieures via les *laminae* VIII

et IX dans la moelle spinale. Les faisceaux d'axones composant ce tractus, pour 90% d'entre eux, décussent entre le bulbe rachidien et la moelle spinale au niveau des pyramides situées à la base du tronc cérébral (**Figure 7**) (Armand, 1982).

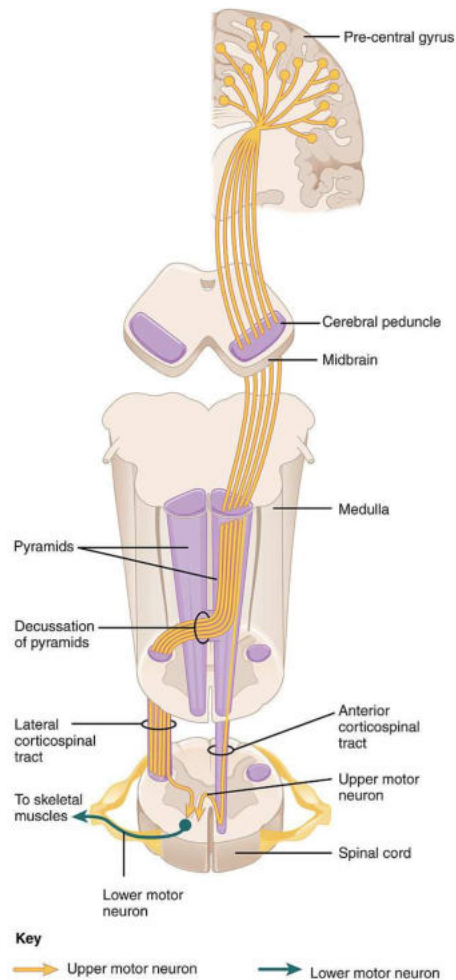


Figure 7 : Représentation schématique de la voie cortico-spinale. Les axones provenant du cortex moteur traverse le pont par les pédoncules cérébelleux, puis, 90% d'entre eux franchissent la ligne médiane et décussent au niveau des pyramides du tronc cérébral avant de parcourir la moelle spinale jusqu'à leur motoneurone cible (Crossman, 2015).

En opposition avec le système moteur pyramidal, il existe le système extrapyramidal. Ce système composé d'un ensemble fonctionnel de tractus, est impliqué dans les commandes motrices involontaires. Il regroupe les faisceaux rubro-spinaux, vestibulo-spinaux, reticulo-spinaux, tecto-spinaux et olivo-spinaux. Nous n'allons pas rentrer dans le détail de la fonction de chacun de ces faisceaux, cependant on peut résumer leurs rôles par le contrôle de la posture, la coordination des membres, les réflexes gravitaires et l'équilibre. Ce système, par le biais d'interneurones, permet un ensemble de rétrocontrôles du CST sur différents segments

médullaires. Les boucles de rétrocontrôle sont nécessaires à une motricité précise et coordonnée (de Oliveira-Souza, 2012).

Le système ascendant :

Les faisceaux composant le système ascendant sont les relais des messages sensoriels provenant de la périphérie. Cinq tractus composent ce système, le système lemniscal permettant la sensibilité tactile, le système extralemniscal ou antérolatéral impliqué dans le relai des messages douloureux, les tractus spinocérébelleux et proprio-spinal spécialisés dans l'acheminement des informations de la proprioception et le tractus de Lissauer.

La voie lemniscale est chargée de relayer les informations précises de toucher, de vibration et de pression. Le relai des informations est permis par les neurones sensoriels de premier ordre dont le soma est situé dans le DRG et qui se projettent directement sur le bulbe rachidien. Les axones une fois dans la moelle sont divisés en deux faisceaux, le faisceau gracile et cunéiforme relayant respectivement les informations du bas et du haut du corps. Au niveau du tronc cérébral, les axones des deux voies réalisent des synapses avec les neurones du noyau gracile et cunéiforme. A la sortie de ces noyaux, les axones des neurones de second ordre, forment les fibres arquées internes et décussent en franchissant la ligne médiane. Elles forment alors un gros faisceau appelé lemnisque médian qui se projette sur le noyau ventro-postérieur-latéral (VPL) du thalamus puis par un neurone de troisième ordre, sur le cortex somesthésique primaire (**Figure 8A**) (Purves *et al.*, 2015).

La voie extralemniscale, à la différence de la voie lemniscale, n'est pas directe. Les neurones sensoriels de premier ordre se projettent sur les noyaux des *laminae* des cornes postérieures. Ils réalisent des synapses avec des neurones de second ordre qui décussent puis remontent la moelle spinale jusqu'au noyau VPL du thalamus avant d'atteindre le cortex somesthésique primaire. Cette voie permet le relai des sensations douloureuses et non douloureuses de température ainsi que des sensations douloureuses tactiles et de pression. Une partie des axones se projettent sur des interneurons de la substance grise intermédiaire permettant la communication avec les motoneurons des cornes antérieures. Cette communication est impliquée dans les phénomènes de reflexe d'extension croisée (**Figure 8B**) (Purves *et al.*, 2015).

Le tractus spinocérébelleux relaie les informations inconscientes de proprioception provenant des muscles et des tendons jusqu'au cervelet. Les neurones de premier ordre réalisent des synapses avec des neurones de second ordre situés dans les *laminae* (V – VII). On peut

subdiviser cette voie en 3 sous parties, le tractus spinocérébelleux antérieur relayant les informations proprioceptives des structures musculosquelettiques innervées par les segments médullaires allant de L2 à l'extrémité caudale de la moelle spinale.

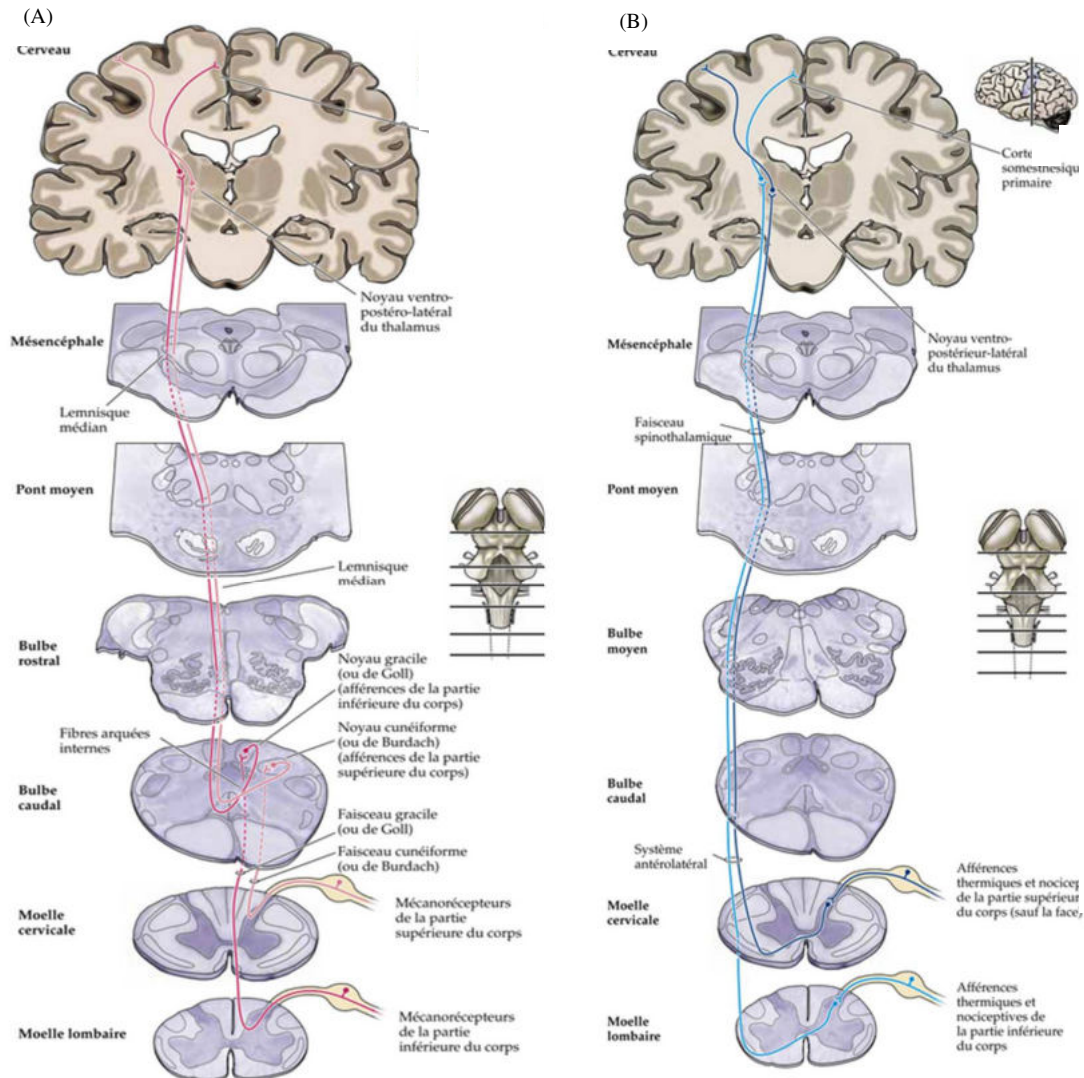


Figure 8 : Représentation schématique des voies de la sensibilité mécanique et de la sensibilité thermique et nociceptive. Voie lemniscale relayant les informations somesthésiques non nociceptives (A). Voie extralemniscale ou antérolatérale relayant les informations somesthésiques thermiques et nociceptives (B) (Purves, 2015).

Le tractus spinocérébelleux postérieur est impliqué dans la transmission des informations proprioceptives provenant des membres inférieurs et du tronc, innervé par les segments médullaires entre T1 et L2. Et enfin le tractus cunéo-cérébelleux spécialisé dans la proprioception des extrémités supérieures. Il relai les informations provenant des structures musculosquelettiques innervées par les segments médullaires allant de T1 à l'extrémité rostrale.

L'analyse de la proprioception est complétée par le tractus proprio-spinal. Les axones des neurones de premier ordre se projettent sur le noyau propre situé dans les *laminae* III et IV. Les axones provenant du noyau propre quittent la substance grise par des systèmes montants et descendants puis réalisent des connexions avec différents types de neurones dans un grand nombre de segments médullaires. Ce tractus permet d'interconnecter les neurones médullaires entre eux et de coordonner ipsilatéralement et controlatéralement les fonctions sensorielles et motrices entres-elles, et entre les différents étages médullaires.

Le tractus de Lissauer est un tractus collatéral situé à l'extrémité des cornes postérieures. Il transmet les informations douloureuses et de température aux segments médullaires voisins sur quelques niveaux grâce à des projections ascendantes et descendantes.

b. Système nerveux végétatif

Le système nerveux végétatif est divisé en deux sous-systèmes antagonistes, les systèmes orthosympathique et parasympathique. Les deux composantes de ce système se projettent sur les mêmes cibles et permettent le contrôle des organes et de l'homéostasie de l'organisme. Ils transmettent les informations depuis l'hypothalamus et certains noyaux du tronc cérébral jusqu'à des ganglions périphériques. Pour le système orthosympathique, ceux-ci sont situés à proximité de la moelle spinale et sont disposés en chaîne alors que pour le système parasympathique, ils sont souvent très proches de l'organe cible. Par conséquent, pour ce dernier, les seconds neurones relayant l'information du ganglion parasympathique jusqu'à l'organe sont de petite taille. Les projections périphériques du système orthosympathique se font au niveau des segments médullaires thoraciques et sur les premiers segments lombaires. Alors que pour le système parasympathique, ceux-ci sont situés au niveau du tronc cérébral et des segments vertébraux sacrés. L'action sur les cibles périphériques est médiée par l'acétylcholine pour le système parasympathique et par la noradrénaline pour le système orthosympathique.

1.2.3. Canal central

Au centre de la moelle spinale se situe le canal central aussi appelé canal épendymaire. Cette ouverture parcourant la moelle sur toute sa longueur permet la circulation du LCS entre le cône médullaire au niveau des segments lombaires jusqu'à l'angle caudal du quatrième ventricule. Il fait partie du système ventriculaire comprenant les ventricules cérébraux, l'aqueduc de Sylvius et le quatrième ventricule (Korzh, 2018). Grâce à des techniques

d'imageries à résonance magnétique (IRM) et des analyses histologiques post-mortem, il est admis que chez l'humain, celui-ci se sténose au fur et à mesure de la vie.

Les analyses histologiques montrent une réorganisation de la *lamina X* se traduisant par une désorganisation de l'épithélium épendymaire, la formation de rosettes épendymaires ou de microcanaux, la prolifération de bourgeons gliovasculaires sous-épendymaires et une gliose intracaniculaire (Yasui *et al.*, 1999). Cette observation est une particularité humaine, on retrouve ce phénomène de sténose chez quelques mammifères comme la baleine, le dauphin (Bombardi *et al.*, 2013) ou encore le rat-taube nu (Torrillas de la Cal *et al.*, 2021). Cependant cette considération est débattue du fait de nouvelles études utilisant des techniques d'imagerie plus sensibles montrant son existence et mettant en avant un dynamisme dans son ouverture tout au long de la vie. Ce canal est tapissé d'un revêtement de cellules épithéliales de forme cuboïde ou cylindrique appelées cellules épendymaires. La circulation du LCS dans le canal est permise par les cellules épendymaires qui grâce à leurs cils mobiles, induisent un flux continu et régulier permettant le déplacement du LCS en suivant l'axe caudo-rostral (Siyahhan *et al.*, 2014). Récemment, le canal central a été décrit comme étant une niche de cellules souches neurales, *neural stem cells* (NSC) jouant un rôle important lors des lésions médullaires (Li *et al.*, 2016; Li, Floriddia, *et al.*, 2018; Chevreau *et al.*, 2021). Nous détaillerons le rôle des NSC lors des lésions médullaires par la suite.

1.2.4. Nerfs spinaux

Les axones quittent la moelle spinale au travers des nerfs spinaux. Chez l'Homme il existe 31 nerfs spinaux contre 34 chez la souris (8 cervicaux, 13 thoraciques, 6 lombaires, 4 sacrés et 3 coccygiens) (Watson & Kayalioglu, 2009). Excepté le premier segment cervical qui ne possède qu'une racine ventrale, chaque segment médullaire possède à la fois une racine ventrale relayant les informations motrices vers la périphérie, et dorsale par laquelle transitent les informations sensibles. Ces racines sont formées par la fusion des radicelles des racines ventrales et dorsales. Les racines vont à leur tour fusionner de part et d'autre de la moelle spinale au niveau du foramen intervertébral afin de donner naissance aux nerfs spinaux (**Figure 9**) (Bican *et al.*, 2013).

Juste avant la fusion des deux racines, la racine dorsale présente un élargissement appelé ganglion spinal. On retrouve dans ce ganglion le soma de différents types de neurones sensoriels pseudo-unipolaires (proprioceptifs, nociceptifs et mécanoceptifs) (**Figure 9**). Les afférences transitant par ces neurones, proviennent de territoires cutanés précis répartis en bandes

parallèles appelés dermatomes. Chaque dermatome est innervé par un segment médullaire précis. Cela permet par ailleurs de définir le niveau spinal d'atteinte sensitive lors d'une lésion médullaire (**Figure 10**).

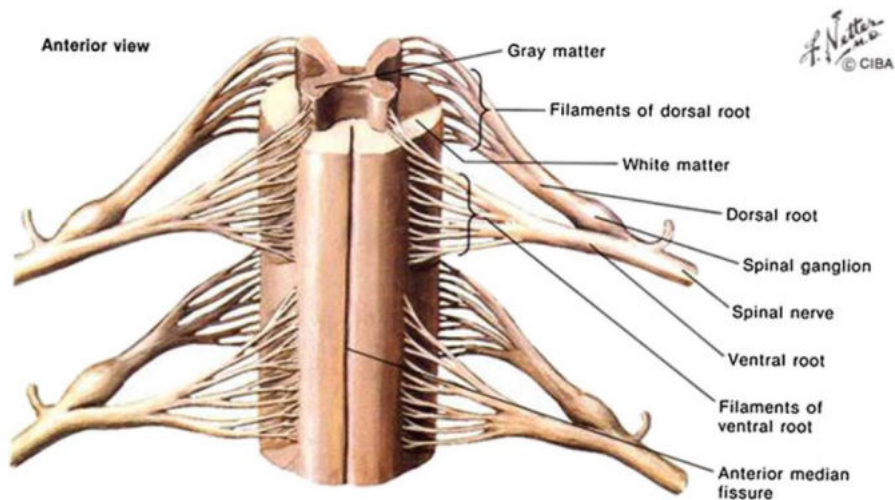


Figure 9 : Représentation schématique de la formation des nerfs spinaux. Les faisceaux axonaux se regroupent afin de former des filaments donnant naissance aux racines ventrales et dorsales de chaque côté de la moelle spinale. Les racines ventrales et dorsales se rejoignent et fusionnent, formant alors le nerf spinal (Netter, 2006).

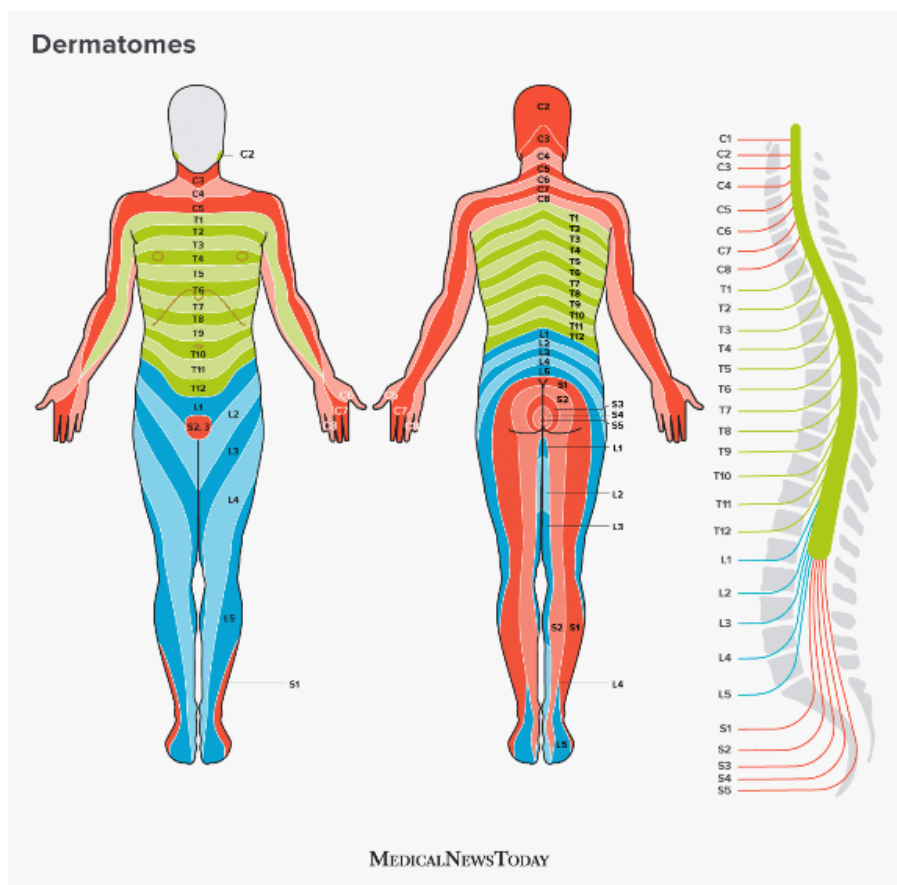


Figure 10 : Illustration des différents dermatomes chez l'Homme adulte. Les couleurs représentent les zones du corps innervées par les nerfs sensitifs en fonction du segment médullaire. En vert, les zones innervées par les segments thoraciques, en bleu par les segments lombaires et en rouge par les segments cervicaux et sacrés (MedicalNewToday).

1.2.5. Méninges

La moelle spinale est entourée d'une couche tissulaire ayant plusieurs fonctions, les méninges. Elles sont constituées de 3 sous-couches cellulaires :

- La dure-mère : Richement composée de collagène, elle est la couche la plus externe. On y retrouve en son sein, des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que du tissu nerveux assurant son innervation.

- L'arachnoïde : Cette couche permet de former une barrière entre la dure-mère et le SNC. Les cellules sont reliées entre elles par des jonctions serrées, régulant le transport de molécules. Sous l'arachnoïde, on retrouve l'espace sous arachnoïdien, au travers duquel s'écoule le LCS. Cet espace est maintenu grâce à des faisceaux de collagène produits par des fibroblastes, reliant l'arachnoïde à la pie-mère. Le LCS présent dans l'espace sous arachnoïdien permet la diffusion des solutés sanguins provenant des espaces Virchow-Robin présents sur les vaisseaux parcourant cet espace.

- La pie-mère : La plus profonde, elle recouvre l'ensemble du parenchyme. Sa structure la rend semi perméable aux molécules du LCS. Elle est au contact de la glie limitant composée des astrocytes et de leurs pieds astrocytaires apportant une barrière sélective supplémentaire aux différents composants présents dans le LCS. Cette dernière couche est très vascularisée, en plus d'une protection du SNC, elle apporte un support nutritif à la névroglie en apportant l'oxygène et les nutriments au tissu nerveux (Cho, 2015). La pie-mère forme aussi de nombreux points d'ancrage, appelés ligaments denticulés, permettant le maintien de la moelle spinale dans le canal vertébral (**Figure 11**) (Netter, 2014; Coles *et al.*, 2017).

En plus de la protection du SNC, les méninges participent à l'homéostasie du SNC en régulant l'activité des vaisseaux sanguins via différentes innervations des voies orthosympathiques et parasymphathiques. Cette régulation se fait en réponse aux signaux provenant des afférences sensorielles sensibles à la température, au pH ou encore à la déformation mécanique du tissu. Cela entraîne une variation de la quantité de soluté provenant des vaisseaux sanguins diffusant dans le LCS puis dans le SNC au travers de la pie-mère (Bove & Moskowitz, 1997; Kemp *et al.*, 2012).

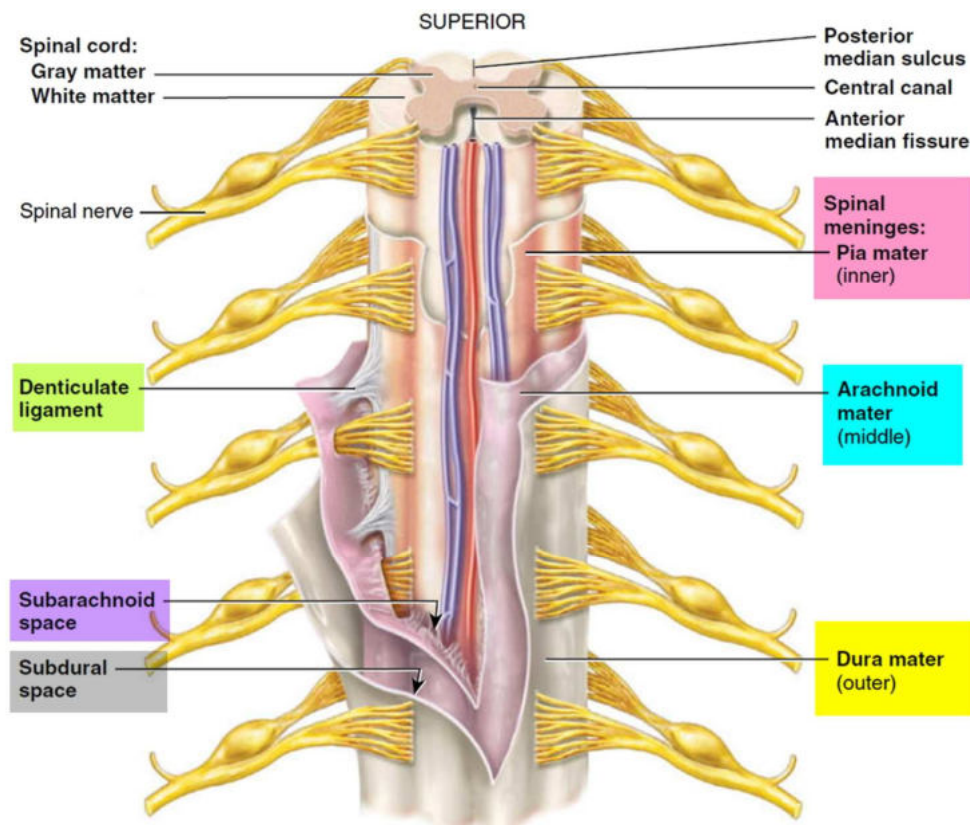


Figure 11 : Représentation schématique des couches constituant les méninges. Les méninges ont un rôle de barrière permettant d'isoler le SNC de la périphérie. Elles permettent aussi la régulation de l'homéostasie et la communication cellulaire grâce au LCS de l'espace sous arachnoïdien. Les méninges sont composées de 3 couches distinctes. De la couche la plus superficielle à la plus profonde : La dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère (HealthJade).

Une autre caractéristique des méninges, est la présence de nombreuses populations de cellules immunitaires. On y retrouve des macrophages, des cellules dendritiques, des neutrophiles, des lymphocytes T (LT) et B (LB) ainsi que des mastocytes (Nayak *et al.*, 2012; Korin *et al.*, 2017). Ces cellules participent activement à l'homéostasie du SNC. Pour exemple, la réalisation de tests de mémoire comme la piscine de Morris, a montré qu'il y avait une augmentation cérébrale des populations de LT lors de ce test et que lorsque l'on bloquait la migration des lymphocytes sanguins, les performances étaient diminuées. Ceci met en avant l'implication de ces cellules dans la plasticité cérébrale hippocampique et l'amélioration des fonctions cognitives (Kipnis *et al.*, 2004; Zarif *et al.*, 2018). Les méninges ont un rôle important dans le maintien de l'intégrité du SNC et la régulation de son homéostasie (Rua & McGavern, 2018).

1.2.6. Réseau sanguin

La moelle spinale est un tissu richement vascularisé grâce à un réseau vasculaire complexe. Ce réseau est divisé en deux axes : l'axe vertical et l'axe horizontal.

Le premier est alimenté par trois artères naissant au niveau des segments cervicaux et suivant l'axe vertical de la moelle spinale : l'artère spinale antérieure et les deux artères spinales postérieures. Toutes les trois sont issues des artères vertébrales provenant de la crosse aortique ou de l'artère sous clavière. L'artère spinale antérieure parcourt la moelle spinale en regard du sillon ventral médian. Elle donne naissance aux artères sulco-commissurales qui pénètrent dans la fissure médiane et vascularise une grande partie de la moelle spinale : les cornes ventrales, latérales et la base des cornes dorsales. Le reste de la moelle spinale est alimenté par les artères spinales postérieures disposées de part et d'autre du sillon médian postérieur.

L'axe horizontal permet d'alimenter les artères de l'axe vertical tout le long de la moelle spinale grâce aux artères radiculo-spinales postérieures et antérieures issues des artères segmentaires de l'aorte. L'artère spinale antérieure et l'artère spinale postérieure s'anastomosent afin de former la vasocorona constituant un réseau artériel pie-mérien appelé plexus coronaire qui dérive en artère perforante pénétrant la moelle spinale essentiellement dans les parties antérieures et latérales de la substance blanche (**Figure 12, 14**) (Santillan *et al.*, 2012; Gregg & Gailloud, 2021).

Le sang est drainé par un réseau veineux plus important que le réseau artériel. Celui-ci est composé de six veines spinales réparties tout autour de la moelle spinale :

- La veine spinale antérieure située dans la fissure médiane antérieure, draine les régions antérieures et centrales de la moelle spinale.
- La veine spinale postérieure située dans le sillon médian postérieur, draine les régions postérieures de la moelle spinale.
- La paire de veines antéro-latérales longeant les sillons antéro-latéraux et la paire de veines postéro-latérales longeant les sillons postéro-latéraux. Ces quatre veines drainent essentiellement les régions périphériques de la moelle spinale.

Le sang provenant de ces veines va se déverser dans les veines radiculaires antérieures et postérieures. Ces veines suivent les racines ventrales et dorsales des nerfs spinaux et vont rejoindre le réseau veineux périphérique en se drainant dans les veines vertébrales puis les veines cervicales profondes et enfin les veines sous clavières pour les régions cervicales. Pour les veines provenant des segments thoraciques et lombaires, celles-ci sont drainées dans le système azygos puis se jettent dans la veine cave supérieure (**Figure 13, 14**) (Santillan *et al.*, 2012; Gregg & Gailloud, 2021)

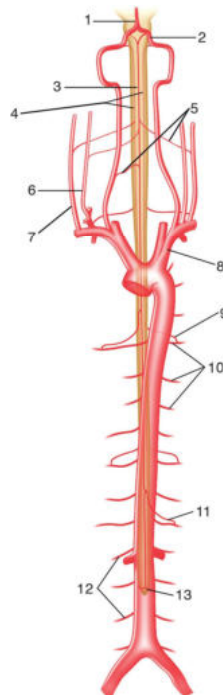


Figure 12 : Représentation du réseau artériel de la moelle spinale. 1. Artère basilaire, 2. Artère vertébrale, 3. Artère spinale antérieure, 4. Artères spinale postérieure, 5. Artère radiculo-médullaire antérieure, 6. Artère cervicale ascendante, 7. Artère cervicale profonde, 8. Artère sous-clavière, 9. Artère radiculo-médullaire postérieure, 10. Artères segmentaires, 11. Artère d'Adamkiewicz, 12. Artères segmentaires, 13. Rami cruciatis (Santillan 2012).

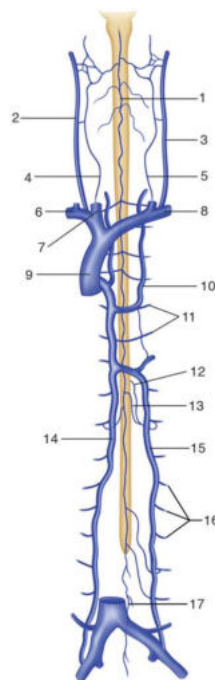


Figure 13 : Représentation du réseau veineux de la moelle spinale. 1. Veine antérieure médiane, 2. Veine cervicale profonde droite, 3. Veine cervicale profonde gauche, 4. Veine vertébrale droite, 5. Veine vertébrale gauche, 6. Veine sous-clavière, 7. Veine jugulaire interne, 8. Veine brachio-céphalique gauche, 9. Veine cave supérieure, 10. Veine hemiazygos accessoire, 11. Veine intercostale, 12. Veine radiculo-médullaire postérieure, 13. Veine radiculo-médullaire antérieure, 14. Veine azygos, 15. Veine hemiazygos, 16. Veines lombaires, 17. Veine du filum terminal (Santillan 2012).

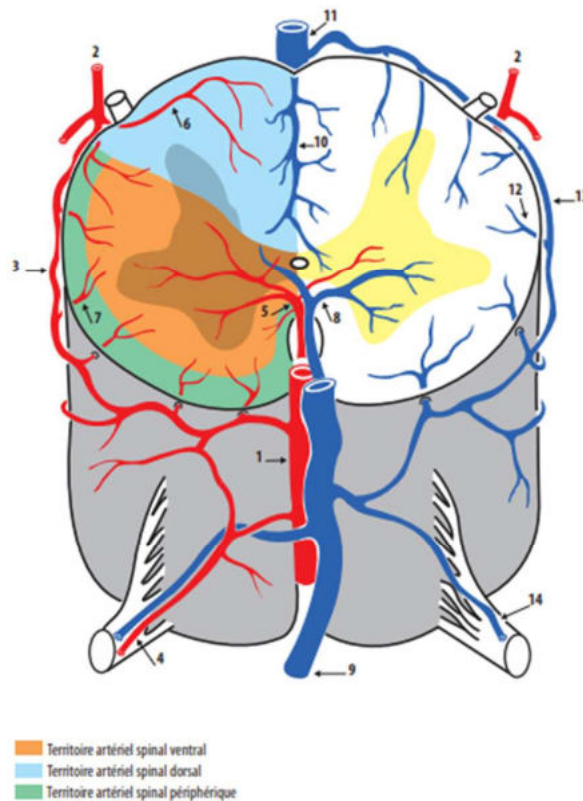


Figure 14 : Représentation schématique représentant la perfusion intramédullaire. 1. Artère spinale antérieure, 2. Artère spinale postérieure, 3. Réseau artérielle pie-mérien, 4. Artère radiculo-médullaire antérieure, 5. Artère sulco-comissurale, 6. Branches artérielles perforantes, 7. Branches perforantes, 8. Veine sulco-comissurale, 9. Veine spinale antérieure, 10. Branches veineuses perforantes, 11. Veine postérieure médiane, 12. Veines intrinsèques périphériques, 13. Réseau veineux pie-mérien périspinal, 14. Veines radiculaires (Tatu 2009).

1.2.7. Réseau glymphatique

Il a été récemment mis en avant la présence de vaisseaux lymphatiques meningeaux cérébraux drainant le liquide interstitiel (LIS) constitué des déchets métaboliques produit par les cellules cérébrales et spinales (Aspelund *et al.*, 2015; Louveau *et al.*, 2015). Jusqu'à la publication de ces travaux, il était considéré que, dans le SNC, un seul système de diffusion du liquide interstitiel entre les artères et les veines permettait la clairance cérébrale. Cette vision a évolué jusqu'à la caractérisation du réseau périvasculaire et glymphatique réalisant des échanges multiples entre le LCS, le LIS et la circulation sanguine. Le réseau périvasculaire, constitué des espaces périvasculaires situés entre la média et la couche musculaire lisse des artères, permet un transport de l'eau, des métabolites et des déchets du parenchyme vers le LCS grâce à un flux opposé à la circulation sanguine induit par la contraction artérielle (Abbott,

2004; Schley *et al.*, 2006). Le réseau glymphatique quant à lui est caractérisé par trois composantes fonctionnelles :

- Les espaces péri-artériels situés entre la membrane basale des cellules musculaires lisses des artères et les pieds astrocytaires réalisant des échanges du LCS vers le LIS.
- Le parenchyme où se mélangent le LCS et l'ISF.
- Les espaces péri-veineux situés entre la membrane basale des cellules musculaires lisses des veines et les pieds astrocytaires, réalisant un transport des déchets de l'ISF vers le LCS (Huffman *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2018).

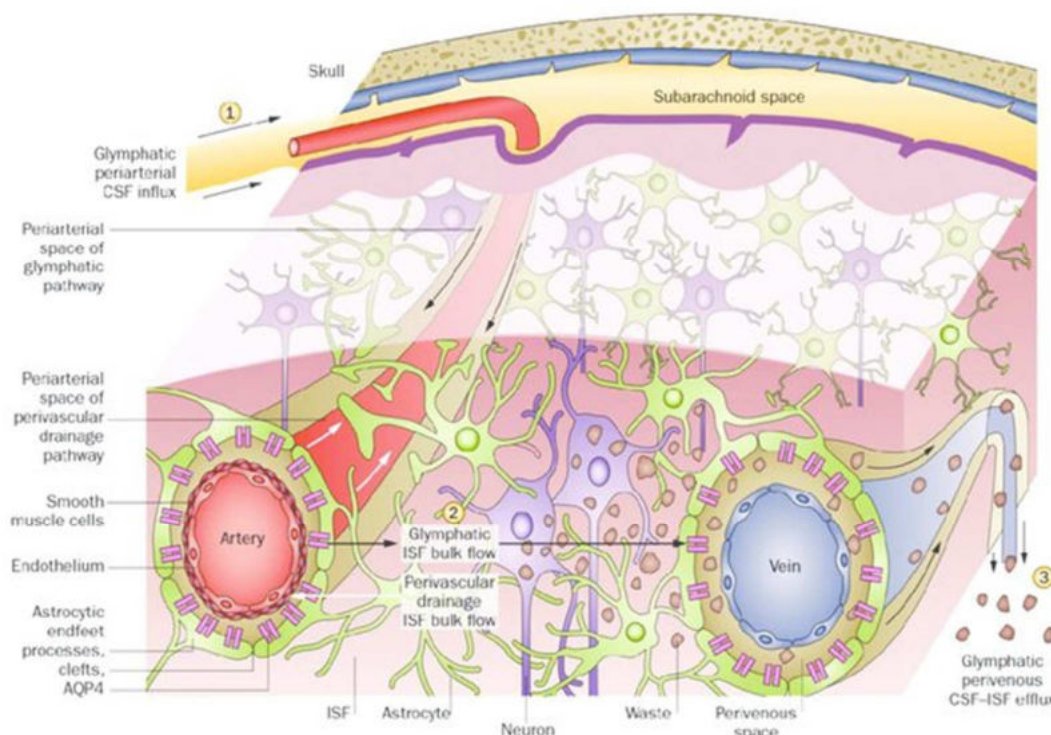


Figure 15 : Représentation schématique du système périvasculaire et glymphatique au sein du parenchyme et des méninges. Le système périvasculaire permet un drainage des métabolites et des déchets cellulaires du liquide interstitiel jusqu'au LCS du SAS via les espaces périvasculaires des artères. Le système glymphatique est divisé en 3 compartiments, 1. Les espaces péri-artériels permettant un influx du LCS vers le LIS, 2. Le parenchyme dans lequel se mélange le LCS et le LIS, 3. Les espaces péri-veineux au travers desquels les métabolites et les déchets cellulaires sont drainés jusqu'au LCS du SAS (Hoffman 2016)

Ces échanges dynamiques sont permis grâce aux aquaporines 4 (AQP4) présentes sur les pieds astrocytaires (voir partie sur la barrière hémato encéphalique – barrière hémato spinal) permettant une diffusion de l'eau et des solutés (**Figure 15**) (Iliff & Nedergaard, 2013; Jessen *et al.*, 2015).

Cette circulation bidirectionnelle est importante dans l'entretien de l'homéostasie tissulaire et la communication cellulaire. Le LCS des espaces sous arachnoïdiens, *subarachnoid space* (SAS) sert à la fois de réserve de solutés équilibrant la composition du LIS et aussi de voie de drainage des déchets cellulaires. En effet, les métabolites et les déchets cellulaires du LCS sont drainés et éliminés en diffusant au travers des vaisseaux lymphatiques méningiaux situés près du sinus veineux et constituant le système interstitiel cérébral. Ces vaisseaux quittent le système nerveux central en suivant le réseau veineux et drainent la lymphe jusqu'aux ganglions lymphatiques cervicaux profonds (Raper *et al.*, 2016). Le LCS des SAS est aussi drainé en dehors du système nerveux central au niveau du BO, grâce aux espaces péri-neuraux présents autour des neurones olfactifs et de leurs axones traversant la lame criblée jusqu'à la muqueuse nasale où s'opère un échange avec les vaisseaux lymphatiques nasaux, drainant eux aussi, la lymphe jusqu'aux ganglions lymphatiques cervicaux profonds (**Figure 16**) (Sun *et al.*, 2018).

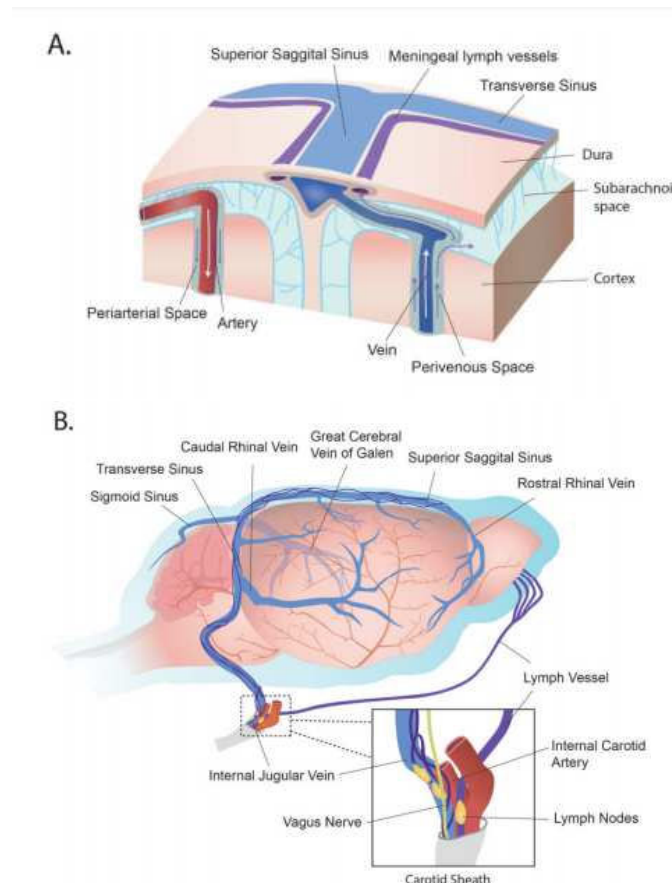


Figure 16 : Représentation schématique du réseau glymphatique et lymphatique cérébral. Le LIS provenant des espaces péri-veineux est drainé jusqu'au LCS du SAS puis est pris en charge par les vaisseaux lymphatiques méningiaux qui sortent du SNC en suivant le réseau veineux au niveau de la partie postérieure du crâne jusqu'aux ganglions lymphatiques cervicaux profonds (A). La deuxième voie de drainage du LIS et du LCS des SAS se fait par les bulbes olfactifs. Le drainage est réalisé au travers des espaces péri-neuraux des nerfs olfactifs reliant le bulbe olfactif à la muqueuse olfactive située en périphérie. Dans la muqueuse olfactive sont présents des vaisseaux lymphatiques nasaux drainant la lymphe jusqu'aux ganglions lymphatiques cervicaux profonds (B) (Sun 2018).

En condition physiologique, les vaisseaux lymphatiques méningiaux jouent un rôle important dans la surveillance immunitaire. Ils drainent différentes cellules immunitaires telles que, des LB, LT et des cellules dendritiques capables de s'activer suite à une atteinte périphérique ou en réponse à la présence de cytokines inflammatoires et de signaux de danger drainés depuis le parenchyme (Aspelund *et al.*, 2015; Rua & McGavern, 2018). Dans la moelle spinale, du fait de l'absence de vaisseaux lymphatiques permettant le drainage des métabolites et des déchets des cellules spinales, le LCS des SAS est éliminé par les vaisseaux lymphatiques cérébraux induisant alors une communication des solutés et des molécules de signalisation entre les cellules spinales et les cellules cérébrales.

1.2.8. Le système ventriculaire

Ce système démarre dans les ventricules latéraux dans lesquels est situé le plexus choroïde produisant le LCS. Chez l'Homme le plexus choroïde produit entre 400 et 600 ml de LCS par jour alors que le volume total du système ventriculaire est de 150 ml. On observe donc un renouvellement important et constant du LCS (Sakka *et al.*, 2011).

Une fois produit, le LCS s'écoule des ventricules latéraux vers le troisième ventricule au travers des foramens interventriculaires, puis dans le quatrième ventricule en passant par les aqueducs de Sylvius avant de rejoindre la *cisterna magna* en traversant le *foramen* de Magendie et les SAS en passant par le *foramina* de Luschka situés respectivement à la moitié et à la base du quatrième ventricule. Le LCS parcourt ensuite la moelle spinale en traversant les SAS situés au niveau des méninges dorsales et en empruntant le canal central en suivant l'axe rostro-caudal. Une fois arrivé dans la partie caudale de la moelle spinale, le LCS remonte vers le cerveau en suivant les SAS des méninges ventrales de la moelle spinale. Il réalise alors tout le tour du cerveau en suivant les SAS situés sous le crâne et est régulé par les villosités arachnoïdiennes permettant un drainage vers les vaisseaux lymphatiques méningiaux (**Figure 17**) (Stratchko *et al.*, 2016).

Le LCS est un composant important du SNC. Il est en contact étroit avec l'ensemble des cellules neurales et est composé d'un ensemble de molécules nécessaires à l'homéostasie cérébrale. Précédemment nous avons décrit le drainage du LIS vers le LCS des SAS. Ce drainage représente 20% de la composition du LCS. La majorité des molécules présentes dans le LCS proviennent d'une diffusion passive du plasma provenant des capillaires choroïdes via des gradients de pression et par le transport actif grâce à des transporteurs ioniques au travers de l'épithélium choroïde composé d'épendymocytes. Ces cellules possèdent dans leur

cytoplasme l'anhydrase carbonique catalysant l' H_2O et le CO_2 en H^+ et HCO_3^- . Ces ions sont nécessaires à l'activité des transporteurs protéiques les échangeant contre du Na^+ et du Cl^- . Ces transporteurs sont situés sur la membrane baso-latérale des épendymocytes alors que sur leur membrane apicale, sont présentes des pompes ioniques adénosines triphosphates (ATP) dépendantes, sécrétant le H^+ , le HCO_3^- , le Na^+ et le Cl^- dans la lumière des ventricules. On retrouve aussi sur la face apicale des AQP1 facilitant le transport de l'eau via le gradient osmotique généré par la pompe ionique et régulé par le co-transporteur NaK2Cl générant un transport ionique bidirectionnel régulant la sécrétion et la composition du LCS (Owler *et al.*, 2010).

Du fait des échanges constants avec le sang, la composition du LCS est proche de celle du sang mais les concentrations moléculaires sont beaucoup plus faibles et représentent 0.2% à 0.5% de la concentration sanguine. Sa composition va donc varier en fonction de celle du sang et reflétera l'état périphérique de l'organisme. Il représente donc un très bon senseur de l'état tissulaire du SNC (Reiber, 2003). La communication moléculaire entre le LCS et le sang est régulée par la présence de tanocytes sur le plancher du 3^{ème} ventricule. Ces cellules épendymogliales non ciliées régulent la diffusion des molécules sanguines provenant des capillaires au travers des espaces péricellulaires vers le LCS grâce à des jonctions serrées situées sur leur corps cellulaire.

La présence de récepteurs dirigés vers le LCS leur permet de contrôler la présence et la concentration de certaines molécules et donc d'augmenter ou de diminuer la diffusion libre des molécules sanguines (Prevot *et al.*, 2018). Il a été démontré que ces cellules pouvaient prendre en charge le transport de certaines molécules telles que le glucose, la ghréline ou encore la leptine par transcytose à partir des capillaires jusqu'au LCS mais aussi du LCS jusqu'au parenchyme, en particulier dans l'hypothalamus (**Figure 18**) (Balland *et al.*, 2014; García-Cáceres *et al.*, 2019).

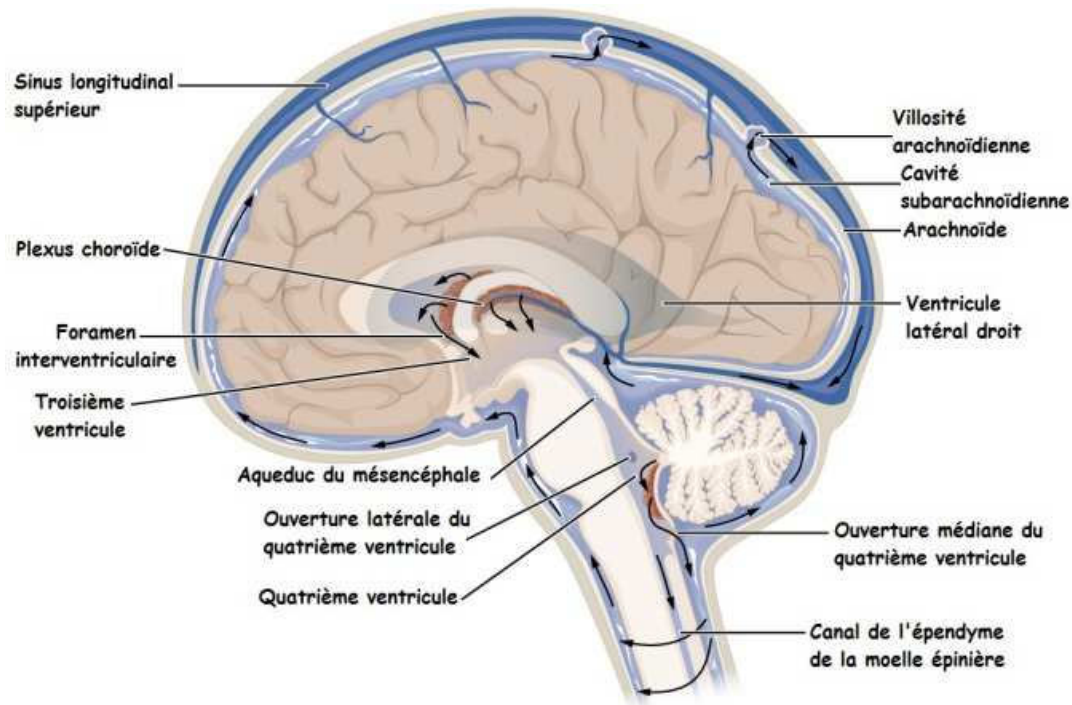


Figure 17 : Représentation schématique du système ventriculaire. Le LCS produit par le plexus choroïde s'écoule au travers du système ventriculaire en passant par les ventricules latéraux, l'aqueduc de Sylvius (du mésencéphale), le troisième ventricule, le quatrième ventricule, les ouvertures latérales et médianes du quatrième ventricule, le canal central et les SAS des méninges de la partie dorsale de la moelle spinale, les SAS des méninges de la partie ventrale de la moelle spinale, les SAS cérébraux et la base du crâne puis est recyclé ou éliminé via le système glymphatique (Unisciel, Canon).

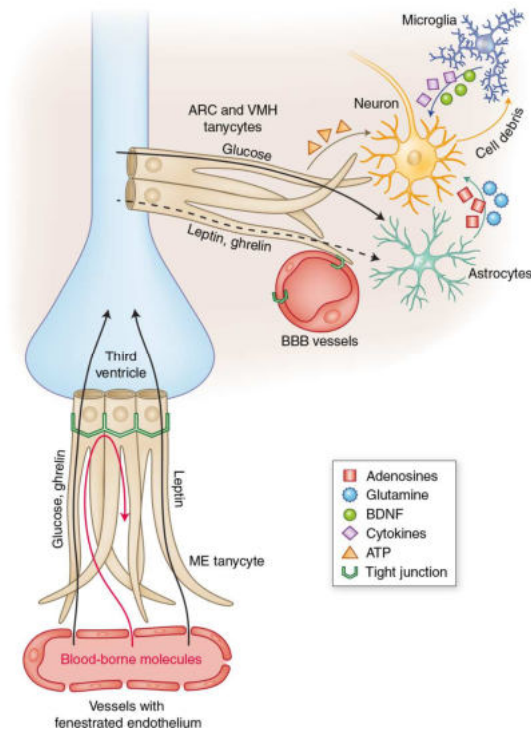


Figure 18 : Représentation schématique de la communication LCS – sang via les tanocytes. Les tanocytes régulent la diffusion passive des molécules sanguines grâce à des jonctions serrées modulées par les concentrations moléculaires du LCS. Par transcytose, les tanocytes permettent un transport du glucose, de la ghréline et de la leptine des capillaires au LCS et du LCS au parenchyme.

1.3. Composition cellulaire

La moelle spinale et le cerveau sont constitués d'un ensemble de cellules ayant des rôles et des spécifications précises. On distingue les neurones, les cellules microgliales et les cellules gliales composées des oligodendrocytes et des astrocytes.

1.3.1. Neurones et axones

Les neurones sont les cellules spécialisées de l'induction des commandes motrices et de l'intégration des signaux sensitifs. Ils permettent la conduction bidirectionnelle de ces informations sous forme de signaux électriques entre le SNC et les organes cibles en périphérie. Leur corps cellulaire, appelé soma, est localisé dans des territoires spécifiques à leur fonction dans le cerveau et dans les *laminae* comme décrit précédemment. En fonction du type de neurone, le soma peut varier de 5 à 135 μm . Leur fonctionnement est similaire aux autres cellules de l'organisme, mise à part, qu'ils possèdent une forte activité métabolique liée à la synthèse permanente de messagers chimiques, les neurotransmetteurs (NT). Cette activité importante s'observe par la présence d'une accumulation importante de ribosomes sur le réticulum endoplasmique granuleux, appelée corps de Nissl (Lodish *et al.*, 2008).

La transmission et l'intégration de ces signaux est permise par les neurites qui sont des excroissances du soma. On distingue deux types de neurites, les dendrites et les axones. Les dendrites, très ramifiées, réalisent l'intégration des signaux nerveux entrant dans le neurone. Ces extensions peuvent faire jusqu'à 1 mm de long et représenter 90% de la surface totale du neurone. Elles sont elles-mêmes composées de plusieurs fines extensions appelées épines dendritiques où s'établissent les connexions synaptiques. Lorsqu'un neurone est composé de plusieurs dendrites, on parlera d'arbre dendritique. A l'opposé des dendrites, un neurone ne possède généralement qu'un axone. C'est par cette excroissance que les influx nerveux sortant de la cellule sont transmis à la cellule cible. L'axone naît au niveau du cône d'émergence puis s'étire en une fibre nerveuse allant de quelques millimètres à un mètre comme pour les axones constituant le nerf sciatique. En fonction de leur diamètre, de leur rôle et de la présence de gaine de myéline ou non, on distingue différentes fibres nerveuses :

- A alpha : Impliquées dans la transmission des signaux moteurs et sensoriels, ces fibres sont les plus grosses avec un diamètre allant de 12 à 20 μm et sont dotées d'un abondant recouvrement de myéline. Elles permettent la conduction des influx nerveux responsables de la motricité volontaire et de la proprioception.

- A bêta : Ces fibres font de 5 à 12 μm de diamètre et possèdent un recouvrant de myéline moins importante que les fibres A alpha les rendant moins « rapides » que ces dernières. Elles sont impliquées dans l'intégration des informations tactiles et de pression, permettant un ajustement des commandes motrices en fonction de ces informations.

- A gamma : Moins grosses et moins myélinisées que les fibres A bêta, ces fibres de 3 à 6 μm de diamètre interviennent seulement dans les commandes motrices. Elles jouent un rôle important dans l'ajustement de la motricité des fuseaux neuromusculaires.

- A delta : De faible diamètre allant de 2 à 5 μm et recouvertes d'une fine couche de myéline, ces fibres sont plus lentes que les 3 décrites précédemment. Elles sont impliquées dans le relai des informations sensorielles telles que le toucher léger superficiel, la stimulation thermique froide non douloureuse et la douleur aiguë rapide. Elles sont aussi connectées à des terminaisons nociceptives répondant aux stimulations à haut seuil d'activation comme les douleurs thermiques, mécaniques et chimiques

- B : Plus lentes que les fibres A, elles mesurent moins de 3 μm de diamètre et sont recouvertes d'une fine couche de myéline. Ces fibres sont responsables de la conduction nerveuse motrice préganglionnaire du système nerveux végétatif.

- C : Impliquées seulement dans la transmission d'informations sensorielles, ces fibres de petit calibre allant de 0,3 à 1,3 μm de diamètre et non myélinisés, sont très lentes de conduction. Elles représentent une très large majorité des afférences cutanées et la quasi-totalité des afférences viscérales. Elles permettent la conduction des informations de stimulation thermique chaude non douloureuse ainsi que la douleur aiguë « tardive » (quelques secondes après les informations provenant des fibres A delta). Ces fibres sont connectées à des récepteurs polymodaux permettant l'intégration des différents stimuli (Purves *et al.*, 2015; Varga & Mravec, 2015).

Ces fibres ou axones se terminent par une extrémité très ramifiée appelée arborisation terminale, comportant les boutons synaptiques formant des synapses responsables de la communication entre les neurones par la libération de NT. La synthèse des NT tout comme celle des éléments indispensables au bon fonctionnement de l'axone se fait dans le soma du neurone. Le transport de ces éléments est réalisé par deux processus : le transport antérograde et rétrograde. L'axone est composé d'un réseau de microtubules le parcourant sur toute sa longueur sur lesquels se déplacent des vésicules cargos prises en charge par la kinésine et le complexe dynéine-dynactine. Le transport antérograde, pris en charge par la kinésine, permet le déplacement des molécules et des organelles du soma vers les synapses. On distingue deux

types de transport antérograde, le transport axonal lent et le transport axonal rapide. La synthèse de NT est réalisée dans l'extrémité terminale de l'axone, faisant intervenir des enzymes synthétisées dans le soma. Ces enzymes sont transportées par de petites vésicules à centre clair à une vitesse de 0.5 à 5 mm par jour. Pour le cas des neuropeptides, ceux-ci sont directement synthétisés dans le soma puis sont acheminés plus rapidement grâce à de grandes vésicules à centre dense à une vitesse de 400 mm par jour (Purves *et al.*, 2015). Le transport rétrograde quant à lui, impliquant le complexe dynéine-dynactine, joue un rôle dans le nettoyage et le recyclage des organelles comme les mitochondries ainsi que dans la transmission d'informations relatives de l'état de la région distale de l'axone (**Figure 19**) (Pasinelli & Brown, 2006).

La morphologie des neurones est un critère important de classification. En fonction de la taille de leur soma, de la localisation et du nombre de leurs arbres dendritiques ainsi que de la longueur de l'axone, on distingue quatre types de neurones. Les neurones unipolaires, composés d'un seul neurite, les neurones bipolaires composés de deux neurites, les neurones multipolaires composés de plusieurs neurites et les neurones pseudo-unipolaires résultant de la fusion des dendrites et de l'axone d'un neurone bipolaire (**Figure 20**) (Sheerin, 2004).

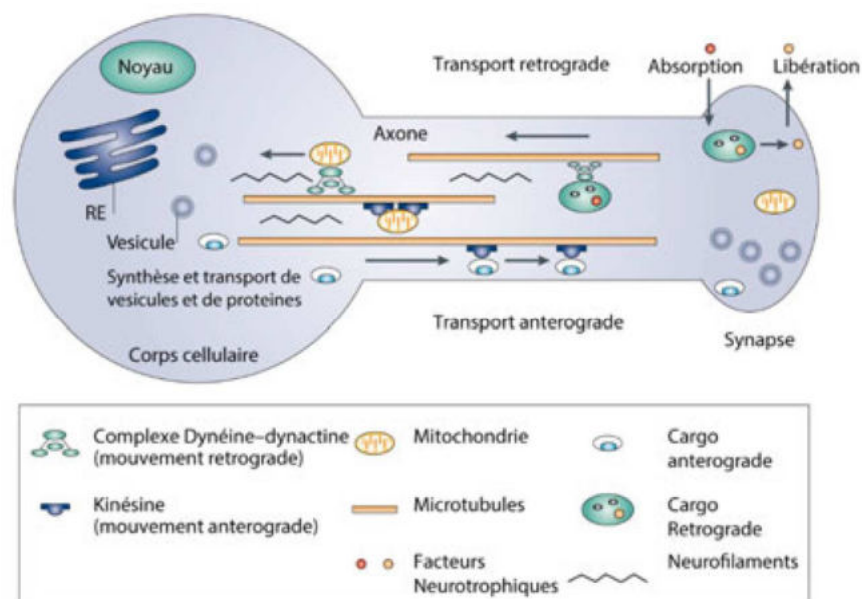


Figure 19 : Schéma représentant le transport antérograde et rétrograde axonal. Du soma à l'extrémité synaptique s'étend un réseau de microtubules sur lequel se déplacent les protéines cargo : la kinésine et le complexe dynéine-dynactine. La kinésine est impliquée dans le transport antérograde, transportant les molécules et les organelles du soma vers l'extrémité synaptique. Le transport rétrograde est assuré par le complexe dynéine-dynactine permettant un nettoyage et un recyclage des organelles, telles que les mitochondries (Pasinelli and Brown, 2006).

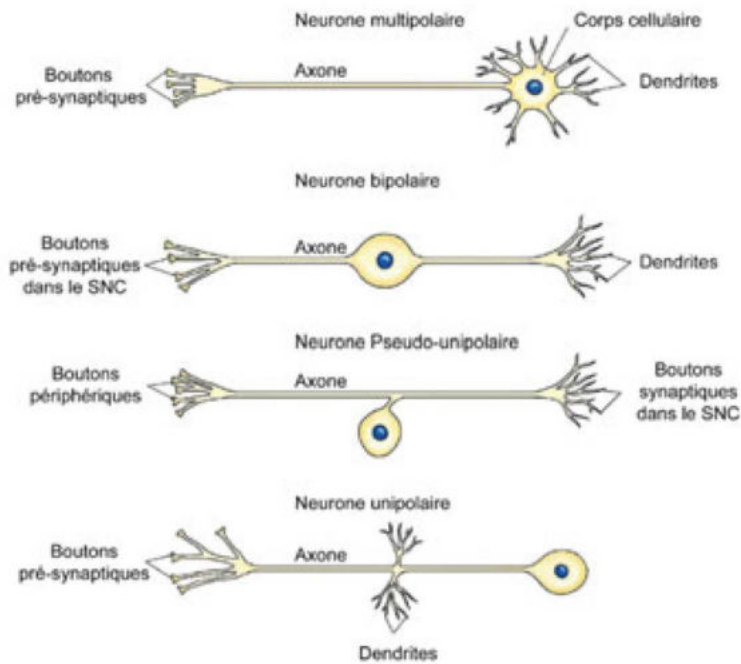


Figure 20 : Représentation des différents types de neurones en fonction de leur morphologie. Lorsque les neurones ne possèdent qu'un neurite ils sont dits unipolaires, lorsqu'ils ont deux neurites ils sont dits bipolaires et lorsqu'ils en possèdent plusieurs ils sont dits multipolaires. Lorsque l'on observe une fusion entre les dendrites et l'axone, ils sont dits pseudo-unipolaires (Honoré, 2017).

Enfin les neurones sont aussi classés par rapport à leur fonction et les neurotransmetteurs qu'ils sécrètent. On distingue les neurones afférents ou sensitifs, les neurones efférents ou moteurs et les interneurons. Chacune de ces classes de neurones fait intervenir des neurotransmetteurs qui sont propre à leur fonction.

1.3.2. Cellules gliales

Les cellules gliales (ou névroglie ou neuroglie) sont les cellules majoritaires du SNC. Du grec *glaios* signifiant « gluant », ce terme a été utilisé pour la première fois par Rudolf Virchow en 1846 afin de désigner la substance conjonctive du cerveau et de la moelle spinale. L'amélioration des connaissances, les décennies suivantes, a permis de définir cette substance conjonctive comme un ensemble de cellules fonctionnelles ayant un rôle plus complexe que seule « colle » des neurones. Composées d'oligodendrocytes, d'astrocytes et de cellules microgliales, les cellules gliales jouent un rôle important dans le fonctionnement, l'homéostasie, la maturation et la défense du SNC.

a. Oligodendrocytes

C'est en 1921 que Pio del Rio-Hortega les décrira pour la première fois. Leur nom provient de l'association des mots grecs *oligo* (peu), *dendros* (branche) et *cytos* (cellule), désignant littéralement «les cellules avec peu de branches» (Boullerne, 2016). Le rôle premier des oligodendrocytes est la myélinisation des axones tout comme les cellules de Schwann (CSs), dans le système nerveux périphérique. Ce processus débute dès la naissance et se déroule pendant les deux premières décennies chez l'Homme ou les deux premiers mois chez le rongeur. Après cette période, ce processus perdure tout au long de la vie afin de remplacer les oligodendrocytes perdus, impliquant la différenciation des cellules progénitrices d'oligodendrocytes, *oligodendrocyte progenitor cells* (OPC) ou de myéliniser les axones non myélinisés (Bartzokis *et al.*, 2012; Young *et al.*, 2013). La myélinisation des axones augmente la vitesse de conduction des potentiels d'action. Pour un axone non myélinisé, celle-ci est de 0,5 à 2 m/s alors qu'elle peut atteindre 100 m/s pour un axone myélinisé de diamètre équivalent. Ce processus, en améliorant la conduction des axones de petit diamètre, permet d'améliorer le compactage des axones et d'en augmenter leur quantité. (Verkhatsky, & Butt, 2013).

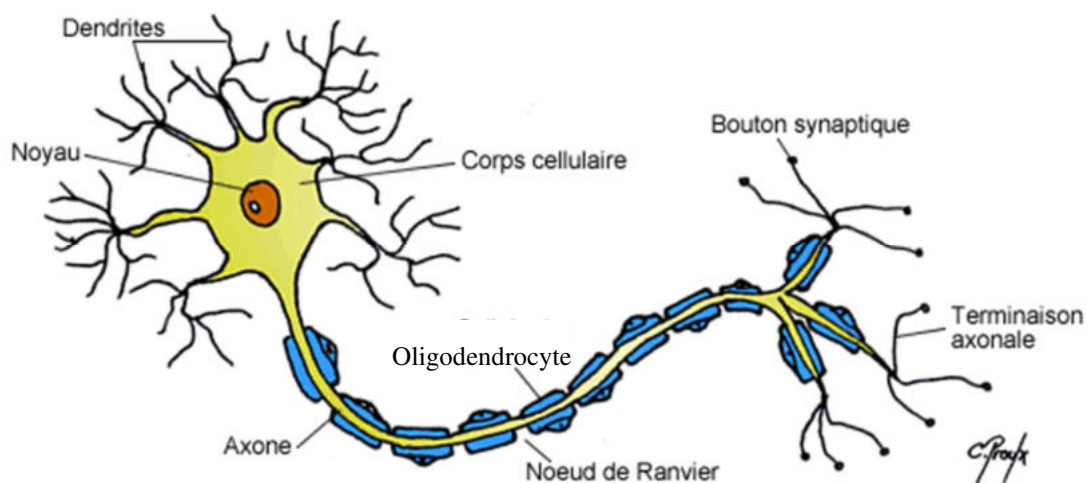


Figure 21 : Représentation schématique d'un neurone myélinisé. La gaine de myéline présente sur l'axone est une succession de revêtements radiaux graisseux appelés internœuds pouvant mesurer de 100 μm à 1700 μm de long et étant espacés par des zones non myélinisées appelées nœud de Ranvier. Cet enchainement permet la conduction du potentiel saltatoire de nœud en nœud accélérant ainsi le potentiel d'action (Proulx, modifié).

La myéline est un revêtement radial graisseux formé par la membrane plasmique d'une dendrite d'un oligodendrocyte s'enroulant autour de l'axone. Cet enroulement, appelé internœud, peut mesurer de 100 μm à 1700 μm de long (**Figure 21**). La partie interne de l'internœud, au contact de l'axone, est formée par la partie distale de la dendrite de

l'oligodendrocyte alors que la partie la plus proche du corps cellulaire, compose la partie externe. Un oligodendrocyte peut myéliniser jusqu'à 30 axones et peut myéliniser plusieurs fois le même axone. Chaque internœud est séparé d'un autre par une segmentation exposant l'axone appelée nœud de Ranvier. Cette segmentation permet au potentiel d'action de se propager en « sautant » grâce à la propagation saltatoire de nœud en nœud. L'accumulation de canaux ionique K^+ et Na^+ à la surface de l'axolemme facilite une rapide dépolarisation et repolarisation de la membrane axonale augmentant la vitesse de conduction du potentiel d'action (**Figure 22**) (Poliak *et al.*, 2003).

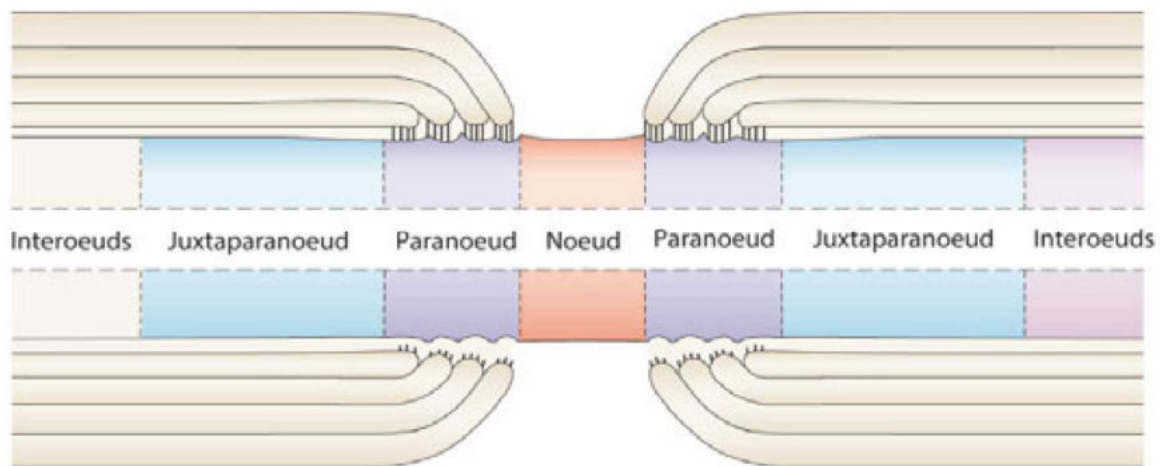


Figure 22 : Représentation schématique des régions de la gaine de myéline. Entre les internœuds et les nœuds de Ranvier, on distingue la région juxtapanœud et paranœud jouant un rôle important dans la conduction du potentiel saltatoire. Les boucles paranodales sont ancrées à l'axone au niveau des paranœuds (Poliak *et al.*, 2003).

La myéline est une structure faiblement hydratée, composée de 70-80% de lipides et de 20-30% de protéines (Jackman *et al.*, 2009). Le cholestérol représente 30% des composés lipidiques de la myéline, il est important pour l'assemblage et l'intégrité de la gaine de myéline. Des quantités importantes sont nécessaires lors du développement et du processus de myélinisation des axones à partir de la naissance. En effet la masse totale de cholestérol passe de 400g à la naissance pour atteindre une masse représentant 1 400g à l'âge adulte (Dietschy & Turley, 2004). Il a été démontré que l'absence de synthèse de cholestérol par les oligodendrocytes entraînait d'importantes perturbations de la myélinisation et l'apparition de pathologies neuromusculaires (Saher *et al.*, 2005). Les phospholipides, quant à eux, composent à hauteur de 40% la myéline. Ce lipide intervient comme composant structurel de la membrane en interagissant avec des protéines de la myéline structurant ainsi la bicouche lipidique. Enfin la myéline est composée de 30% de glycosphingolipides faisant partie de la famille des glycolipides (Jackman *et al.*, 2009).

A l'opposé des lipides, les protéines myéliniques sont considérées plus spécifiques de la myéline et leur identification est liée avec la caractérisation d'oligodendrocytes matures. Deux protéines majoritaires représentent 80% des protéines myéliniques : la *myelin basic protein* (MBP) et la *myelin proteolipid protein* (PLP).

La MBP représente 30% des protéines myéliniques. Elle est exprimée sur la surface cytoplasmique de l'oligodendrocyte et est impliquée dans la compaction de la myéline (Bijlard *et al.*, 2015). Les MBP agissent également comme un squelette protéique au sein de la myéline par leur fixation aux filaments d'actine contenus dans la bicouche lipidique (Boggs & Wang, 2004). La synthèse de MBP ne se fait pas dans le cytoplasme. Les ARNm sont directement envoyés au niveau de la membrane myélinique permettant un contrôle du processus de fusion membranaire impliquée dans le phénomène de compaction (Laursen *et al.*, 2011).

La PLP est la deuxième protéine myélinique la plus exprimée. Aussi impliquée dans le processus de compaction de la myéline, elle a aussi un rôle dans la création de jonctions membranaires. Cette protéine constituée de plusieurs domaines hydrophobes, traverse la membrane des oligodendrocytes et permet une stabilisation de l'ensemble des couches de myéline entre elles (Boison & Stoffel, 1994; Baumann & Pham-Dinh, 2001). L'absence de la PLP entraîne une dégénérescence axonale, en particulier chez les axones de petits diamètres ainsi que la mort prématurée des oligodendrocytes responsables de déficits locomoteurs chez la souris (Edgar & Garbern, 2004).

La 2',3'-nucléotide-3'-phosphodiesterase cyclique, *2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase* (CNP) constitue 4% des protéines myéliniques. Cette protéine est retrouvée essentiellement chez les oligodendrocytes non myélinisants et au niveau des boucles paranodales. Cette enzyme participe à la croissance des prolongements cytoplasmiques des oligodendrocytes et est exprimée différemment au cours de la différenciation des oligodendrocytes. Les OPC expriment CNP2 puis lors de la myélinisation, c'est la forme CNP1 qui devient majoritaire. Les oligodendrocytes matures expriment donc les formes CNP1 et CNP2 (Gravel *et al.*, 1996). Des études, inhibant cette protéine, ont montré que son absence induisait une dégénérescence axonale mettant en avant son rôle dans les interactions axone-cellule gliale (Edgar & Nave, 2009; Verrier *et al.*, 2012).

La glycoprotéine associée à la myéline, *myelin associated glycoprotein* (MAG) est une glycoprotéine de la superfamille des immunoglobulines représentant moins de 1% des protéines myéliniques. Elle est présente sous deux formes, la L-MAG et la S-MAG. La L-MAG est

fortement exprimée pendant les phases précoces de la myélinisation puis son expression va diminuer progressivement lors de la maturation de la gaine de myéline. La forme S-MAG quant à elle, est fortement exprimée dans la myéline mature dans le SNC adulte. Elle est localisée principalement sur la face interne de la myéline mature en contact avec l'axone dans l'espace péri-axonal (Trapp, 1990). L'utilisation de souris transgéniques déficientes, *knock out* (KO), pour le gène MAG a montré que son absence induit des anomalies de formation des boucles paranodales et des bords membranaires de l'espace péri-axonal. Elle est donc impliquée dans les interactions axone/gaine de myéline (Verkhratsky, & Butt, 2013).

La glycoprotéine d'oligodendrocyte de myéline, *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG). Cette protéine apparaît tardivement lors de la myélinisation et est située essentiellement sur la face la plus externe de la gaine de myéline. Son rôle est incertain mais sa structure moléculaire et son domaine extracellulaire d'immunoglobuline lui permettrait de jouer un rôle possible en tant que récepteur membranaire ou de molécule d'adhésion. Son apparition tardive lors de la myélinisation en fait d'elle un marqueur d'identification des oligodendrocytes matures (Verkhratsky, & Butt, 2013; Peschl *et al.*, 2017).

b. Astrocytes

C'est en 1893 que le terme astrocyte fut employé pour la première fois par l'anatomiste Michael Von Lenhossek afin de décrire des cellules du SNC en forme d'étoile. Leur nom provient de *astron*, signifiant étoile, et de *cyto* signifiant cellule. Ce nom a été utilisé par l'anatomiste car les astrocytes sont des cellules avec un corps arrondi et pourvues de nombreuses ramifications, jusqu'à 100, pouvant mesurer jusqu'à 200 μm chez l'Homme et 30 – 60 μm chez le rongeur (Oberheim *et al.*, 2009, 2012). Ces ramifications sont elles-mêmes subdivisées en fines ramifications, ce qui leur permet de réaliser des interactions avec un grand nombre de neurones, de vaisseaux et de synapses. Il est considéré qu'un astrocyte peut être en contact simultanément avec 8 corps cellulaires de neurones, 5 vaisseaux et plus de 100 000 synapses chez la souris et jusqu'à 2 millions de synapses chez l'Homme (Bushong *et al.*, 2002; Oberheim *et al.*, 2009). Chaque astrocyte, en condition physiologique, possède son propre territoire et chevauche très peu celui d'un autre astrocyte. Le pourcentage maximum de chevauchement est de 5% (Nedergaard *et al.*, 2003).

Au regard de leur morphologie, les astrocytes sont divisés en deux grandes classes, les astrocytes fibreux et protoplasmiques (**Figure 23**) (Oberheim *et al.*, 2012) Les astrocytes fibreux sont les plus présents au sein de la substance blanche, formant de longs et fins

prolongements radiaires, riches en gliofilaments orientés longitudinalement dans le plan des faisceaux d'axones. On les retrouve au contact des axones myélinisés et des nœuds de Ranvier (Morel *et al.*, 2017). Quant aux astrocytes protoplasmiques, ceux-ci sont plus nombreux dans la substance grise, répartis uniformément (Haim & Rowitch, 2017). A l'opposé des astrocytes fibreux, les astrocytes protoplasmiques possèdent de nombreuses ramifications courtes donnant naissance à de plus fines ramifications (Sofroniew & Vinters, 2010). Ces ramifications, leur permettent d'être au contact des synapses neuronales et des vaisseaux sanguins (Witcher *et al.*, 2010; Foo *et al.*, 2011). En plus de leurs différences anatomiques, ces cellules ont des fonctionnalités différentes. Par exemple, les astrocytes protoplasmiques peuvent entourer les synapses des neurones alors que les astrocytes fibreux sont en contact avec les axones au niveau des nœuds de Ranvier.

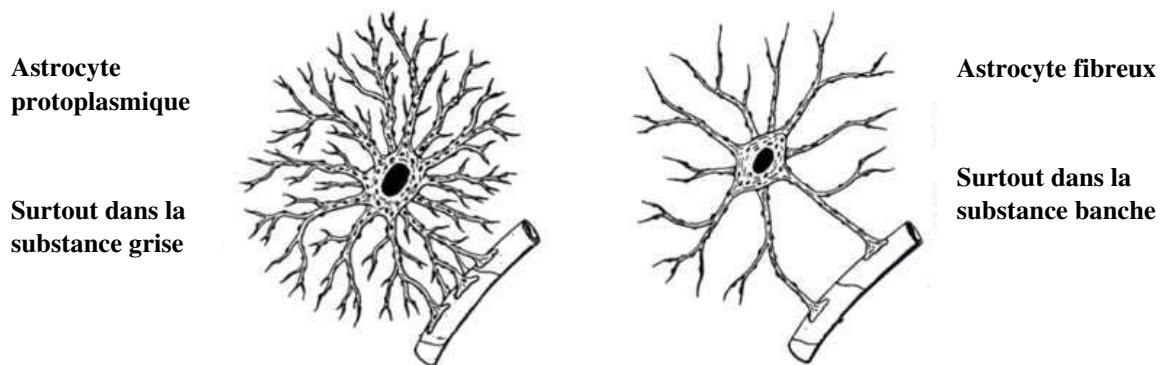


Figure 23 : Dessin représentant les astrocytes protoplasmiques et fibreux. (Tila.im, modifié).

Les astrocytes sont des cellules capables de s'activer en réponse à une infection, à la présence de cytokines inflammatoires, à l'accumulation de toxines, une ischémie ou encore une lésion du SNC, tels des cellules immunitaires (Burda & Sofroniew, 2014). Ils jouent différents rôles dans la réponse aux pathogènes, la réduction des dégâts cellulaires, la réponse inflammatoire et dans les mécanismes de régénération. Dans leurs états activés, ils peuvent être divisés en deux sous-types :

- Les astrocytes réactifs prolifératifs, formant des barrières cicatricielles entourant les tissus endommagés et contenant l'infiltration leucocytaire, la prolifération des cellules stromales et la formation de la fibrose. Ils dérivent de la prolifération d'astrocytes locaux et de progéniteurs neuraux situés dans la SVZ et le canal central (Barnabé-Heider *et al.*, 2010; Benner *et al.*, 2013; Wanner *et al.*, 2013)

- Les astrocytes réactifs non prolifératifs, conservant leur emplacement et les caractéristiques de leur structure, ainsi que leurs interactions cellulaires et leurs fonctions dans le tissu neural lorsque celui-ci n'est pas endommagé (Burda & Sofroniew, 2014). La conservation dans un tissu réactif des fonctions présentes dans un tissu sain est importante pour la protection des cellules épargnées et la limitation des dégâts tissulaires. En réponse à l'environnement réactif, les astrocytes s'hypertrophies mais continuent à interagir avec les mêmes éléments cellulaires que dans un tissu sain comme les neurones, les synapses et les vaisseaux sanguins (Sofroniew & Vinters, 2010).

La réactivité des astrocytes est nécessaire à la préservation des tissus sains et dans les mécanismes de régénération. L'inhibition de leur réactivité et de la formation de la barrière cicatricielle astrocytaire est liée à une augmentation de la diffusion de l'inflammation, de la dégénérescence neuronale, d'une incapacité à réparer la barrière hématoencéphalique et une diminution de la récupération de fonctions neurologiques (Sofroniew & Vinters, 2010). Cependant, leur exposition prolongée à des signaux de réactivités induit l'activation de facteurs de transcriptions impliqués dans les voies de signalisations pro-inflammatoires comme NF- κ B. Ils libèrent alors le *C-C Motif Chemokine Ligand 2 (CCL2)* stimulant l'infiltration leucocytaire et l'émergence d'un environnement cellulaire encore plus délétère à la survie neuronale (Brambilla *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2014).

Structure et réseau

Les astrocytes sont les cellules les plus abondantes du SNC. Elles ont un rôle très important dans la structuration des processus physiologiques, dans l'homéostasie ionique et énergétique, la transmission neurale, la synaptogenèse et la plasticité synaptique. Ils contrôlent chacun un territoire représentant un volume de $66\ 000\ \mu\text{m}^3$ (Bushong *et al.*, 2002). Sachant que la densité synaptique chez le rat est de 1 397 millions de synapses aux mm^3 , un astrocyte peut donc interagir avec 100 000 à 140 000 synapses dans son domaine (DeFelipe *et al.*, 2002). Cette quantité importante d'interactions les oblige à occuper l'espace de la manière la plus optimale. Les astrocytes possèdent une configuration en polyèdre, forme permettant d'occuper le maximum de volume dans un espace donné. En plus d'interagir avec les autres cellules du SNC, les astrocytes s'organisent entre eux sous forme d'un réseau astrocytaire appelé syncytium. Cette organisation tridimensionnelle est nécessaire au maintien structurel et à l'organisation du tissu nerveux. En effet, les astrocytes sont reliés entre eux par des jonctions gap communicantes sur la partie membranaire des extrémités distales. Ces jonctions gap composées de deux hexamères de molécules de connexines, apposées sur chacune des membranes de deux

astrocytes, forment un connexon permettant la communication cytoplasmique entre les deux cellules. Cette « ouverture » entraîne l'échange de petites molécules inférieures à 1-1.2 kDa comme des acides aminés, des métabolites, des messagers secondaires ou encore des ions K^+ , Ca^{2+} et Na^+ (Giaume, 2010). Il est même considéré que ce réseau astrocytaire serait plus complexe et ferait intervenir les cellules épendymaires et les oligodendrocytes sous la forme d'un réseau pan-gliale (**Figure 24**) (Stephan *et al.*, 2021). Il a été estimé que la moyenne de jonction gap pouvant être retrouvée sur le long de la membrane plasmique d'un astrocyte est de 30 000 (Nagy & Rash, 2003). Les connexines (Cx) surexprimées par les astrocytes sont majoritairement les Cx43 et Cx30, faisant d'elles des marqueurs d'identification astrocytaire (Giaume, 2010).

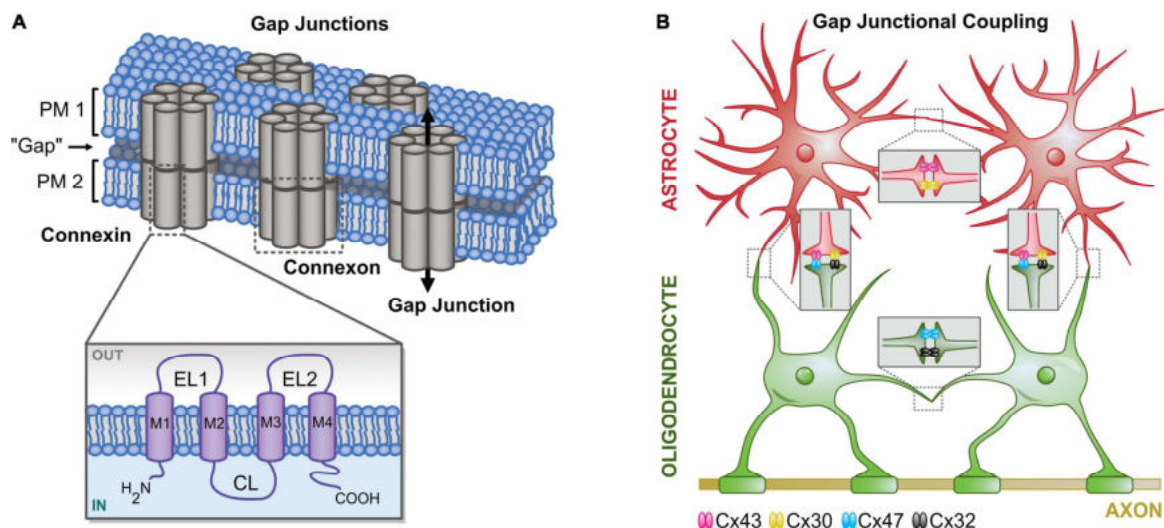


Figure 24 : Schéma représentant les interactions au sein du syncytium glial. Les astrocytes et les oligodendrocytes sont connectés et communiquent entre eux sous la forme d'un syncytium glial. Les communications entre les cellules sont permises grâce à des jonctions gap faisant intervenir des connexines (Stephan *et al.*, 2021).

L'identification de molécules permettant de différencier les cellules entre elles a toujours été un défi dans l'analyse des tissus. La protéine acide fibrillaire gliale, *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), une protéine du filament intermédiaire, est le marqueur astrocytaire du SNC depuis plusieurs décennies (Sofroniew & Vinters, 2010). Cependant, cette molécule ne permet pas d'identifier l'ensemble des astrocytes. En effet, cette molécule est essentiellement surexprimée dans les astrocytes hyper réactifs et est donc liée à l'astrogliose. De plus, cette protéine n'est pas exprimée dans l'ensemble de la cellule. On la retrouve peu exprimée dans le soma et les fines ramifications de l'astrocyte (Oberheim *et al.*, 2012). Le manque de spécificité de cette molécule, fait aussi d'elle un mauvais marqueur astrocytaire. La GFAP est exprimée

par les cellules progénitrices de la glie radiaire lors du développement, les cellules épendymaires ou encore les cellules gliales olfactives. D'autres molécules astrocytaires ont été identifiées et proposées comme marqueur d'identification. Parmi ces molécules, on retrouve la protéine s100 β qui est une protéine de lésion au Ca²⁺, l'enzyme glutamine synthétase, les transporteurs du glutamate de type 1 (GLT-1) et GLAST (*glial high-affinity glutamate transporter*) (Rothstein *et al.*, 1994; Ogata & Kosaka, 2002). Cependant des études ont montré l'absence de spécificité astrocytaire, ces molécules sont aussi sur-exprimées par les oligodendrocytes ou les neurones (Sofroniew & Vinters, 2010). Par analyse génétique et comparaison des différentes sous populations d'astrocytes, l'enzyme L1 de la famille 1 des aldéhydes déshydrogénase (Aldh1L1) a été identifiée comme marqueur astrocytaire. Cette enzyme est exprimée par l'ensemble des astrocytes et n'est pas retrouvée chez les oligodendrocytes ou encore les neurones, et à la différence de la GFAP, elle est exprimée dans l'ensemble de la cellule (Kunzelmann *et al.*, 1999; Lovatt *et al.*, 2007; Cahoy *et al.*, 2008).

Barrière hémato encéphalique – barrière hémato spinale

Le SNC en comparaison avec les autres tissus de l'organisme est isolé du reste du corps par un système de barrière. Ce système de barrière appelé barrière hémato encéphalique dans le cerveau ou hémato spinale dans la moelle spinale (On utilisera le terme *blood brain barrier* (BBB) pour désigner les deux composantes), régule les échanges entre le sang et le tissu nerveux afin de contrôler l'homéostasie de celui-ci. Ce contrôle dynamique, permet une régulation du passage du glucose, des acides aminés, des ions et des cellules immunitaires vers le SNC. A la différence des autres tissus de l'organisme, les capillaires du SNC ne sont pas fenestrés de façon que les échanges soient réalisés par voie transcellulaire plutôt que paracellulaire. Afin de permettre cette régulation et éviter la diffusion passive des composés sanguins dans le tissu, les cellules endothéliales tapissant les capillaires sont reliées entre elles par des jonctions serrées telles que : les molécules d'adhésions, *junctional adhesion molecule* (JAM) qui participent à la formation mais aussi à la maintenance des jonctions serrées, les occludines et les claudines qui permettent la régulation des jonctions au niveau de l'espace intercellulaire (Furuse, 2010). Ces complexes d'adhésion transmembranaire sont liés au cytosquelette de ces cellules par un ensemble d'adaptateurs cytoplasmiques dont font partie les protéines de jonction serrée-1, *zonula occludens-1* (ZO-1), les protéines de jonction serrée-2, *zonula occludens-2* (ZO-2), la cinguline, la protéine enroulée associée à la jonction, *junction-associated coiled-coil protein* (Jacop), la guanylate kinase associée à la membrane, *membrane*

associated guanylate kinase (MAG) et les protéines palmitoylées membranaires, *membrane palmitoylated protein* (MPPs) (Daneman *et al.*, 2010; Van Itallie & Anderson, 2013).

Peu de processus de transcytose existent dans les cellules endothéliales du SNC. Le transfert de nutriment de la circulation vers le tissu nerveux est associé à deux familles de transporteurs : les transporteurs d'efflux permettant le passage de molécules lipophiles et les transporteurs de nutriments hautement spécifiques. Ces transports sont consommateurs d'une importante quantité d'ATP, c'est pour cela que l'on retrouve une quantité de mitochondries supérieure dans les cellules endothéliales du SNC en comparaison avec celles des autres tissus (Ha *et al.*, 2007; Zlokovic, 2008; Daneman, 2012).

Une autre caractéristique de ces cellules est la présence en faible quantité de molécules d'adhésion des leucocytes, *leukocyte adhesion molecules* (LAM), limitant ainsi la propagation des macrophages ou encore des LT présents dans les espaces de Virchow-Robin vers le tissu nerveux (Huang, Upadhyay, *et al.*, 2006; Engelhardt, 2008).

Les cellules endothéliales sont entourées par de longs prolongements circonférentiels et cytoplasmiques provenant de péricytes. Ces cellules sont en étroite relation avec les cellules endothéliales grâce à des jonctions communicantes et par la libération de facteurs solubles. Le rôle des péricytes par cette communication est de réguler la prolifération, la différenciation et la migration des cellules endothéliales (**Figure 25**) (Abbott *et al.*, 2006, 2010). Elles possèdent aussi des protéines contractiles capables de modifier la lumière du capillaire et ainsi réguler le flux sanguin. Ces péricytes n'ont pas la même origine embryonnaire que ceux retrouvés dans les autres tissus. En effet ils sont originaires de la crête neurale. La proportion de cellules endothéliales/péricytes est elle aussi différente en comparaison du reste de l'organisme. Alors que dans les autres tissus elle est de 100/1, dans le SNC elle est de 3/1 à 1/1, mettant en avant leur rôle important de la régulation de l'apport sanguin dans le tissu nerveux. Ces cellules sont aussi impliquées dans la régulation de l'angiogenèse, la modulation de la matrice extracellulaire, la régénération tissulaire, l'infiltration immunitaire et même comme cellules souches multipotentes (Shepro & Morel, 1993).

Comme décrit précédemment, 99% des capillaires du SNC sont entourés par les pieds astrocytaires. La présence de molécules sur le cytosquelette des astrocytes, telle que la dystroglycane, permet l'établissement d'un complexe avec la dystrophine présente sur la membrane basale des capillaires. Ce complexe dystroglycane-dystrophine facilite alors l'établissement et la fonctionnalité de molécules canaux comme les AQP4, jouant un rôle dans

la régulation des échanges hydriques entre les capillaires et le tissu nerveux (Noell *et al.*, 2011; Wolburg *et al.*, 2011). Les astrocytes jouent un rôle dans la structuration mais aussi dans la maintenance des fonctions de la BBB, telles que l'angiogenèse, la formation des jonctions serrées et la polarisation des transporteurs membranaires des cellules endothéliales. Ces effets passent par la libération de facteurs gliaux tels que : le facteur de croissance transformant β , *transforming growth factor β* (TGF- β), le facteur neurotrophique dérivé de la glie, *glial-derived neurotrophic factor* (GDNF), le facteur de croissance des fibroblastes, *fibroblastic growth factor* (FGF) 2 et l'angiopoïétine 1 (ANG1) (Lee *et al.*, 2003). Les cellules endothéliales quant à elles, par la sécrétion du facteur d'inhibition de la leucémie, *leukemia inhibitory factor* (LIF), stimulent la différenciation des astrocytes (**Figure 25**) (Mi *et al.*, 2001; Huang, Chen, *et al.*, 2006).

La régulation du flux sanguin est généralement liée à l'activité nerveuse. Ce phénomène appelé hyperhémie, fut décrit par Sherrington en 1890 (Roy & Sherrington, 1890). La stimulation localisée des neurones induit une augmentation du Ca^{2+} dans les astrocytes à proximité et se propageant jusqu'aux pieds astrocytaires ainsi que dans les astrocytes du syncytium. Cette augmentation d'ions calciques entraîne alors la synthèse de médiateurs pro-vasodilatateurs ou pro-vasoconstricteurs modulant le diamètre des vaisseaux locaux. En effet, le glutamate relargué dans la fente synaptique, en se fixant sur les récepteurs métabotropiques du glutamate mGluR, induit la libération d'acide arachidonique (ARA) et différents métabolites liés à l'activité de la phospholipase A2 (PLA2). Par exemple, les prostaglandines (PG) et l'acide époxyeicosatriénoïque, *epoxyeicosatrienoic acid* (EET) produits par les astrocytes, permettent une vasodilatation des vaisseaux alors que l'acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque, *20-hydroxy-eicosatetraenoic acid* (20-HETE) produit aussi à partir de l'ARA par les cellules musculaires lisses entourant les vaisseaux, provoque une vasoconstriction (Attwell *et al.*, 2010). D'autres molécules liées à l'activité neuronale, agissent sur le diamètre des vaisseaux. Lors d'un signal calcique au niveau des pieds astrocytaires, on observe une libération de K^+ connue pour avoir un effet vasodilatateur tout comme la production de monoxyde d'azote, *Nitric oxyde* (NO) par l'oxyde nitrique synthase, *nitric oxide synthase* (NOS) lors de la fixation du glutamate sur les récepteurs *N-methyl-D-aspartate receptors* (NMDARs) (Attwell *et al.*, 2010).

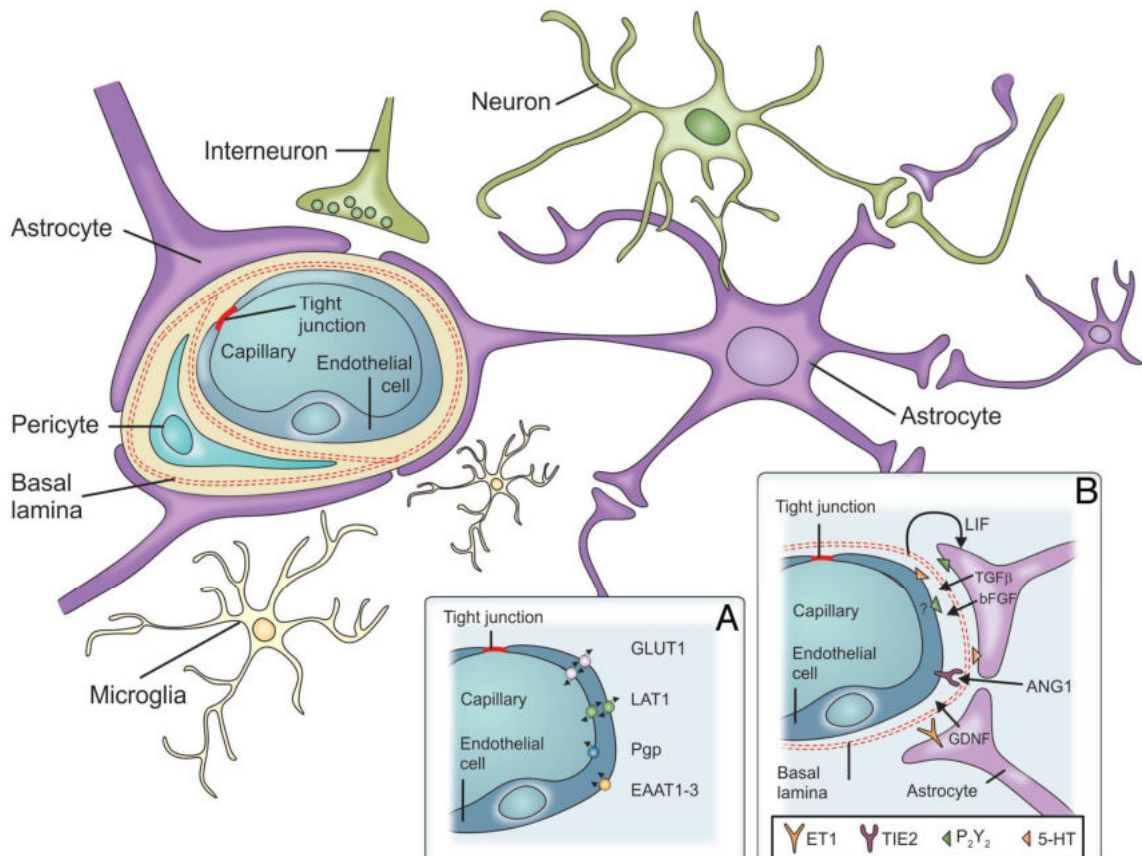


Figure 25 : Schéma représentant la formation de la barrière hémato-spinale. La BBB est composée des cellules endothéliales des capillaires sanguins, des péricytes et des pieds astrocytaires. (A) Récepteurs des cellules endothéliales modulant la perméabilité de la BBB. (B) Facteurs gliaux et leurs récepteurs agissant sur le phénotype de la BBB (Feustel, 2012).

De plus, le SNC répond constamment à la présence de toxines, de pathogènes ou de facteurs inflammatoires présents dans la circulation sanguine. C'est pour cela que la BBB est une barrière dynamique impliquant de nombreux mécanismes contrôlant la perméabilité de celle-ci afin de limiter les dégâts pouvant provoquer sa disruption qui est la cause majeure de propagation des atteintes et des maladies du SNC. Les astrocytes régulent la perméabilité de la BBB par la libération de facteurs agissant sur les cellules endothéliales. L'un des mécanismes est la libération par les astrocytes, lors de processus de guidance axonale ou d'angiogenèse, de la protéine *sonic hedgehog* (Shh) se fixant sur Patched-1, récepteur de la voie de signalisation Hedgehog, présent sur les cellules endothéliales. Cette fixation induit la production de protéines de jonction serrées par ces cellules et diminue la perméabilité de la BBB (Alvarez *et al.*, 2011). Lors de la formation ou du remodelage du réseau vasculaire, ainsi que lors de processus inflammatoire, les astrocytes libèrent le facteur de croissance endothélial vasculaire, *vascular endothelial growth factor* (VEGF) connu pour entraîner une diminution de la stabilité de la BBB (Lee *et al.*, 2007). Cependant, lorsque ce facteur de croissance est associé à la libération ANG1, molécule impliquée dans la différenciation des cellules endothéliales et diminuant la perméabilité de la BBB, on observe une augmentation de l'intégrité de la BBB. Cela met en

avant les propriétés neuroprotectrices de la combinaison de ces deux molécules (Shen *et al.*, 2011). Le TGF- β sécrété à la fois par les astrocytes et les cellules endothéliales du SNC lors de la croissance cellulaire, la différenciation, la morphogénèse ou encore l'apoptose agit sur la BBB en réduisant sa perméabilité, apportant un effet neuroprotecteur (Dohgu *et al.*, 2004).

La BBB permet une diffusion libre de certaines molécules de la circulation périphérique vers le SNC mais nécessite la présence de transporteurs pour une grande partie des molécules, en particulier les cytokines. Un ensemble de transporteurs permettant le transport de l'interleukine (IL) 1 α , l'IL-1 β (Banks *et al.*, 1991, 1994), l'antagoniste des récepteurs à l'IL-1 (IL-1ra) (Gutierrez *et al.*, 1994), l'IL-6 (Banks *et al.*, 1994), le facteur de nécrose tumorale alpha, *tumor necrosis factor* (TNF) α (Osburg *et al.*, 2002), le LIF (Pan *et al.*, 2000), et des adipokines (Pan & Kastin, 2007). Cependant d'autres cytokines telles que le TGF- α ou le TGF- β 1 ne pénètrent pas dans le SNC et s'accumulent dans les vaisseaux cérébraux (Kastin *et al.*, 2003). Cette accumulation affecte les fonctions vasculaires cérébrales en modifiant la structure des jonctions serrées ou encore la signalisation endothéliale.

Dans un contexte inflammatoire lié à l'accumulation de ces cytokines dans le parenchyme, on observe des modifications de la perméabilité de la BBB. Pour exemple, dans le SNC physiologique, le ligand 12 de la chimiokine à motif C-X-C, *C-X-C motif chemokine ligand 12* (CXCL12), connu aussi sous le nom de facteur dérivé des cellules stromales, *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1), est localisé sur la surface basolatérale des cellules endothéliales de la BBB. Cependant dans un modèle de sclérose multiple, CXCL12 est redistribué vers la lumière et active alors le récepteur de la chimiokine à motif C-X-C, *C-X-C motif chemokine receptor* (CXCR) 4 augmentant l'infiltration leucocytaire (McCandless *et al.*, 2008).

Synapse tripartite

Les astrocytes, en particulier les astrocytes protoplasmiques, sont impliqués dans la régulation des échanges synaptiques entre les neurones. En effet ils jouent un rôle important en recouvrant les synapses. Ils régulent la quantité de NT présents dans la fente synaptique et de ce fait, le PA généré dans l'élément post synaptique (Freeman, 2015). Pour exemple, il a été démontré que ces astrocytes, appelés périssynaptiques, ont la capacité de capter le glutamate par l'intermédiaire des transporteurs GLT-1 et de le transformer en glutamine. La glutamine ainsi formée est sécrétée dans le milieu extracellulaire puis captée par les neurones, leur servant alors de substrat métabolique. Ce mécanisme permet de limiter la quantité de NT se fixant sur les récepteurs post synaptiques mais aussi leur recyclage (Yang *et al.*, 2009; Tani *et al.*, 2014). Un

autre mécanisme lié à la régulation de la balance ionique du potassium dans la fente synaptique a été mis en avant. Les astrocytes périssynaptiques possèdent des transporteurs potassium rectifiant vers l'intérieur, *inwardly rectifying potassium* (Kir) 4.1, permettant l'absorption du potassium libéré par les neurones lors du PA et réduisant la réponse synaptique après stimulation neuronale (Sibille *et al.*, 2014). La présence de récepteurs métabotropiques et ionotropiques sur la membrane plasmique des astrocytes périssynaptiques leur permet une surveillance de l'activité locale. L'activation de ces récepteurs est liée à la génération d'une vague calcique dans le soma des astrocytes se propageant jusque dans leurs projections distales, mais aussi au sein du syncytium astrocytaire (Agulhon *et al.*, 2008). Il a été proposé que la génération de cette vague calcique induisait la libération de molécules neuroactives, appelées gliotransmetteurs, ayant une action directe sur la synapse, contrôlant alors la transmission synaptique basale et médian, ainsi que la plasticité neuronale (Araque *et al.*, 2014). Cependant d'autres études ont remis en cause ce mécanisme, ne permettant pas de conclure sur le rôle joué par cette vague calcique dans la modulation de l'activité neuronale (Sloan & Barres, 2014). Ce contrôle de la réponse synaptique est associé à la modulation des capacités cognitives. Le recouvrement des synapses par les astrocytes est un mécanisme dynamique lié à l'activité neuronale et qui est altéré lors de lésion du système nerveux et de différentes conditions physiologiques.

La synaptogenèse, formation de nouvelles synapses, est un processus régulé aussi par les astrocytes. Plusieurs études ont mis en avant leur implication sur la formation des synapses glutamatergiques (Ullian *et al.*, 2001), GABAergique (*γ-aminobutyric acid type A*) (Elmariah *et al.*, 2005; Hughes *et al.*, 2010), glycinergiques (Cuevas *et al.*, 2005) et cholinergiques (Carare *et al.*, 2008). L'un des premiers mécanismes de régulation astrocytaire de la formation et de la fonction des synapses identifié et celui de la synthèse de cholestérol se complexant avec l'apolipoprotéine E, *apolipoprotein E* (ApoE) (Goritz *et al.*, 2005). Ce complexe libéré dans le milieu extracellulaire est capté par les neurones, induisant une augmentation du nombre de vésicules dans la terminaison présynaptique et augmentant ainsi la probabilité de leur libération et la fonction de l'élément présynaptique (van Deijk *et al.*, 2017). Depuis, d'autres mécanismes ont été identifiés comme la libération des thrombospondines 1 et 2 (Tsp 1 et 2) et de la protéine 1 de type protéine sécrétée riche en acides et cystéine, *secreted protein acidic and cysteine rich like 1* (SPARCL1) appelé aussi hevin, contrôlant la formation de la structure des synapses glutamatergiques ainsi que son antagoniste SPARC (Christopherson *et al.*, 2005; Kucukdereli *et al.*, 2011). Ou encore par la sécrétion des héparanes sulfates protéoglycanes glypicanes 4 et

6, *heparan sulfate proteoglycans glypican 4 and 6* (Gpc 4 and 6) qui régulent positivement le nombre et la localisation des récepteurs α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate receptors (AMPA) sur les éléments terminaux postsynaptiques nouvellement formés, favorisant alors leur excitabilité (Allen *et al.*, 2012). Ces régulations peuvent être dépendantes du type de synapse, en effet la libération du TNF- α favorise la quantité de récepteurs AMPA sur les synapses excitatrices alors qu'il diminue la quantité de récepteurs GABA_A dans les synapses inhibitrices. Ce rôle ambivalent entraîne une augmentation globale de l'activité neuronale et est impliqué dans le maintien homéostatique de l'activité du réseau neuronal (**Figure 26**) (Stellwagen *et al.*, 2005; Stellwagen & Malenka, 2006).

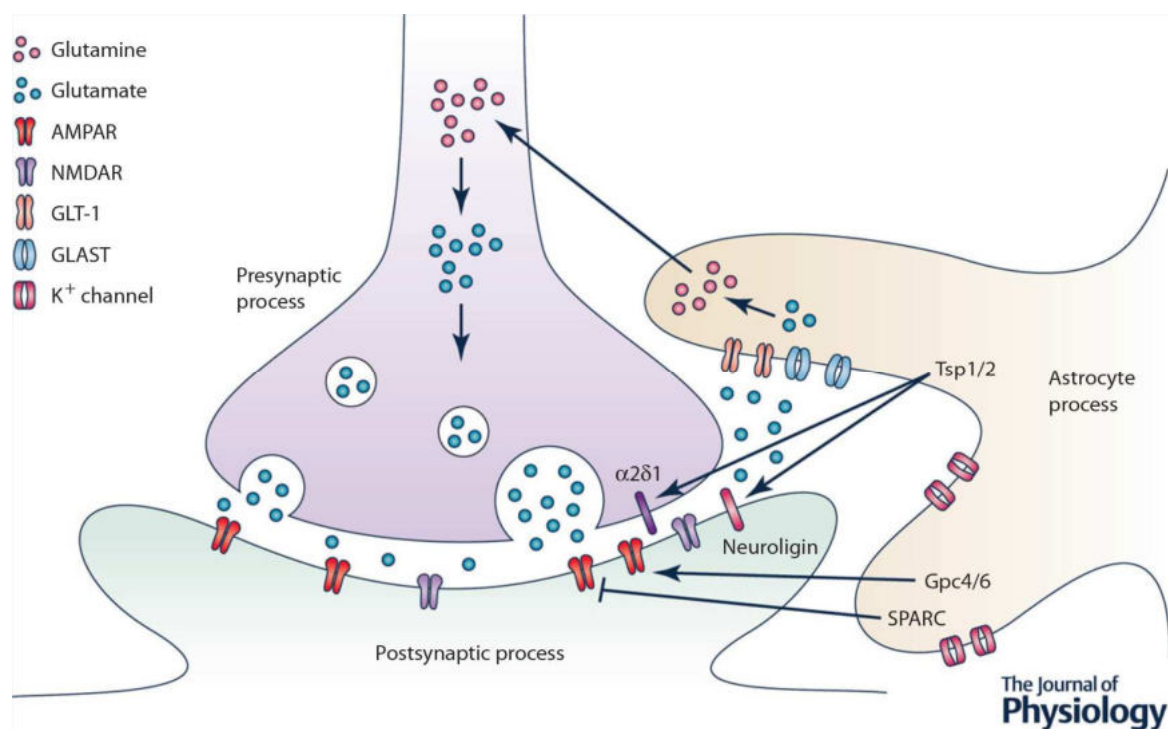


Figure 26 : Représentation schématique de la synapse tripartite. Les astrocytes participent à la régulation de la communication synaptique entre les neurones. Les Tsp 1 et 2 en se fixant sur les récepteurs $\alpha\delta 1$ et neurologin, induisent une modulation de la structure de la synapse. Les Gpc 4 et 6 ainsi que les SPARC ont le même rôle, en se fixant sur les récepteurs AMPA. Respectivement, ils activent et inhibent la formation et la stabilité des synapses. Les astrocytes, par l'intermédiaire des transporteurs glutamatergiques GLT-1 et GLAST, ils captent le glutamate présent dans la fente synaptique limitant ainsi son accumulation. Il est ensuite transformé en glutamine et libéré dans le milieu extracellulaire afin que les neurones puissent l'utiliser à nouveau comme substrat dans la synthèse de glutamate. La présence de canaux potassiques sur les astrocytes, induit l'entrée du K^+ , libéré par les neurones lors du PA, dans ces cellules. La diminution du K^+ dans la fente synaptique permet une diminution de la réponse synaptique après stimulation (Blanco-Suarez *et al.*, 2016).

L'une des étapes importantes du développement de nouvelles synapses, est l'élimination des synapses superflues. Lors du développement cérébral, les astrocytes ont la capacité de phagocyter les synapses inutiles par l'intermédiaire de leurs récepteurs tyrosine kinase

myéloïde-épithéliale-reproductrice, *myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase* (mertk) et de la protéine à plusieurs domaines de type facteur de croissance épidermale, *multiple epidermal growth factor-like domains protein 10* (megf10) (Chung *et al.*, 2013). Ils peuvent aussi réguler cette élimination de façon indirecte, en libérant le TGF- β 1 stimulant la production du complément composante 1, sous composante Q, *complement component 1, subcomponent Q* (C1q) par les neurones. Cette molécule induit un « marquage » synaptique d'élimination, permettant aux cellules microgliales de les phagocyter (Bialas & Stevens, 2013).

Ces interactions astrocytes-synapses sont nécessaires à la plasticité cérébrale. Dans le cerveau adulte, la force et le nombre des synapses résultent de l'apprentissage et des expériences vécues. Il a été proposé que les astrocytes jouent un rôle important dans ce processus. En effet, des études sur des préparations de coupes hippocampiques à partir de souris KO pour les gènes SPARC et TNF- α afin d'étudier la plasticité synaptique ont été réalisées. Ces études ont mis en avant que la capacité des synapses à induire une potentialisation à long terme, *long term potentiation* (LTP) dans les préparations réalisées à partir de souris SPARC KO, était diminuée (Jones *et al.*, 2011). Les études sur les préparations réalisées à partir des souris TNF- α KO, ont identifié qu'il n'y avait pas de modification de la capacité à générer de LTP et de dépression à long terme, *long term depression* (LTD), mais que la force synaptique n'était pas augmentée malgré une privation prolongée de l'activité (Stellwagen & Malenka, 2006). Ces expériences décrivent le rôle important et nécessaires des astrocytes dans la plasticité du cerveau adulte et dans l'induction des mécanismes nécessaires à l'apprentissage et la cognition.

c. Cellules épendymaires

Les cellules épendymaires sont les cellules tapissant les parois du 3^{ème} et du 4^{ème} ventricule dans le cerveau et du canal central dans la moelle spinale. Comme décrit dans la partie « Le système ventriculaire », les cellules épendymaires sont des cellules multi-ciliées qui permettent la propulsion du LCS et garantissent l'homéostasie du SNC. Elles ont cependant d'autres rôles, comme la formation d'une barrière physique entre le LCS et le parenchyme nerveux ainsi que comme niche de NSC endogènes. Dans cette section, nous allons particulièrement nous intéresser aux cellules épendymaires du canal central.

A l'âge adulte, le canal central est entouré d'un épithélium pseudo stratifié, constitué des cellules épendymaires. Ces cellules ont la capacité de s'auto-renouveler afin de réaliser la maintenance de l'interface entre le LCS et le parenchyme nerveux. Il est à noter que la

distribution des cellules épendymaires prolifératives est asymétrique. On observe trois fois plus de cellules prolifératives au niveau dorsal qu'au niveau ventral, conduisant à l'établissement d'un gradient dorso-ventral autour du canal central (Hamilton *et al.*, 2009). Cette différence s'expliquerait par une vascularisation plus importante en partie dorsale. En effet, des études au niveau de la zone sous épendymaire, *subependymal zone* (SEZ), ont mis en avant une corrélation entre la densité du réseau vasculaire et le taux de prolifération des précurseurs neuronaux (Shen *et al.*, 2008; Hamilton *et al.*, 2009). Cependant en comparaison des cellules de la zone sous ventriculaire (SVZ), au contact du LCS dans le cerveau, celles du canal central se divisent peu et ne génèrent aucun autre type cellulaire en absence de lésion médullaire (Horner *et al.*, 2000; Meletis *et al.*, 2008; Barnabé-Heider *et al.*, 2010).

On considère comme cellules épendymaires, les cellules présentes à la fois au contact de la lumière du canal central mais aussi celles résidant dans la « pseudo » SEZ. Cette zone est considérée comme « pseudo » car à la différence de la zone sous ventriculaire des ventricules cérébraux, il n'existe pas de SEZ dans la moelle spinale, sa délimitation a donc été réalisée arbitrairement (Hamilton *et al.*, 2009). Les cellules épendymaires sont des cellules hautement polarisées présentant de nombreux cils motiles et des microvillosités (Jiménez *et al.*, 2014). Grâce à l'analyse par microscopie électronique, l'équipe de Jonas Frisé, a pu décrire l'aspect morphologiquement hétérogène, et a pu distinguer trois sous types de cellules épendymaires :

Les cellules épendymaires cuboïdes, majoritaires au sein de l'épithélium du canal central. Ces cellules sont caractéristiques par leur cytoplasme très clair, dépourvu d'extension et arborant 1 à 3 cils.

Les tanocytes en proportion quasi-équivalente, possèdent des caractéristiques proches des tanocytes de la SVZ. Ils ont un cytoplasme foncé, une extension cytoplasmique et ne possèdent qu'un seul cil. La dénomination de tanocyte n'est pas acceptée par l'ensemble de la communauté scientifique. En effet, le nom tanocyte décrit des cellules au contact du système ventriculaire et possédant de longues extensions radiaire jusqu'à des vaisseaux sanguins. Au sein de la moelle épinière, les longs prolongements de ces cellules ne vont pas jusqu'à des vaisseaux sanguins, on peut alors parler de « tanocyte-like » (Mothe & Tator, 2005).

Les cellules épendymaires radiaires présentent en quantité moindre, ont des caractéristiques proches des cellules épendymaires cuboïdes mais possèdent de longues extensions cytoplasmiques basales orientées le long de l'axe dorso-ventral (**Figure 27**) (Meletis *et al.*, 2008).

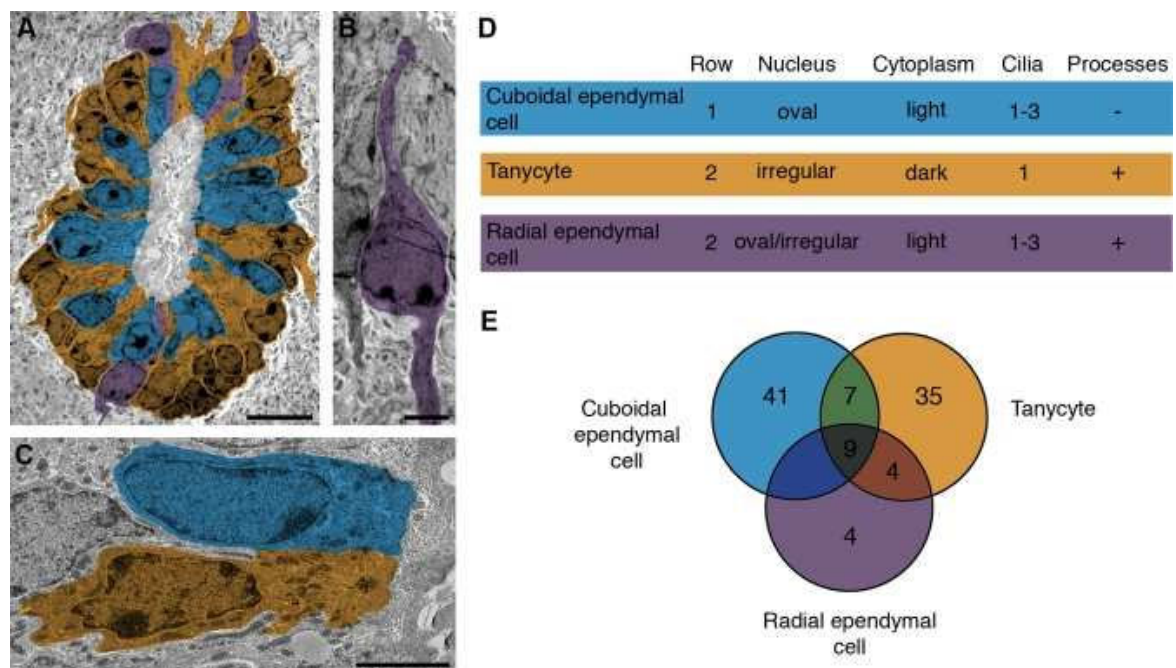


Figure 27 : Photo prise par microscopie électronique du canal central. (A-C) Microscopie électronique du canal central chez une souris. (A) Pseudo coloration illustrant la disposition des cellules autour du canal central, (B) les cellules épendymaires radiaires, (C) les cellules épendymaires cuboïdes et les tanocytes. (D) Caractérisation en microscopie électronique des cellules du canal central et les pseudos couleurs associés. (E) Diagramme illustrant la proportion de cellules épendymaires cuboïdes, de tanocytes, de cellules épendymaires radiaires et les cellules à morphologie intermédiaire (Meletis et al., 2008).

La région du canal central contient aussi des neurones au contact du LCS appelés *cérébrospinal fluid contacting neurons* (CSF-cNs). Ils expriment les marqueurs cellulaires tels que : la molécule d'adhésion des cellules neurales polysialylées, *Polysialylated-neural cell adhesion molecule* (PSA-NCAM), la protéine de migration neuronale doublecortine, *doublecortin* (DCX), la protéine associée à la croissance 43, *growth associated protein 43* (GAP43) et les protéines HuC/HuD (Marichal *et al.*, 2009; Hugnot, 2012). Ces cellules possèdent de longs prolongements cytoplasmiques uniques semblables à une dendrite, se projetant dans la lumière du canal central, et se terminant par un large renflement (Sabourin *et al.*, 2009). Ces neurones, en contact direct avec le LCS, participent à son homéostasie en régulant sa composition en réponse aux changements d'osmolarité et de pH (Huang, Chen, *et al.*, 2006; Marichal *et al.*, 2009). Leur étude chez le poisson zèbre a révélé un autre de leurs rôles. Par leurs prolongements, ils ont la capacité de détecter les variations de flux du LCS en réponse aux déformations de la queue du poisson et de moduler la locomotion. En effet, ce sont des neurones sensoriels GABAergiques inhibant l'activité des interneurones gabaergiques V0-v impliqués dans la transmission des informations locomotrices jusqu'au *central pattern generator* (CPG), responsable de la locomotion. Ils possèdent aussi la capacité d'agir sur les neurones V2a de la formation réticulée, impliquée, elle aussi, dans la locomotion. Ces travaux

mettent en lumière l'importance de ces neurones dans le contrôle de la locomotion et de la rythmicité du mouvement de la queue du poisson zèbre (Fidelin *et al.*, 2015; Böhm *et al.*, 2016).

La réalisation de marquages immunohistochimiques avec la GFAP, a mis en évidence la présence d'astrocytes dans le canal central, décrits comme « astrocyte *contacting cells* » du fait de leur contact avec le LCR circulant dans le canal central, et aussi dans la SEZ (Hamilton *et al.*, 2009; Alfaro-Cervello *et al.*, 2012). Une partie de ces astrocytes, en particulier dans la partie dorsale, expriment le marqueur des cellules souches, la protéine nestine (Fiorelli *et al.*, 2013). Fait intéressant, cette population a un phénotype assez proche des cellules de type B1 de la zone sous ventriculaire du cerveau, du fait de leur forte expression de GFAP et du facteur de transcription HES1 (*hairy and enhancer of split-1*), ainsi que par la présence d'un unique cil (Hugnot, 2012; Fiorelli *et al.*, 2013).

Il a aussi été décrit par marquage immunohistochimique du facteur de transcription Olig 2 et de l'antigène neural/gliial 2, *neural/gliial antigen 2* (NG2), la présence d'OPC dans la SEZ (Meletis *et al.*, 2008; Barnabé-Heider *et al.*, 2010).

Plusieurs études se sont intéressées à caractériser les marqueurs exprimés par les cellules épendymaires. Il a été mis en avant que ces cellules expriment nestine, en particulier en partie dorsale (Frisén *et al.*, 1995; Meletis *et al.*, 2008). Ces cellules, comme les cellules épendymaires du cerveau, expriment la vimentine et la protéine B de liaison au calcium S100, *s100 calcium-binding protein B* (S100 β) (Hamilton *et al.*, 2009). L'identification des marqueurs Mushashi1, CD133/prominine, CD15, Sox2, Sox3 et Sox9, correspondant à des marqueurs associés aux progéniteurs cellulaires ou aux cellules neurales immatures du cerveau, a conforté la considération des cellules épendymaires comme NSC. Des cultures *in vitro* de neurosphères, réalisées initialement à partir d'un segment thoracique (Weiss *et al.*, 1996) entier puis à partir de coupes épaisses d'un segment cervical, ont permis d'identifier le caractère d'auto renouvellement des cellules présentes au niveau du canal central (**Figure 28**) (Martens *et al.*, 2002). Les neurosphères sont des « amas » cellulaires provenant de la division symétrique d'une ou de quelques cellules souches. Elles ont la capacité de se différencier en l'absence de facteurs de croissances et en présence de sérum de veau fœtal, en astrocytes, oligodendrocytes et neurones. L'identification du potentiel d'auto-renouvellement et de différenciation en plusieurs types cellulaires possédant les caractéristiques phénotypiques de l'organe dont elles sont issues, a permis de mettre en avant le caractère de cellules souches multipotentes des cellules épendymaires (Hall & Watt, 1989). Leur capacité à se différencier est différente *in vitro* et *in vivo*. La différenciation des neurosphères permet l'obtention à la fois d'astrocytes,

d'oligodendrocytes et de neurones, alors que *in vivo*, après une lésion de la moelle spinale, elles se différencient seulement en astrocytes et en oligodendrocytes. Cela peut s'expliquer par la différence des interactions cellulaires et moléculaires *in vivo* et *in vitro*, mais aussi par l'hétérogénéité du canal central. De récentes études ont mis en avant la présence d'une population de cellules épendymaires exprimant le récepteur TROY. Ces cellules, plus abondantes dans la partie dorsale du canal central, comptent pour 8% des cellules épendymaires. La réalisation de neurosphères à partir de moelles spinales de souris transgéniques permettant le suivi des cellules exprimant TROY, a permis de mettre en avant leurs rôles dans la génération de neurones. Cette discrète population de cellules souches neurales, pourrait donc être celle à l'origine des neurones obtenus après différenciation des neurosphères réalisées à partir de moelle *in vitro*. Cependant, au contraire des autres cellules épendymaires, après une lésion, elles se différencient et acquièrent un état semblable à celui des cellules souches (Stenudd *et al.*, 2022)

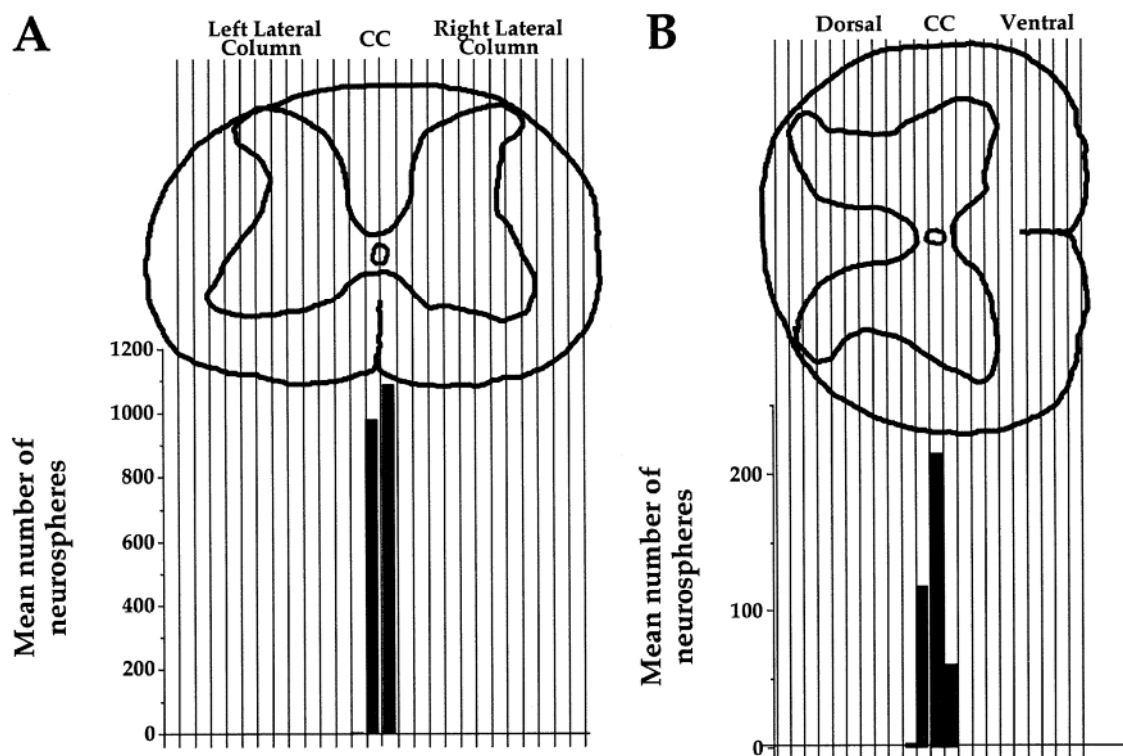


Figure 28 : Représentation des coupes réalisées pour la culture de neurosphères et l'identification des zones médullaires ayant un potentiel souche. Les coupes ont été réalisées en suivant deux axes. (A) Sections coupées de gauche à droite. (B) Sections coupées de la face dorsale à la face ventrale (Martens *et al.*, 2002).

d. Microglie

Les cellules microgliales ou microglie, sont les cellules « immunitaires » du SNC. Cette caractéristique leur a été donnée du fait de leur ressemblance avec les macrophages périphériques. Leur origine particulière et leurs fonctions ne s'arrêtant pas seulement aux fonctions immunitaires, font de la microglie, des cellules très importantes pour le SNC. Elles sont impliquées dans le développement, l'homéostasie et s'activent lors de perturbations du système nerveux central.

A l'âge adulte, les cellules microgliales représentent 10 à 15% des cellules gliales. Composées d'un petit corps cellulaire, ces cellules sont immobiles mais la présence d'une quantité importante de ramification leur confère un rôle important dans la régulation homéostatique. En effet, ces longues ramifications permettent à ces cellules de « scanner » l'ensemble de leur environnement mais aussi de communiquer directement avec les neurones, les astrocytes et les vaisseaux sanguins (Ginhoux *et al.*, 2010; Greter & Merad, 2013).

Origine

A la différence des autres cellules gliales, les cellules microgliales ne sont pas originaires de l'ectoderme mais du sac vitellin. Cela a été mis en avant la première fois en 1993 par Cuadros et son équipe en réalisant une chimère à partir d'un embryon de poulet et le sac vitellin d'une caille. Par la réalisation de marquages immunohistochimiques, utilisant des anticorps spécifiques des cellules sanguines de cailles, les auteurs ont pu identifier que les « macrophages » (cellules microgliales) du SNC n'ont pas la même origine que les macrophages périphériques (Cuadros *et al.*, 1993). Cette découverte a été confirmée par une seconde étude en 1999 par Alliot et son équipe. Grâce à l'identification de précurseurs des cellules microgliales présents dans le sac vitellin, les auteurs ont mis en avant que la microglie commençait à coloniser le cerveau à partir du 9^{ème} jour embryonnaire chez la souris et que leur nombre continuait d'augmenter jusqu'à la deuxième semaine post-natale (Alliot *et al.*, 1999). Enfin une étude plus récente, utilisant des lignées de souris transgéniques KO pour le gène *myb*, codant pour un facteur de transcription nécessaire à l'hématopoïèse, a confirmé les résultats précédents. En effet chez ces souris alors que la mise en place des lignées cellulaires provenant de l'hématopoïèse est perturbée, on observe aucun effet sur les cellules microgliales (**Figure 29**) (Schulz *et al.*, 2012).

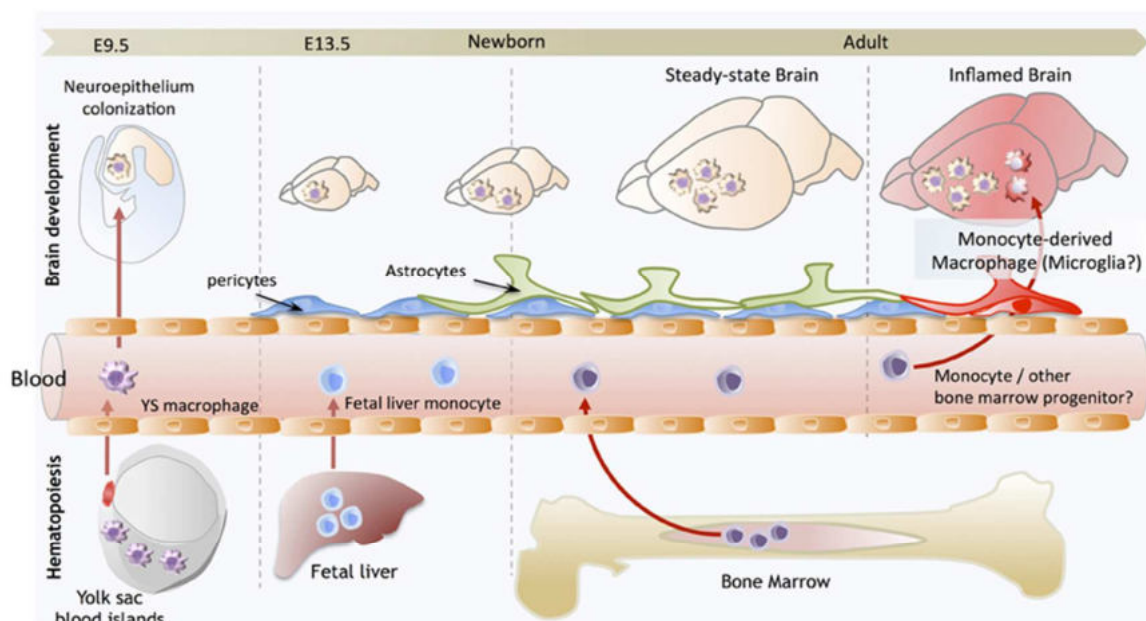


Figure 29 : Chronologie de la colonisation de SNC par les cellules microgliales et les macrophages chez la souris. A partir du 9^{ème} jour embryonnaire les cellules microgliales quittent le sac vitellin et colonisent le neuroépithélium et le SNC en développement. La formation des premiers monocytes débute dans le foie fœtal au 13^{ème} jour embryonnaire. Après la naissance les monocytes sont générés dans la moelle osseuse. En condition physiologique, on les retrouve en faible quantité dans le SNC. Cependant lors d'atteintes et de pathologies du SNC, l'inflammation du tissu conduit à leur infiltration (Ginhoux et al., 2013).

Fonctions

L'un des principaux rôles physiologiques de la microglie est la régulation de l'homéostasie du SNC. Cette balance des constantes cellulaires et moléculaires de l'organisme est en perpétuel mouvement et nécessite donc un contrôle permanent. La régulation des populations neurales et des synapses par les cellules microgliales en est un bon exemple. En effet, par l'intermédiaire de récepteurs exprimés à leur surface ou par la sécrétion de molécules, elles ont la capacité d'influencer la survie et le devenir des cellules, la régulation des synapses et la plasticité synaptique, y compris sur les LTP et les LTD.

Fonction : Communication neuronale et phagocytose

Les cellules microgliales libèrent des facteurs trophiques permettant d'induire la survie des neurones et le bon fonctionnement des circuits neuronaux. Le facteur de croissance analogue à l'insuline-1, *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) produit par ces cellules, joue un rôle important dans le développement post-natal des neurones. Des chercheurs ont préalablement identifié la colocalisation des cellules microgliales avec l'IGF-1 au niveau de la couche corticale V puis ont inhibé la microglie. Ils ont mis en avant que lorsqu'elle était inhibée on observe la mort des neurones présents dans cette couche corticale (Ueno *et al.*, 2013).

D'autres implications de l'IGF-1 ont été observées telles que l'induction de la différenciation des cellules progénitrices neurales en oligodendrocytes (Hsieh *et al.*, 2004) ou encore la protection des oligodendrocytes contre l'apoptose induit par le glutamate (Ness & Wood, 2002). La microglie sécrète aussi un ensemble d'autres facteurs trophiques nécessaires au développement neuronal, à la maintenance et à la fonction du système nerveux central tout au long de la vie. Parmi ces facteurs trophiques, on retrouve le facteur de croissance des hépatocytes, *hepatocyte growth factor* (HGF), le facteur de croissance épidermique, *epithelial growth factor* (EGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes, *platelet-derived growth factor* (PDGF), le facteur de croissance des nerfs, *nerve growth factor* (NGF), le facteur neurotrophique dérivé du cerveau, *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) et le FGF (Araujo & Cotman, 1992; Yamagata *et al.*, 1995; Nakajima *et al.*, 2001; Trang *et al.*, 2011). Le BDNF en plus de son effet trophique sur les neurones, participe aussi à la modulation de la transmission synaptique. Dans le cortex adulte, le BDNF induit l'augmentation de la plasticité dendritique par l'intermédiaire de la voie de signalisation (phosphoinositide 3-kinase) PI3K/BDNF (Chen *et al.*, 2017; Rauti *et al.*, 2020). Le BDNF, produit par les cellules microgliales, se fixe aux récepteurs de la tropomyosine kinase B, *tropomyosin receptor kinase B* (TrkB) présent sur les neurones. La fixation induit l'activation de PI3K et la phosphorylation de la protéine kinase B (PKB) qui phosphoryle et active à son tour, la protéine de liaison aux éléments de réponse C-AMP, *C-AMP Response Element-binding protein* (CREB), protéine importante dans l'induction des LTP nécessaires à l'apprentissage et à la mémoire, donc à la plasticité synaptique (Li, Xue, *et al.*, 2020). De ce fait il a été mis en avant que l'augmentation de la quantité de BDNF est corrélée à l'augmentation de l'activité de PI3K (**Figure 30**) (Saw *et al.*, 2020).

La communication entre neurones et cellules microgliales est importante afin de réguler l'activité neuronale. L'une des molécules impliquées dans cette régulation est le récepteur purinergique P2RY12. Ce récepteur fixant les molécules d'ATP est un senseur de l'activité neuronale. Lors de l'activité synaptique, les neurones libèrent de l'ATP se fixant sur les récepteurs P2RY12 (Sipe *et al.*, 2016; Peng *et al.*, 2019). L'ATP est alors dégradée en adénosine (ADO) par l'intermédiaire des clusters de différenciation (CD) 39 et 76, puis libéré au contact des neurones permettant d'inhiber l'activité neuronale par l'intermédiaire du récepteur à l'adénosine 1 (A1R) présent sur les neurones. Cette inhibition prévient l'hyperactivation des neurones et limite ainsi le risque de dommages neuronaux, de mort cellulaire et de pertes

synaptiques. Cette boucle de régulation est appelée ATP-AMP-ADO-A1R (**Figure 30**) (Badimon *et al.*, 2020).

L'induction de la mort neuronale et l'élimination des débris cellulaires sont deux mécanismes nécessaires au développement et à la maintenance du SNC. Même si c'est lors du développement embryonnaire que l'élimination des neurones immatures est la plus importante, représentant 50 % des neurones, dans le SNC adulte ce mécanisme est toujours présent.

Lors du développement, les neurones sont éliminés ou conservés en fonction de leur importance et de leur intégration dans le réseau neuronal. Cette élimination se fait par l'induction de facteurs intrinsèques à la cellule mais aussi par induction cellulaire par la microglie. Pour exemple chez le poulet, lors du développement de l'œil, les cellules microgliales en libérant du NGF induisent l'élimination des neurones rétinaux par apoptose (Frade & Barde, 1998). Tout comme dans l'hippocampe ou dans le cervelet en développement où il a été mis en avant que les neurones sont inhibés par le CD11b et la protéine d'activation DNAX 12, *DNAX-Activation Protein 12* (DAP12) présente à la surface des cellules microgliales (Marín-Teva *et al.*, 2004; Wakselman *et al.*, 2008). DAP12 est une protéine importante dans la voie de signalisation de la phagocytose non inflammatoire. Les cellules microgliales expriment à leur surface le récepteur de déclenchement exprimé sur les cellules myéloïdes 2, *triggering receptor expressed on myeloid cells 2* (TREM2). Lorsque ce récepteur est activé par son ligand (TREM-L) présent à la surface des astrocytes (Stefano *et al.*, 2009) et des neurones (Hsieh *et al.*, 2009), on observe une cascade de signalisation passant par la phosphorylation d'un motif d'activation immuno-tyrosine, *immuno-tyrosine activation motif* (ITAM) présent sur DAP12. Cette phosphorylation induit alors la mobilisation du Ca²⁺ présent dans la cellule, la phosphorylation des kinases extracellulaires régulées par le signal, *extracellular signal-regulated kinases* (ERK) et le remodelage de l'actine (Takahashi *et al.*, 2005). Cette voie d'activation de la phagocytose est considérée comme non inflammatoire, en effet lorsque les *toll like receptor* (TLR) sont activés on observe une régulation négative des TREM2. A l'inverse, lorsque TREM2 est activé, le potentiel pro-inflammatoire des cellules microgliales est inhibé. Son activation est liée à une inhibition de l'expression des gènes du TNF- α , de l'IL-1 β et de NOS2 (**Figure 30**) (Ford & McVicar, 2009).

D'autres mécanismes de régulation de la mort neuronale et de la phagocytose des corps cellulaires ont été identifiés. Lors de leur mort, les neurones expriment et libèrent le CX3CL1 (appelé aussi fractalkine). Le CX3CL1 existe sous deux formes : membranaire et soluble. La forme soluble est produite à partir de la forme membranaire après clivage par les

métalloprotéases, *a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein* (ADAM) 10 et 17 (Garton *et al.*, 2001; Hundhausen *et al.*, 2003). Cette chimiokine se fixe au récepteur appelé globule de matière grasse du lait E8, *Milk-Fat Globule E8* (MFG-E8) des cellules microgliales. Cette fixation induit alors l'activation de la phagocytose des neurones (Noda *et al.*, 2011). Le CX3CL1 joue aussi un rôle très important dans la régulation de la synaptogenèse lors de développement mais aussi dans le SNC adulte, permettant ainsi une plasticité synaptique. Ce mécanisme appelé « *pruning* » a pour but d'éliminer les réseaux neuronaux défectueux, redondants, excessifs ou inutiles afin d'établir un réseau fonctionnel (Paolicelli *et al.*, 2011). Les cellules microgliales expriment à leur surface le récepteur du CX3CL1, le *C-X3-C chemokine receptor 1* (CX3CR1). Ce récepteur à 7 domaines transmembranaires de classe A, couplé à une protéine G, permet une communication entre les neurones et les cellules microgliales nécessaire pour un ensemble de fonctions.

Par différentes approches, comme l'utilisation de souris transgéniques déficientes pour le CX3CR1, il a été mis en évidence que la perturbation de cette communication était liée à un développement cérébral anormal (Paolicelli *et al.*, 2011), des perturbations du comportement social (Zhan *et al.*, 2014), une suractivation des cellules microgliales (Hellwig *et al.*, 2016), une diminution de la neurogenèse (Sellner *et al.*, 2016), une altération de la mémoire et du comportement émotionnel (Rogers *et al.*, 2011; Yirmiya *et al.*, 2015; Hellwig *et al.*, 2016), une réponse anormale aux stimulations (Milior *et al.*, 2016) et des défauts de la plasticité synaptique (Rogers *et al.*, 2011; Bolos *et al.*, 2018). Des expériences *in vitro* de cultures microgliales stimulées avec du lipopolysaccharide (LPS) et de l'interféron- γ (IFN- γ), afin de stimuler la libération de TNF- α , IL-1 β , IL-6 et de NO, ont permis d'identifier le rôle anti-inflammatoire de la communication CX3CL1-CX3CR1. Après ajout de CX3CL1 soluble, les auteurs ont observé une diminution de la libération de cytokines pro-inflammatoires (Zujovic *et al.*, 2000; Mizuno *et al.*, 2003). Cet effet anti-inflammatoire protecteur a été confirmé dans une étude *in vivo* plus récente dans un modèle murin mimant la maladie de Parkinson. Après avoir induit la maladie dans des souris CX3CL1 $^{-/-}$, l'injection d'*adeno-associated virus* (AAV) exprimant le CX3CL1 a permis de réduire la réponse inflammatoire liée à la pathologie en diminuant la libération de TNF- α et IL-1 β , et ainsi limitant l'activation des cellules microgliales identifiées par le CD68 (Morganti *et al.*, 2012). La quantité de CX3CL1 présente dans le cerveau diminue avec l'âge, possiblement liée à la dégénérescence des neurones. Cette diminution est corrélée avec une augmentation d'IL-1 β et une diminution de la neurogenèse hippocampique (Wynne *et al.*, 2010). En effet l'IL-1 β induit une diminution de la survie et de la prolifération des progéniteurs

neuronaux. Il a été démontré que l'administration de CX3CL1 chez des rats âgés a permis de renverser la diminution de la neurogenèse liée à l'âge, et à l'inverse, le blocage du CX3CR1 chez des souris jeunes entraîne l'augmentation d'IL-1 β et perturbe alors la neurogenèse hippocampique (Bachstetter *et al.*, 2011; Rogers *et al.*, 2011). En effet, dans le SNC physiologique, la balance entre cytokines pro- et anti-inflammatoires est importante pour le contrôle de la plasticité synaptique. Un déséquilibre de cette balance entraînant une augmentation des cytokines pro-inflammatoires, en particulier le TNF- α et IL-1 β , et est corrélé à une perturbation de la plasticité synaptique (Golia *et al.*, 2019). L'augmentation du TNF- α induit une augmentation brève du LTP et de l'hyperexcitabilité délétère pour les neurones et les synapses. Une étude utilisant des rats transgéniques sur-exprimant le TNF- α , a confirmé l'effet négatif de cette cytokine sur les performances cognitives. Lors de la réalisation du test de la piscine de Morris, les performances des rats transgéniques sont inférieures à celle des rats témoins, mais sans observation de mort neuronale dans le cortex ou l'hippocampe (**Figure 30**) (Pettigrew *et al.*, 2016).

Lors de condition particulière, ces mécanismes de communication sont à l'origine de phénomènes douloureux d'allodynie (diminution du seuil d'activation des récepteurs nociceptifs) et d'hypersensibilisation (augmentation de la réponse douloureuse).

Fonction : Plasticité synaptique

Le « pruning » axonal est aussi régulé par l'intermédiaire d'un autre mécanisme faisant intervenir le système du complément. Dans le SNC les protéines du complément C1q et C3 se lient aux synapses immatures, faiblement développées ou apoptotiques, afin de permettre leur élimination. En effet, les cellules microgliales possèdent à leur surface le récepteur CR3 reconnaissant C1q et C3. Cette reconnaissance induit un signal de la synapse vers la microglie appelé « EAT ME » qui favorise alors l'engloutissement de la synapse et son élimination par la cellule microgliale (Fonseca *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019).

En contraste du signal « EAT ME », il existe des molécules induisant un signal de protection des synapses appelé « DON'T EAT ME ». Parmi ces molécules, on retrouve les CD47 et CD200 qui sont deux protéines exprimées à la surface des synapses actives. Elles sont reconnues respectivement par la protéine alpha de régulation du signal, *signal-regulatory protein alpha* (SIRP α) et le récepteur du CD200 (CD200R) exprimés à la surface des cellules microgliales (Sato-Hashimoto *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2020). Les interactions entre ces récepteurs et leur ligand est donc très important pour le devenir de la synapse et résultent donc

d'un équilibre entre signaux « EAT ME » et « DON'T EAT ME ». Dans les cellules apoptotiques, le signal « DON'T EAT ME » est diminué, favorisant alors l'élimination de la synapse par l'intermédiaire du système du complément (**Figure 30**) (Lehrman *et al.*, 2018).

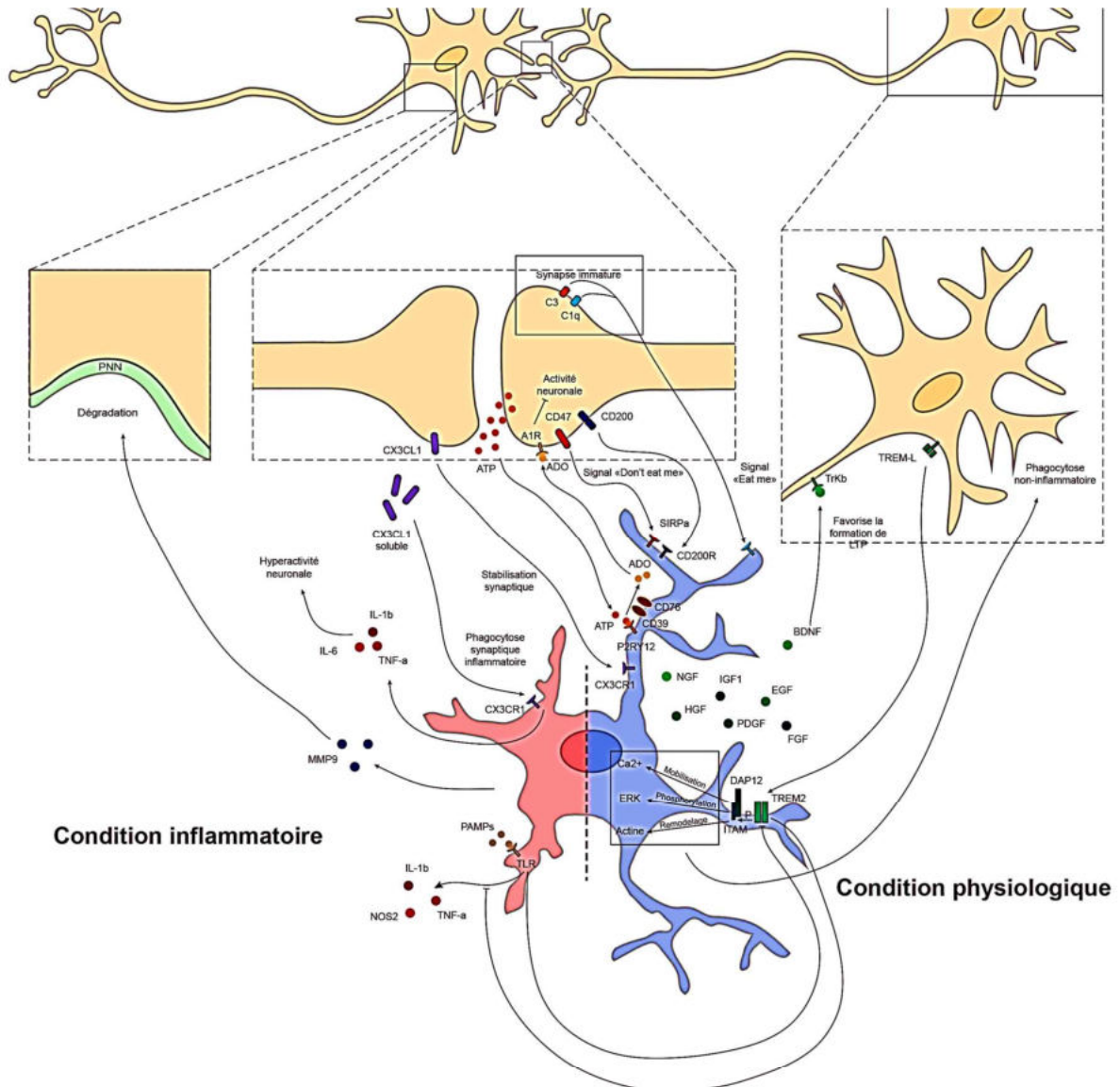


Figure 30 : Représentation schématique la communication entre les cellules microgliales et les neurones. Les cellules microgliales et les neurones sont en communication permanente. En fonction du micro-environnement et de l'état d'activation des cellules microgliales, des voies de communication différentes seront impliquées.

2. Encéphale

Dans cette section nous allons seulement nous intéresser à trois structures de l'encéphale : les BOs, la zone sous ventriculaire et l'hippocampe. Ces trois structures ont la particularité d'être neurogéniques dans le cerveau adulte et sont donc très intéressantes dans l'identification et la compréhension de la perturbation de la neurogenèse à la suite d'un traumatisme du SNC.

2.1. Bulbes olfactifs

Le système olfactif primaire, composé de l'épithélium olfactif et des deux BOs est un tissu en renouvellement permanent. Les neurones olfactifs primaires subissent de nombreux traumatismes du fait de leur localisation dans la cavité nasale. On observe donc un renouvellement important de ces populations qui nécessitent la présence de cellules spécialisées appelées cellules gliales olfactives (CGO). Ces cellules ont la capacité de moduler l'environnement cellulaire par le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) et la phagocytose des débris cellulaires mais aussi de réorganiser les réseaux neuronaux (Graziadei & Graziadei, 1979; Doucette, 1990).

2.1.1. Structure

Localisé à la base du cortex en position rostrale, on distingue plusieurs couches cellulaires dans le BO. De la plus superficielle à la plus interne, on retrouve la couche nerveuse olfactive (ONL), la couche glomérulaire (GL), la couche plexiforme externe (EPL), la couche de cellules mitrales (MCL), la couche plexiforme interne (IPL), la couche de cellules granulaires (GCL) (Nagayama *et al.*, 2014). Les axones des neurones olfactifs primaires (NOPs) pénètrent dans le BO à partir de la muqueuse olfactive, après avoir traversé la lame criblée située entre la cavité nasale et le BO. Lors du passage de la lame criblée, les axones sont empaquetés sous forme de fascicules nerveux par les CGOs. Chaque fascicule est entouré de fibroblastes nerveux olfactifs (ONFs) formant alors le nerf olfactif (ON). Au niveau du GL les nerfs olfactifs sont ensuite dé-fasciculés et re-fasciculés de manière spécifique en fonction du type de récepteur olfactif (OR) exprimé par ces derniers. Ce gainage spécifique en fonction du type d'OR permet une projection des NOPs directement dans le glomérule propre à la molécule odorante reconnue par l'OR. On parle alors de guidance axonale ou de « *targeting* ». Dans le glomérule cible, les axones des NOPs réalisent des synapses avec les dendrites des cellules touffues et mitrales présentes dans ces couches cellulaires. Ces cellules, dont les corps cellulaires sont situés respectivement dans la EPL et dans la MCL, sont le relai des informations

olfactives provenant des NOPs jusqu'au cortex olfactif par l'intermédiaire du tractus olfactif latéral (LOT). Dans la couche glomérulaire, on distingue la présence de cellules à proximité des glomérules : les cellules juxtaglomérulaires (JGC). Les JGCs sont des interneurons se projetant sur un ou plusieurs glomérules, pouvant être subdivisées en trois types cellulaires : les cellules périglomérulaires (PGC), les cellules touffues extérieures (ET) et les cellules superficielles à courts axones (sSA). En exerçant une inhibition sur les terminaisons du ON et sur différents types cellulaires comme les cellules mitrales et touffues, elles contribuent au traitement précoce des informations sensorielles entrant. Un autre type cellulaire participe à la régulation de la transmission des informations olfactives : les cellules granulaires. Ces cellules, dont le soma est situé en majorité dans la GCL et parfois dans la MCL et l'IPL, réalisent des synapses réciproques avec les dendrites des cellules mitrales et touffues. Lors de leur dépolarisation, les cellules mitrales et touffues activent les cellules granulaires qui, à leur tour, exercent un rétrocontrôle inhibiteur. Ces cellules sont continuellement renouvelées par l'intermédiaire de la neurogenèse de la SVZ et du flux migratoire rostral, *rostral migratory stream* (RMS), dont nous parlons par la suite (**Figure 31, 32**) (Nagayama *et al.*, 2014; Bywalez *et al.*, 2016).

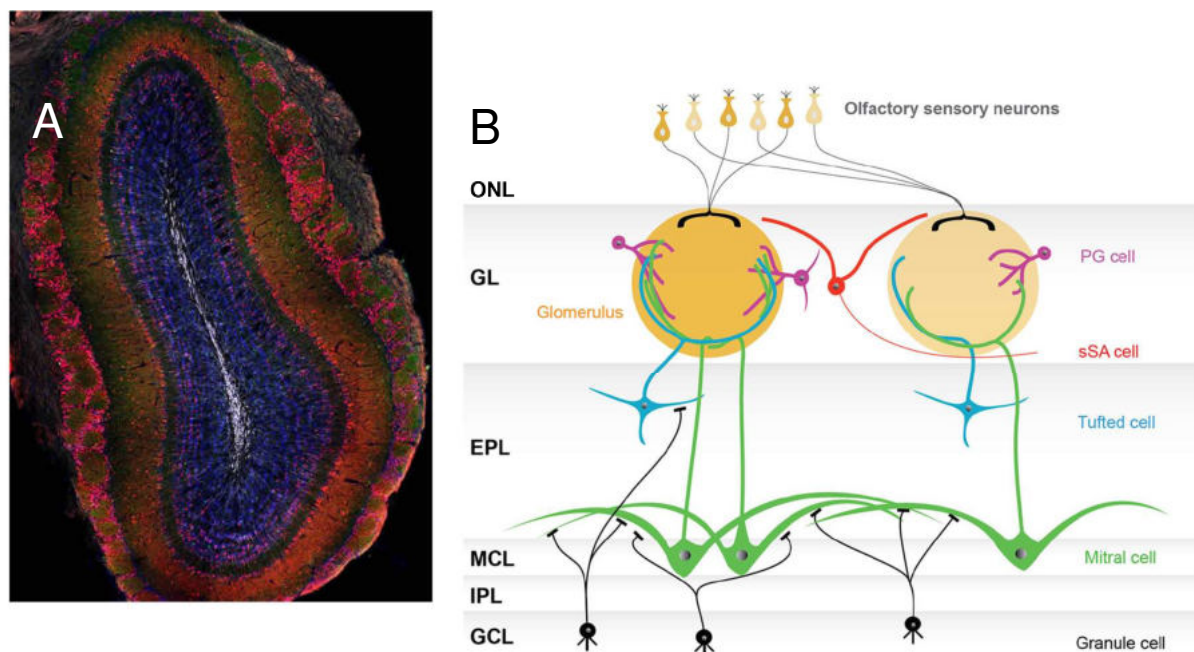


Figure 31 : Structure tissulaire et organisation cellulaire du bulbe olfactif. (A) Coupe transversale d'un bulbe olfactif. (B) Organisation et communication cellulaire du bulbe olfactif. ONL : couche nerveuse olfactive, GL : couche glomérulaire, EPL : couche plexiforme externe, MCL : couche de cellules mitrale, IPL : couche plexiforme interne, GCL : couche de cellules granulaires, PG : cellule péri-glomérulaire, sSA : court axone superficiel. (University of Basel, Biozentrum ; Nagayama *et al.*, 2014).

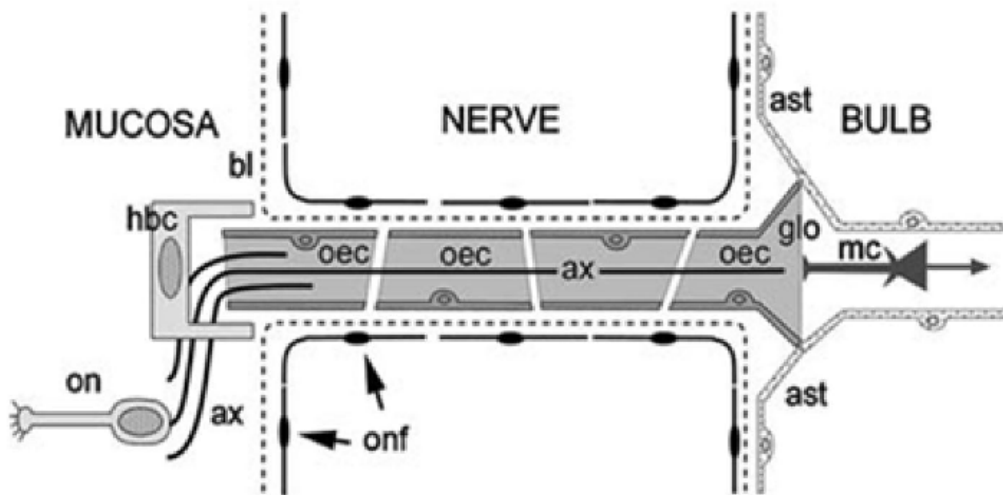


Figure 32 : Représentation schématique de la glia limitans séparant la muqueuse du bulbe olfactif. ON : Nerf olfactif ; Ax : Axone ; Ast : Astrocyte ; MC : Cellule mitrale ; OEC : Cellule gliale olfactive ; ONF : Fibroblaste olfactif nerveux ; HBC : Cellule basale ; BL : Lame basale (Li et al., 2005).

2.1.2. Cellules gliales olfactives

Les CGOs, *olfactory ensheathing cells* en anglais (cellules olfactives engainantes), comme les CSs, ont le même précurseur et dérivent de la crête neurale. Elles migrent du tube neural et envahissent le système nerveux aux stades précoces de l'embryogenèse (Barraud *et al.*, 2010). Dans le SNC adulte, elles jouent un rôle important dans le renouvellement et le « *targeting* » des NOP mais aussi dans la surveillance immunologique et l'entretien des BO (Su *et al.*, 2013). On les retrouve à la fois dans l'épithélium olfactif, CGOs de la muqueuse olfactive (mCGOs) et dans les bulbes olfactifs (bCGOs).

Les mCGOs et bCGOs ont des propriétés *in vitro* différentes. L'analyse de leur expression génétique a mis en avant que les mCGOs sont impliquées dans la régulation de la matrice extracellulaire par la production d'ARN codant pour des protéines telles que de la métalloprotéinase-2 matricielle, *matrix metalloproteinase-2* (MMP) 2, l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases 2, *tissue inhibitor of metalloproteinases 2* (TIMP) 2, la métalloprotéinase avec des motifs de thrombospondine 4, *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4* (ADAMTS-4) ou encore les Tsp 1 et 2. Alors que les bCGOs produisent des ARN permettant la traduction de protéines impliquées dans les processus de développement nerveux, de survie neuronale et de croissance axonale, comme le BDNF, le NGF, le GDNF, le facteur neurotrophique ciliaire *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), ou MBP (Lipson *et al.*, 2003; Guérout *et al.*, 2010; Lan *et al.*, 2021).

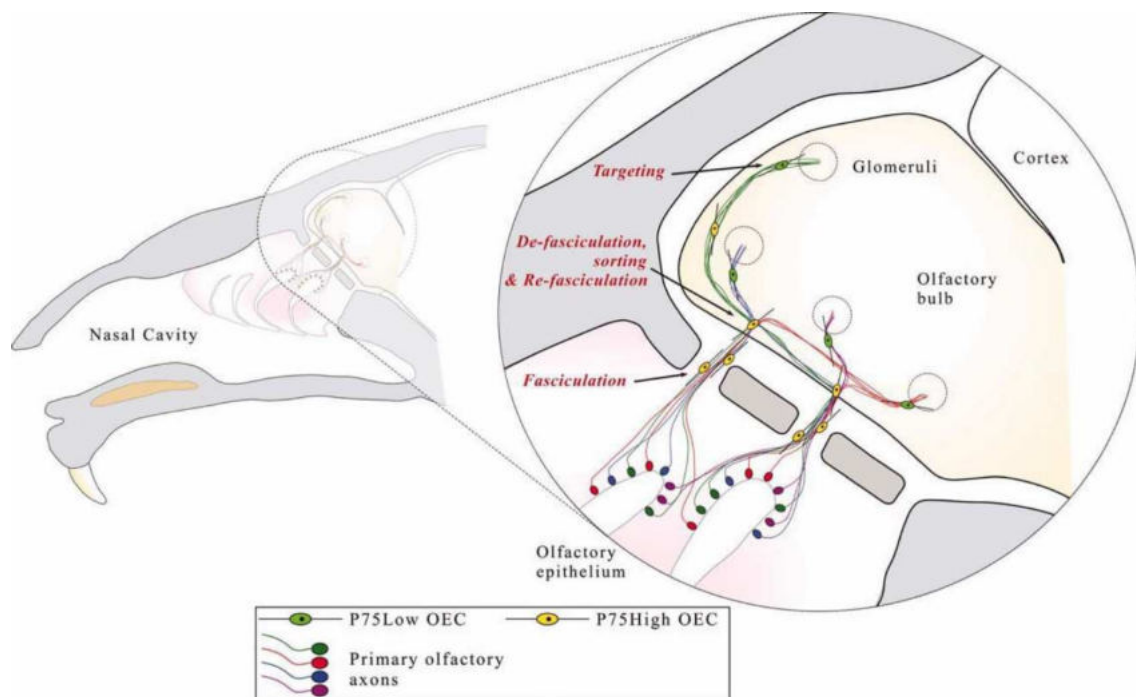


Figure 33 : Représentation schématique de la répartition et du rôle présumé des cellules gliales olfactives dans le système olfactif primaire. Les axones des nerfs olfactifs primaires provenant de l'épithélium olfactif sont fasciculés afin de traverser la lame criblée puis sont dé-fasciculés et re-fasciculés en fonction du glomérule cible par les CGOs p75^{high}. Une fois re-fasciculé, les CGOs p75^{low} permettent l'adressage des axones des nerfs olfactifs primaires vers le glomérule cible (Honoré et al., 2012)

Elles expriment à leur surface le récepteur p75NTR aussi appelé récepteur du facteur de croissance nerveuse, *nerve growth factor receptor* (NGFR), les rendant sensibles à la présence du BDNF et de la neurotrophine 3 (Barraud *et al.*, 2010; Forni *et al.*, 2011). On observe une hétérogénéité au sein des populations de bCGOs. L'analyse *in vitro* du taux d'expression du récepteur p75NTR permet d'identifier deux sous-populations, celle exprimant faiblement ce récepteur (*low*) et celle l'exprimant fortement (*high*). La comparaison de leur profil d'expression génétique a mis en avant leurs rôles distincts. Les CGOs p75NTR^{low} sont impliquées dans la guidance axonale alors que les CGOs p75NTR^{high} réalisent la fasciculation et la dé-fasciculation des axones des NOP. Cependant le rôle exact des sous-populations de CGOs reste à confirmer. En effet, malgré l'identification de ces deux sous-populations et l'analyse de leurs profils d'expression génétique, ces rôles différents dépendant du taux d'expression du p75NTR n'ont jamais été mis en avant *in vivo*. Dans cette même étude, la comparaison des profils d'expression génétique a permis d'identifier le rôle des fibroblastes bulbaires dans la différenciation et la maturation de ces deux sous populations (**Figure 33**) (Honoré *et al.*, 2012).

Les bCGOs du BO jouent aussi un rôle de cellules immunitaires. Alors que dans l'ensemble du SNC ce sont les cellules microgliales qui ont ce rôle, dans le BO les bCGOs produisent le facteur inhibiteur de la migration des macrophages, *macrophage migration inhibitory factor* (MIF). Ce chimio-répulsant limite le nombre de cellules microgliales présentes dans l'ensemble du BO (Calandra & Roger, 2003; Wright *et al.*, 2020). Elles expriment différents récepteurs tels que le MFG-8, le récepteur à la phosphatidyl-sérine, *phosphatidylserine receptor* (PTDSR), le récepteur au mannose (CD206) et les TLR 2, 4 et 9, permettant la détection des bactéries, la phagocytose des neurones olfactifs en apoptose et ainsi favorisent la régénération tissulaire. La présence du TLR 4 et 9 confère aux bCGOs la capacité de détecter la présence de LPS bactérien et de produire en réponse des cytokines et des chimiokines comme le TNF- α et l'IL-1ra, ainsi que les chimio-attractants CXCL 1 et 2 (Macedo-Ramos *et al.*, 2011; Hao, Liu, *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017).

Du fait de leur implication dans la guidance et la croissance axonale, dans la stimulation de la survie et de la prolifération des précurseurs des NPOs ainsi que dans l'entretien du tissu et dans la réponse aux pathogènes, les CGOs sont des cellules indispensables à l'homéostasie du tissu olfactif. Dotée de capacité de régénération du tissu nerveux, les CGOs participent au fonctionnement du système olfactif primaire.

2.2. Hippocampe

Depuis la description par Scoville et Milner en 1957 du patient H.M. souffrant d'une profonde amnésie antérograde à la suite d'une résection bilatérale du lobe temporal, l'hippocampe et les structures voisines dans le lobe temporal, ont été étudiés pour leur implication dans les processus de mémoire (Squire & Wixted, 2011). Par la suite, Bliss et Lomo's décrivent le phénomène de LTP lors des transmissions synaptiques dans l'hippocampe pendant que O'Keefe et Dostrovsky découvraient les cellules de lieu qui sont des neurones impliqués dans la mémoire spatiale des animaux (O'Keefe & Dostrovsky, 1971; Bliss & Lomo, 1973). L'hippocampe est important pour les formes spatiales et non spatiales de mémoire déclarative ou explicite (Squire, 2004), la reconnaissance des personnes, des lieux, des choses et des événements. En plus d'encoder des informations spatiales (Burgess & O'Keefe, 1996), les neurones hippocampiques peuvent également encoder le temps lors d'événements épisodiques (Kraus *et al.*, 2013; MacDonald *et al.*, 2013).

2.2.1. Structure

L'hippocampe est une structure sous-corticale enroulée sur elle-même et située dans la face médiane du lobe temporal. Il est l'un des constituants du système limbique (hippocampe, amygdale, gyrus cingulaire, fornix et hypothalamus) et joue un rôle central dans la mémoire, la navigation spatiale et l'attention.

Lorsque l'on réalise des coupes transversales du cerveau, on observe que l'hippocampe est composé de deux structures en forme de U inversés, le gyrus denté (DG) et la corne d'Ammon (CA), elle-même subdivisée en trois parties : le CA3, le CA2 et le CA1. Attaché à la face dorsale de l'hippocampe, on observe un épais ruban de fibres appelé *fimbria* de l'hippocampe, constituant le fornix et se terminant au niveau du corps mamillaire.

A la différence du cortex cérébral qui en contient six, la corne d'Ammon est constituée de cinq couches cellulaires :

- L'*alveus* : Elle contient les axones des cellules pyramidales dirigés vers la *fimbria* ou le *subiculum*.
- La *stratum oriens* : On y retrouve les dendrites basales des cellules pyramidales ainsi que des cellules en corbeille.
- La *stratum pyramidal* : Couche des corps cellulaires des cellules pyramidales de la corne d'Ammon.
- La *stratum radiatum* : Elle comprend les segments proximaux de l'arbre dendritique apical.
- La *stratum lacunosum molecular* : Elle comprend les segments distaux de l'arbre dendritique apical.

Dans le CA3 on distingue une couche supplémentaire appelée *stratum lucidum*. Située entre la *stratum pyramidal* et la *stratum radiatum*, cette couche reçoit les projections des fibres moussues des cellules granulaires.

En ce qui concerne le DG, celui-ci possède trois couches cellulaires.

- La *stratum granulosum* comprenant les corps cellulaires des cellules granulaires.
- La couche moléculaire formée par les dendrites apicales des cellules granulaires et leurs afférences.
- La couche polymorphique formée par les segments initiaux des axones des cellules granulaires se rassemblant et formant alors les fibres moussues.

Dans le cerveau du rat, il est estimé qu'il y a environ 1 000 000 neurones granulaires dans le DG, 300 000 neurones pyramidaux dans le CA3, 30 000 neurones pyramidaux dans le CA2 et 300 000 neurones dans le CA1 (Amaral & Witter, 1989). Les neurones pyramidaux sont des neurones excitateurs glutamatergiques. Ils sont majoritairement localisés dans le *stratum pyramidal* de la corne d'Ammon et leurs projections permettent une communication avec les autres cellules de l'hippocampe et du cortex. En ce qui concerne le DG, les neurones majoritaires sont les cellules granulaires. Ces neurones ne possèdent pas de dendrites basales et se projettent sur le *stratum radiatum* du CA3 par l'intermédiaire des fibres moussues.

La majorité des cellules de l'hippocampe sont des cellules pyramidales cependant il existe aussi des cellules non pyramidales subdivisées en cinq types :

- Les cellules en corbeille localisées dans le *stratum oriens*.
- Les neurones fusiformes dans la région du hile.
- Les cellules en corbeille de type pyramidale au sein du *stratum granulosum* du DG.
- Les cellules bipolaires et multipolaires situées dans le *stratum pyramidal*.

La plupart de ces cellules sont des interneurons inhibiteurs GABAergiques. Leurs axones n'empruntent pas les mêmes voies et ramifications que ceux des cellules granulaires et pyramidaux (Basu & Siegelbaum, 2015).

2.2.2. Mémoire

Depuis des dizaines d'années, l'hippocampe est considéré comme le centre de l'apprentissage et de la mémoire. C'est pour cela qu'un ensemble d'études s'est intéressé à définir les aires hippocampiques et les réseaux impliqués en fonction des différents types de mémoire. Du fait que la majorité des projections provenant de l'hippocampe partent du CA1, cette aire hippocampique est primordiale pour l'ensemble des formes de mémoires. En effet, chez l'Homme et les autres mammifères, une lésion du CA1 entraîne un sévère déficit de la mémoire (Zola-Morgan *et al.*, 1986; Squire, 2004). Le DG, quant à lui, est impliqué dans le processus de « séparation des motifs ». Ce processus permet la discrimination mnésique entre deux souvenirs d'évènements similaires (Leutgeb *et al.*, 2007; Sahay *et al.*, 2011). De plus, à l'âge adulte, la neurogenèse hippocampique est observée essentiellement dans le DG. Les nouveaux neurones formés lors de la neurogenèse semblent être impliqués préférentiellement dans la « séparation des motifs » (Nakashiba *et al.*, 2012). Par une expérience d'optogénétique permettant l'inhibition des cellules granulaires dans le DG, il a été démontré que le DG était

important pour encoder des informations mais n'était pas impliqué dans la récupération de celles-ci. Il est suggéré que ce rôle est essentiellement réalisé par le CA3 (Nakazawa *et al.*, 2002; Kheirbek *et al.*, 2013). En ce qui concerne le CA2, une inactivation de celui-ci est corrélée à un profond déficit de la mémoire sociale et de la capacité à reconnaître les membres individuels de la même espèce (Hitti & Siegelbaum, 2014). En fonction du type de mémoire sollicitée, on ne retrouvera pas les mêmes aires hippocampiques et circuits impliqués. La **figure 34** résume les liens entre les différents circuits hippocampiques et les mémoires impliquées.

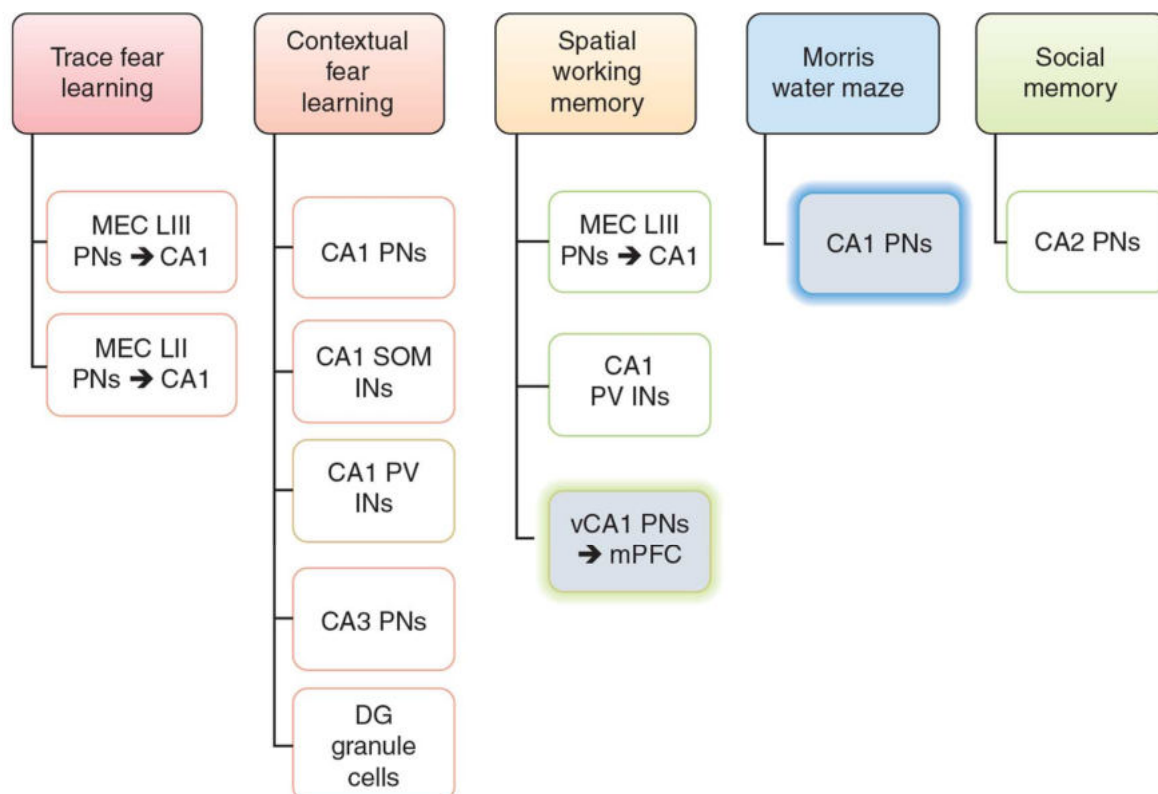


Figure 34 : Représentation des circuits hippocampiques et des types de mémoires associées. Les circuits cortico-hippocampiques soutiennent diverses formes d'apprentissages et de mémoires déclaratives. Les entrées glutamatergiques de la couche LII et LIII du ECM (MEC) vers le CA1 sont utilisées pour le conditionnement de la peur par trace. Les neurones pyramidaux du CA1 (PNs) et du CA3, le DG, les cellules granuleuses, les interneurones (Ins) de la parvalbumine (PV) et les interneurones de la somatostatine (SOM) sont impliqués dans le comportement d'apprentissage de la peur contextuelle. La mémoire de travail spatiale implique les projections des neurones pyramidaux de la couche LIII du ECM vers le CA1, CA1 PV et les projections de l'hippocampe ventral vers le cortex préfrontal (Basu and Siegelbaum, 2015).

2.2.3. Neurogenèse

Initialement décrite en 1960 par Joseph Altman, la neurogenèse à l'âge adulte chez l'Homme a longtemps été sujet à controverse. En 2013 l'équipe de Jonas Frisen a mesuré la concentration de ^{14}C présente dans les neurones d'hippocampes humains post-mortem de personnes nées avant la fin des essais des bombes nucléaires à l'air libre. Les explosions de

bombes nucléaires ont libéré du ^{14}C radioactif dans l'atmosphère qui s'est alors incorporé par le biais de la chaîne alimentaire dans l'ADN humain. Par cette approche intelligente, ils ont pu mettre en évidence une neurogenèse dans le DG. Ils ont estimé que chaque jour 700 nouveaux neurones étaient formés, correspondant à un « turnover » annuel de 1.75% (Spalding *et al.*, 2013). Depuis un ensemble d'études s'est intéressées à la neurogenèse hippocampique humaine en étudiant et en comparant des cerveaux d'âges différents sains comme pathologiques. Elles ont mis en avant que les populations de progéniteurs neuronaux intermédiaires et de neurones immatures restent constants en vieillissant chez des sujets sains mais que leur nombre diminue lors de pathologies neurodégénératives comme Alzheimer (Boldrini *et al.*, 2018; Tobin *et al.*, 2019). D'autres études quant à elles, en utilisant des approches différentes ont conclu qu'une fois à l'âge adulte, la neurogenèse n'est plus présente et que les cellules microgliales représentent la majorité des cellules se divisant (Dennis *et al.*, 2016). Cependant l'analyse de l'ensemble des travaux s'étant intéressé à la neurogenèse humaine, indique qu'il semblerait qu'elle soit présente à l'âge adulte (Nogueira *et al.*, 2022).

Chez la souris, la neurogenèse hippocampique à l'âge adulte, joue un rôle important dans l'entretien des mécanismes d'apprentissage et de mémoire (Berdugo-Vega *et al.*, 2020). Celle-ci est initiée dans la zone sous granulaire, *subgranular zone* (SGZ) par la différenciation des NSC en cellules transitionnelles d'amplification. Ce précurseur intermédiaire, en réalisant une division asymétrique, donne naissance à une nouvelle cellule transitionnelle d'amplification et à un neuroblaste. Les neuroblastes ainsi formés, migrent de la SGZ vers la zone granulaire du DG et se différencient en cellules granulaires. Une semaine après leur génération, les neurones immatures débutent la formation d'axones (fibres moussues) se projetant sur le CA3 et le CA2 (Zhao *et al.*, 2007; Llorens-Martín *et al.*, 2015). Les premières afférences observées sur ces neurones proviennent d'interneurones inhibiteurs GABAergiques, puis glutamatergiques provenant des cellules moussues du hile (Toni *et al.*, 2008; Llorens-Martín *et al.*, 2015). Quelques semaines plus tard, ces neurones intègrent totalement le réseau synaptique hippocampique en recevant des afférences provenant du CE au travers de la voie perforante (Espósito *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2006). Une faible quantité intègre les circuits synaptiques fonctionnels alors que la majorité des nouveaux neurones meurent. Ces nouveaux neurones reçoivent alors des informations provenant du CE et se projettent sur le CA3 (CE LII → DG → CA3). Ils forment alors des connexions synaptiques avec les cellules moussues du hile (Toni *et al.*, 2008), les cellules pyramidales du CA2 et du CA3 (Toni *et al.*, 2008; Llorens-

Martín *et al.*, 2015) et les interneurons du DG et du CA3 (**Figure 35**) (Restivo *et al.*, 2015; Drew *et al.*, 2016).

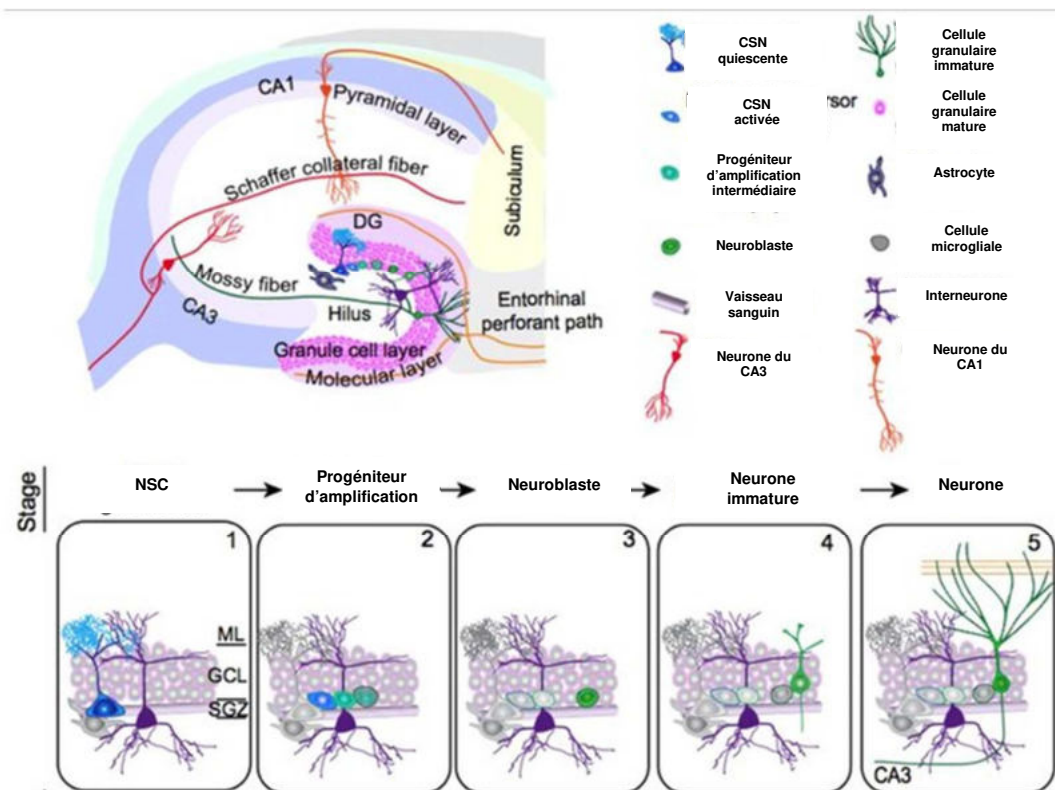


Figure 35 : Schéma représentant la neurogenèse hippocampique. La neurogenèse hippocampique se déroule dans la SGZ située sous la couche granulaire. Les NSC (1) se différencient en progéniteurs d'amplification intermédiaires (2) qui à leur tour se différencient en neuroblastes (3). Les neuroblastes ainsi formés migrent de la SGZ vers la zone granulaire (GCL) et se différencient en neurones qui prendra plusieurs semaines pour intégrer les réseaux synaptiques existant et devenir mature. (Ming & H. Song, 2011. Modifié)

La neurogenèse et les fonctions cognitives associées, sont modulées par un ensemble de facteurs environnementaux comme l'apprentissage, l'exercice ou encore le stress, induisant une libération de NT, de cytokines ou encore d'hormones, agissant sur l'hippocampe (Tashiro *et al.*, 2007). Par exemple chez la souris, un stress social ou physique entraîne une diminution de la neurogenèse liée à une diminution de la prolifération des NSC (Llorens-Martín *et al.*, 2016; De Miguel *et al.*, 2019). La neurogenèse et l'intégration des nouveaux neurones aux réseaux synaptiques existant, est régulée par les astrocytes et les cellules microgliales (Battista *et al.*, 2006; Borsini *et al.*, 2015). Comme décrit précédemment les cellules gliales sont importantes pour l'entretien et le fonctionnement des réseaux neuronaux. Elles assurent cette fonction par contact direct avec les neurones et les synapses mais aussi par libération de cytokines et de facteurs trophiques. Les cytokines pro-inflammatoires sont délétères à la neurogenèse. En effet, la production et la survie des nouveaux neurones sont diminuées en présence d'IL-1 β , d'IL-1 α , d'IL-6, d'IFN- α , d'IFN- γ et de TNF- α (Borsini *et al.*, 2015), tout comme la plasticité synaptique

en présence d'IL-1 β , d'IL-18 et de TNF- α (Stellwagen & Malenka, 2006; Prieto *et al.*, 2019). A l'opposé, les IL-4 et 10 induisent respectivement la différenciation et la prolifération des NSC tout comme l'apprentissage et l'exercice (Deng *et al.*, 2010)

2.3. Zone ventriculaire, sous ventriculaire et RMS

Les ventricules cérébraux adultes dérivent des ventricules embryonnaires formés à partir des renflements du tube neural. Comme dans la zone ventriculaire embryonnaire, les zones ventriculaires et sous ventriculaires, *ventricular – subventricular zone* (V-SVZ) des ventricules latéraux sont constituées de précurseurs et de progéniteurs neuraux. Ces cellules participent au renouvellement, tout au long de la vie, des neurones et des cellules gliales dans certaines zones cérébrales et en particulier lors d'atteintes traumatiques ou de pathologies cérébrales. Chez certains mammifères, en particulier chez le rat et la souris, il a été mis en avant que la V-SVZ permettait la génération de neuroblastes migrant de façon tangentielle vers les BOs par l'intermédiaire de la RMS.

2.3.1. Structure et neurogenèse

La structure de la V-SVZ est définie par l'organisation des populations cellulaires situées sous les ventricules latéraux. Cette niche neurogénique est composée de NSC semblables à des astrocytes appelées cellules de type B1 (Doetsch *et al.*, 1997; García-Verdugo *et al.*, 1998). Elles expriment à leur surface des marqueurs de cellules gliales tels que la GFAP et le GLAST. On observe sur leur surface basale un pied terminal au contact des vaisseaux sanguins comme les astrocytes de la substance grise et sur leur surface apicale, un cil non mobile au contact du LCS. Chez la souris, ces cellules existent sous deux formes : un état activé identifié par l'expression de nestine et un état quiescent identifié par l'absence d'expression de nestine (Ottone *et al.*, 2014). Les cellules B1 activées en se différenciant, donnent naissance aux cellules de type C (précurseurs d'amplifications). Ces cellules expriment la protéine DCX et la molécule d'adhésion PSA-NCAM (Doetsch *et al.*, 1997). Elles se divisent symétriquement approximativement trois fois avant de devenir une cellule de type A (neuroblaste). Ces dernières, migrent les unes le long des autres dans un agrégat cellulaire allongé entouré par des cellules GFAP positives. La RMS définit cette structure en perpétuel mouvement (Lois & Alvarez-Buylla, 1994; Lois *et al.*, 1996). Lors de leur migration les cellules de type A se divisent une fois, parfois deux, permettant d'augmenter le « *pool* » de cellules de type A. Une fois arrivées aux BOs, elles se différencient en interneurones spécifiques de la couche cellulaire atteinte.

Les cellules de type B1 ne génèrent pas que des interneurons mais aussi des astrocytes et des oligodendrocytes. En comparaison de la neurogenèse des BOs, en condition physiologique, elles ne génèrent que très peu d'oligodendrocytes, à destination du corps calleux (Menn *et al.*, 2006). Cependant après une lésion cérébrale, la gliogenèse augmente de manière conséquente. On observe une augmentation de la formation de nouveaux oligodendrocytes, lors de lésions démyélinisantes, tout comme une augmentation de la production de nouveaux astrocytes migrant vers la zone atteinte. Cette plasticité démontre la capacité des cellules de type B1 à répondre à un changement induit par une lésion ou une maladie (Picard-Riera *et al.*, 2002; Benner *et al.*, 2013).

Il est possible de diviser les cellules de type B1 en trois domaines. Le premier correspondant à la partie apicale au contact du LCS, le deuxième contenant le corps cellulaire des cellules au contact des cellules de type A et C et le troisième correspondant à la partie basale au contact des vaisseaux sanguins. Chacun de ces domaines participe à la régulation des cellules de type B1. Le domaine numéro 1 analyse la composition du LCS. La présence d'acide rétinoïque (AR), d'IGF-2, EGF, FGF, Shh ou encore des *bone morphogenetic proteins* (BMP) dans le LCS, influençant la prolifération et la différenciation des cellules de type B1 (Huang *et al.*, 2010; Lehtinen *et al.*, 2011; Lehtinen & Walsh, 2011). Le domaine numéro 2 est influencé par le contact cellule-cellule. Il a été observé à la surface des cellules de type A et C, l'expression du ligand du récepteur notch. L'accumulation de cellules de type A et C a pour effet d'inhiber la prolifération et la différenciation des cellules de type B1 exprimant le récepteur Notch (Givogri *et al.*, 2006; Aguirre *et al.*, 2010). Le domaine numéro 3 quant à lui est influencé par la composition sanguine. Par exemple, on retrouve en concentration importante dans le sérum la présence de PDGF stimulant l'oligodendrogenèse (Chojnacki *et al.*, 2011), du VEGF produit par les cellules endothéliales et stimulant quant à lui la neurogenèse (Palmer *et al.*, 2000; Louissaint *et al.*, 2002), ou encore la neurotrophine 3 (NT-3), sécrétée elle aussi par les cellules endothéliales, agissant sur la prolifération et la croissance cellulaire (**Figure 36**) (Delgado *et al.*, 2014). La neurogenèse humaine adulte de la V-SVZ, comme pour celle de l'hippocampe, reste controversée. Des travaux ont mis en avant sa présence (Gault & Szele, 2021) alors que d'autres la réfutent (Dennis *et al.*, 2016). Cependant, comme pour la neurogenèse hippocampique, l'analyse de l'ensemble des travaux réalisés jusqu'à présent, pencherait pour son existence (Nogueira *et al.*, 2022)

La neurogenèse cérébrale est donc un phénomène dynamique modulé par différents acteurs cellulaires et moléculaires présents à la fois dans le LCS, le sang et dans le parenchyme. Comme décrit dans la partie « microglie », les cellules microgliales présentes dans l'ensemble du parenchyme, interagissent avec les neurones et influencent la neurogenèse ainsi que la survie neuronale en particulier lors d'un contexte inflammatoire. La perturbation de l'homéostasie de la neurogenèse peut donc résulter d'un dérèglement de l'homéostasie du système nerveux central mais aussi plus globalement de l'organisme.

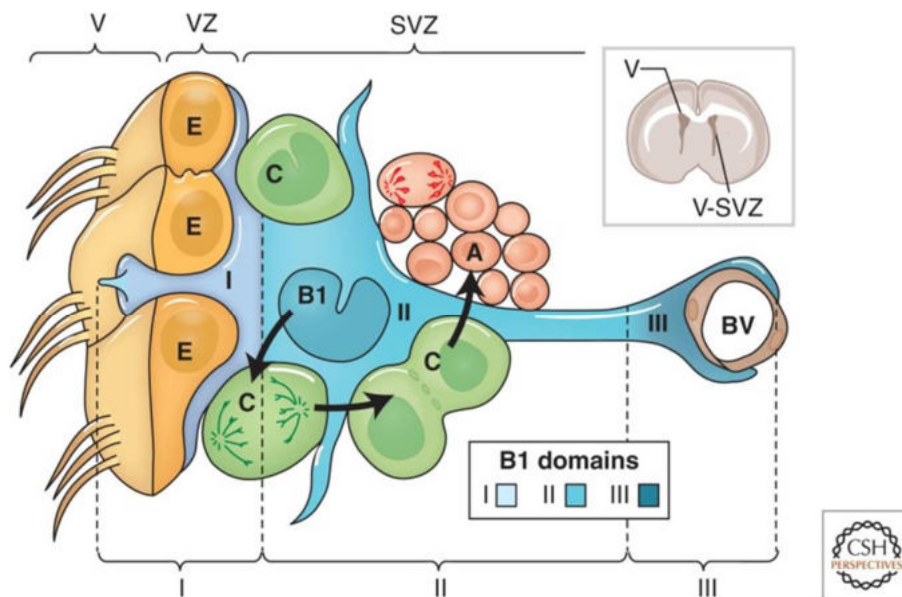


Figure 36 : Schéma représentant l'organisation cellulaire de la V-SVZ. La V-SVZ est composée des cellules épendymaires au contact de la lumière du ventricule, des cellules B1 (NSC) possédant de longs prolongements sur la surface apical, au contact du LCS, ainsi que sur la surface basale au contact des vaisseaux sanguins, des cellules de type C (précurseurs d'amplification) et des cellules de type A (neuroblastes) ayant la capacité de migrer et de se différencier en neurone. Par leur structure, les cellules de type B1 peuvent être divisées en trois domaines. Le premier correspondant au prolongement apical, le deuxième correspondant au corps cellulaire et le troisième correspondant au prolongement basal. (Lim and Alvarez-Buylla, 2017)

Chapitre II : Les lésions médullaires traumatiques

1. Etiologie

La lésion médullaire est une atteinte de la moelle spinale provenant d'événements traumatiques ou non traumatiques. A la différence des lésions médullaires non traumatiques regroupant les affections tumorales, immunitaires, infectieuses, vasculaires, toxiques, malformatives ou dégénératives, les LMTs résultent d'une atteinte physique externe. Ces atteintes représentent 90% des lésions médullaires enregistrées chaque année dans le monde (Ahuja *et al.*, 2017). Nous allons nous intéresser particulièrement aux lésions médullaires traumatiques.

Les LMTs représentent, selon l'organisation mondiale de la santé, 250 000 à 500 000 nouveaux cas par ans dans le monde. Dans les pays développés, l'incidence est de 22,55 cas par millions d'habitants par an. Les hommes sont particulièrement touchés par ce traumatisme, ils représentent 80,09% des nouveaux cas. La LMT peut survenir tout au long de la vie, cependant on peut observer deux tranches d'âge de la population particulièrement touchées : les jeunes âgés de 16 à 29 ans et les personnes de plus de 60 ans. Les deux principales étiologies des LMTs sont les accidents de la route (43,18%) et les chutes (34,24%). La violence et les activités sportives sont respectivement à l'origine de 5,68% et 3,06% des cas de LMTs dans le monde. Les autres causes sont les chutes d'objets, les suicides et les catastrophes naturelles. On observe cependant une grande variabilité en fonction des régions du monde. Par exemple les accidents de la route et les chutes représentent, respectivement, 18,63% et 68,24% des cas de LMTs au Népal, alors qu'en Arabie Saoudite ils correspondent, respectivement, à 90,8% et 3,2%. On observe aussi une grande variabilité des cas de LMTs par arme à feu. En Ethiopie, ils représentent 0,7% alors qu'en Afrique du Sud, ils représentent 30,8% (Golestani *et al.*, 2022). Le pourcentage est encore plus important dans les zones de conflits armés, comme en Afghanistan où il atteint 60%.

Les LMTs induites par chute sont très présentes dans le secteur de la construction, en particulier dans les pays en voie de développement où les règles de sécurité sont moins rigoureuses. Dans les pays développés, la cause principale de chute est d'origine domestique et survient surtout chez les personnes de plus de 60 ans. Ces chutes sont souvent de faible hauteur (inférieure à 1 mètre), mais induisent une atteinte importante au niveau de la moelle spinale. Les accidents liés aux loisirs sportifs sont également une source importante de LMTs, en particulier chez les jeunes individus des pays développés (Ahuja *et al.*, 2017)

Du fait de leurs origines différentes, on peut distinguer plusieurs types de lésions médullaires traumatiques. Le traumatisme le plus communément retrouvé chez l'Homme est la compression médullaire liée à la fracturation des vertèbres par un choc extérieur venant comprimer de manière continue le tissu nerveux à l'intérieur du canal rachidien. On observe ensuite les contusions ou les compressions simples résultant d'un déplacement d'une vertèbre lors d'un choc venant comprimer de manière transitoire la moelle spinale. Puis les distractions médullaires qui sont des étirements de la colonne vertébrale entraînant une elongation de la moelle spinale responsable, au point de tension, d'une destruction du tissu nerveux et vasculaire. Enfin, le dernier type de lésion couramment rencontré, en particulier dans les pays en conflit armé, est la lacération/transection. Elle consiste en une lacération du tissu nerveux par un objet contendant (armes à feu, armes blanches) ou bien par des fragments vertébraux pointus issus de la dislocation osseuse lors du choc. Bien que la physiopathologie soit légèrement différente entre ces différents types de lésions, elles entraînent toutes une atteinte physique de la moelle épinière induisant une perte de fonctionnalité des nerfs spinaux naissant au niveau des étages médullaires en aval de la lésion (**Figure 37**).

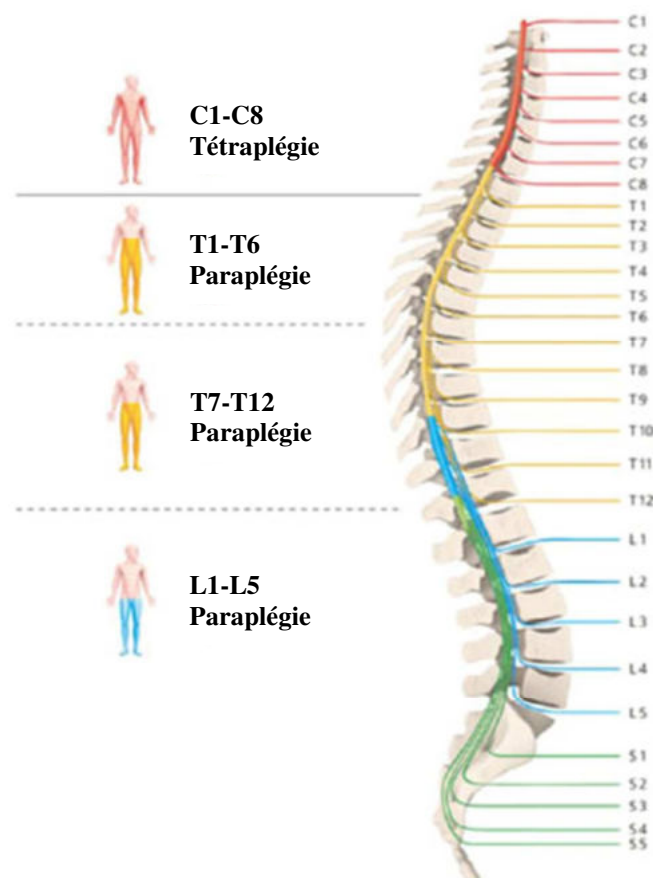


Figure 37 : Illustration des étages médullaires et des conséquences cliniques de leurs atteintes. Une lésion survenant dans les étages médullaires cervicaux entraîne une tétraplégie du patient. Les lésions survenant dans les étages médullaires thoraciques et lombaires, sont quant à elles, à l'origine de paraplégies.

La gravité de la lésion et les pertes de fonctions associées, dépendent de l'intensité de la lésion mais aussi du segment médullaire atteint. On qualifie les patients de tétraplégiques lorsqu'il y a une perte de fonction motrice et/ou sensitive dans les segments cervicaux, entraînant un dysfonctionnement des membres inférieurs et supérieurs. Quand la perte de fonctions motrices et/ou sensibles survient dans les segments thoraciques, lombaires et sacrés, les patients sont qualifiés de paraplégiques. Dans ce cas, la perte de fonction s'observe seulement dans les membres inférieurs alors que le fonctionnement des membres supérieurs est préservé. Dans la population générale, la lésion des segments cervicaux, thoraciques et lombosacrés représente, respectivement, 43,42%, 35,22% et 18,84% (Golestani *et al.*, 2022).

2. Mortalité et complications

Malgré l'amélioration de la compréhension de la pathologie et de la prise en charge clinique, le taux de mortalité reste élevé. Lors de la phase aiguë du traumatisme, le taux de mortalité des patients admis en milieu hospitalier est compris entre 4% et 17%. Une fois les patients stabilisés et sortis de l'hôpital, le taux de mortalité est de 3,8% la première année, 1,6% la seconde année et enfin 1,2% les années suivantes. Ces pourcentages sont influencés par la localisation de l'atteinte. Une LMT cervicale est associée à un plus grand taux de mortalité du fait de la perturbation de l'innervation des organes vitaux. Mais aussi par l'âge de survenu du traumatisme. L'espérance de vie des patients âgés médullo-lésés est largement diminuée du fait des conséquences de leur traumatisme.

La rupture des axones des réseaux nerveux somatiques et végétatifs à des conséquences immédiates et dramatiques sur les grands systèmes physiologiques. Les complications sont dépendantes de l'étage médullaire touché. Parmi les complications immédiates, on distingue les complications respiratoires (première cause de mortalité), hémodynamiques, uro-néphrologiques et digestives. Elle sont suivies de complications secondaires telles que les douleurs, les troubles de décubitus, les complications cardiovasculaires, les souffrances psychologiques et les complications neuro-orthopédiques (Stillman *et al.*, 2017).

3. Physiopathologie

Dans cette partie, nous allons nous intéresser particulièrement à la physiopathologie des transections dans des modèles murins. La transection est caractérisée par une première atteinte physique, appelé lésion primaire. Cette lésion est liée à la rupture du cordon nerveux et des axones, coupant la communication neuronale entre les systèmes nerveux central et périphérique. La libération de débris cellulaires et axonaux, va ensuite amener à l'émergence

d'un environnement cytotoxique pro-inflammatoire et d'une réponse immunitaire au niveau du site de lésion. L'environnement ainsi créé, délétère à la survie des neurones et responsable d'une dégénérescence des axones à proximité du site de lésion, est appelé lésion secondaire. La réponse physiopathologique à la lésion primaire est nécessaire pour l'initiation des mécanismes de régénération, cependant, si elle n'est pas bien contrôlée, elle est responsable d'une aggravation de la lésion et d'une augmentation des pertes fonctionnelles (Alizadeh *et al.*, 2019).

3.1. Inflammation, réponse immunitaire et formation de la cicatrice médullaire

3.1.1. Hémorragie et ischémie

La lésion primaire est caractérisée par la destruction physique de la moelle spinale. La mort cellulaire, la rupture des axones et des vaisseaux sanguins ainsi que la désorganisation de la MEC contribuent à l'émergence d'un environnement pro-inflammatoire délétère pour le tissu, mais permettent l'induction des mécanismes de régénération. La rupture des vaisseaux sanguins entraîne une hémorragie dans le parenchyme. Le sang, et en particulier les protéines sériques, s'accumulant dans le tissu, induisent l'activation des cellules microgliales, des astrocytes et des macrophages présents au site de lésion (Shechter & Schwartz, 2013). Cette activation se traduit par une production et une libération dans l'espace extracellulaire, de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines. En parallèle, l'accumulation d'hématies dans le parenchyme (source importante de fer) est connue pour contribuer à la présence de radicaux libres toxiques conduisant à la mort cellulaire par le mécanisme de ferroptose (Hao, Li, *et al.*, 2017). L'hémorragie est aussi liée à la formation d'un œdème tissulaire responsable d'une augmentation de la pression interstitielle, compressant les vaisseaux adjacents augmentant ainsi l'ischémie médullaire et l'hypoperfusion (Mortazavi *et al.*, 2015). La destruction des vaisseaux sanguins est associée à la rupture de la BBB. Cette rupture favorise l'accumulation de cellules immunitaires au site de lésion, qui, par la sécrétion de cytokines et chimiokines, exacerbent la perméabilité de la BBB au niveau des vaisseaux à proximité, contribuant ainsi à la propagation de l'inflammation et de la réactivité cellulaire (**Figure 38**).

3.1.2. Phase immédiate

Dès les premières minutes suivant la lésion, on observe l'émergence d'une inflammation liée à l'hémorragie et à l'ischémie du tissu mais aussi liée à la libération d'un ensemble de molécules par les neurones et les cellules gliales endommagées ainsi que par les cellules saines à proximité. En effet, après la lésion, les neurones et les cellules gliales libèrent des radicaux libres, du glutamate, des *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), de l'ATP, des *heat*

shock protein (HSP) mais aussi de l'IL-1 β , du TNF- α , de l'IFN- γ et du NO (Pineau & Lacroix, 2007; Dibaj *et al.*, 2010; David & Kroner, 2011; Lovatt *et al.*, 2012; Ishii *et al.*, 2013).

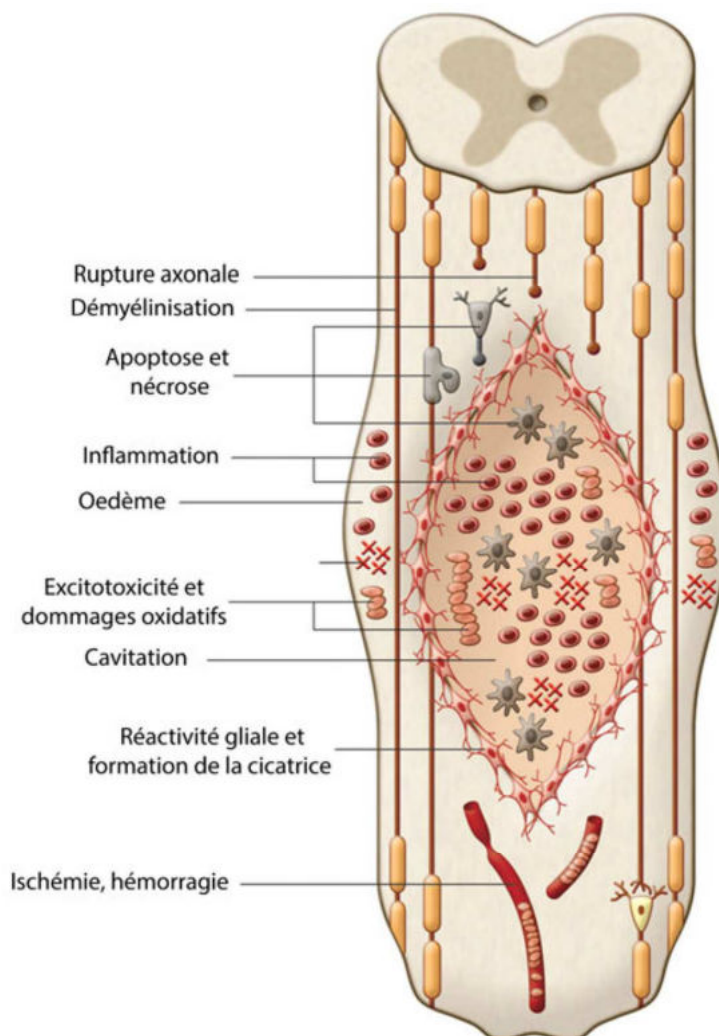


Figure 38 : Représentation schématique de la physiopathologie de la LMT lors des phases immédiates et aiguës. La LMT provoque la destruction du tissu nerveux conduisant à la mort des cellules médullaires ainsi qu'à une rupture des vaisseaux sanguins. L'hémorragie contribue à la formation d'un œdème réduisant la perfusion du tissu. L'hypoxie, l'inflammation et les DAMPs, générés par l'apoptose et la nécrose des cellules, activent les cellules gliales et microgliales. L'activation de ces cellules permet la formation de la cicatrice médullaire, mais est responsable de l'émergence des dégâts secondaires (Mothe and Tator, 2013).

Ces molécules, présentes dans l'espace extracellulaire sont délétères à la survie cellulaire, elles induisent la mort des neurones et des oligodendrocytes par nécrose, apoptose ou autophagie, conduisant à la démyélinisation des axones. Leur présence comme celle des débris de myéline (Nogo-A, OMgp et MAG), stimule l'activation des cellules microgliales provoquant leur prolifération. La prolifération des cellules microgliales débute dès le premier jour, atteint son maximum à partir de 7 jours et restent stables pendant 2 à 4 semaines (Popovich *et al.*, 1997). Dès les premières heures de leur activation, les cellules microgliales libèrent des facteurs trophiques stimulant la survie des cellules médullaires et induisant les mécanismes de

croissance et de régénération des axones, limitant ainsi l'expansion de la lésion secondaire (Hashimoto *et al.*, 2005; Shaked *et al.*, 2005). Cependant, les cellules microgliales activées sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 α , l'IL-1 β et le TNF- α (**Figure 38, 40**) (David & Kroner, 2011).

3.1.3. Phase aiguë

La phase aiguë débute quelques heures après la lésion et est caractérisée par la mise en place d'une réponse immunitaire et inflammatoire plus importante. Elle résulte de l'activation des premières cellules immunitaires et microgliales, présentes au site de lésion et provenant des vaisseaux rompus. L'environnement pro-inflammatoire induit par ces cellules, conduit à l'activation des astrocytes participant au recrutement et à l'infiltration des neutrophiles qui sont les premières cellules circulantes à être recrutées, on observe une augmentation de leur population par cinq 12 heures après la lésion, puis leur nombre diminue entre 24 et 48 heures jusqu'à retourner au niveau basal 96 heures après la lésion (Fleming *et al.*, 2006; Stirling & Yong, 2008). Les neutrophiles détectent la présence de DAMPs (ARN, ADN, histones, ATP, ...) induisant l'activation de la voie de signalisation NF- κ B et la libération de CCL2, CXCL1 et CXCL2 favorisant leur recrutement (Albrecht *et al.*, 2007). L'augmentation de la quantité de neutrophiles est liée à l'exacerbation de la réponse inflammatoire et du stress oxydatif. Du fait de la libération de *neutrophil matrix traps* (NETs) ou encore de MMP9, leur présence conduit à des dégâts cellulaires et à la perméabilisation de la BBB (Fiani *et al.*, 2021). Cependant les neutrophiles, comme les astrocytes, les cellules microgliales et les macrophages, sembleraient être divisés en sous-populations inhibitrices ou permissives de la survie neuronale et de la régénération axonale (**Figure 40**) (Sas *et al.*, 2020).

Les neutrophiles et les cellules microgliales, aidés par les cellules endothéliales libérant la protéine-1 chimioattractante de monocytes, *monocyte chemoattractant molecule-1* (MCP-1), permettent le chimiotactisme des monocytes circulant et leur infiltration dans le tissu médullaire. Le tout étant favorisé par l'augmentation de la perméabilité de la BBB. Leur nombre augmente à partir de 3 jours après la lésion et leur quantité est au maximum 7 jours et 60 jours après la lésion, suggérant deux vagues d'infiltration (Blight, 1992; Popovich *et al.*, 1997; Beck *et al.*, 2010). Du fait de leurs similitudes et de l'expression des mêmes marqueurs phénotypiques, il est compliqué de distinguer les cellules microgliales et les macrophages dérivés des monocytes circulants, on parlera donc de microglie/macrophage (Mi-M Φ). Ces cellules sont importantes dans l'induction des mécanismes de régénération du tissu, en effet comme décrit précédemment, elles participent par phagocytose au nettoyage du tissu lésé, et

sécrètent des cytokines pro- et anti-inflammatoires, stimulant la formation de la cicatrice médullaire et la régénération tissulaire. Les Mi-M Φ ont la capacité de se polariser et d'avoir des rôles différents en fonction de leur phénotype. Classiquement, ces cellules sont divisées en deux populations : les M1 pro-inflammatoires et M2 anti-inflammatoires, eux même subdivisés en trois sous-phénotypes, le phénotype pro-régénérateur (M2a), immunorégulateur (M2b) et anti-inflammatoire (M2c) (Durafourt *et al.*, 2012; Kroner *et al.*, 2014). L'équilibre et le ratio entre les M1 et les M2 détermine l'homéostasie de l'environnement cellulaire local. Juste après la lésion, le phénotype M1 est dominant, lié à la quantité importante de ROS dans l'espace extracellulaire. Les phénotypes M2a et M2b apparaissent à partir du 3^{ème} jour après la lésion. L'activation majoritaire vers le phénotype M1 est délétère pour le tissu. En effet, une fois polarisé en M1, les Mi-M Φ produisent de l'IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 et du TNF- α (Zhou *et al.*, 2014). Cependant, l'exacerbation de l'inflammation stimule les mécanismes de régénération initiés par le nettoyage du tissu ainsi que l'activation des astrocytes et le remodelage de la MEC. La phagocytose des débris de myéline, des neutrophiles en apoptose et des hématies par les Mi-M Φ , provoque un « switch » phénotypique du phénotype M1 vers le phénotype M2. Les cellules M2 sécrètent un ensemble de facteurs comme l'IL-4, l'IL-10 et le TGF- β , stimulant la régénération tissulaire, mais aussi, réprimant leur production de cytokines pro-inflammatoires par la diminution de l'expression du facteur de transcription NF- κ B et l'augmentation de l'expression de l'arginase 1 (Sica *et al.*, 2008). Le phénotype M2, en particulier le M2a, est concomitant du phénotype M1 mais en plus faible quantité pendant les phases précoces après la lésion. Il diminue progressivement à partir du septième jour laissant place à l'émergence du phénotype M2c anti-inflammatoire accompagné d'une diminution du phénotype M1 mais persistant lors de la phase chronique liée à la présence du TNF- α inhibant la polarisation de tous les Mi-M Φ vers le phénotype M2 (**Figure 40**) (Filardy *et al.*, 2010; Kroner *et al.*, 2014; Gensel & Zhang, 2015).

La LMT induit aussi le recrutement des LT et des LB au site de lésion, facilité par l'augmentation de la perméabilité de la BBB et par la libération de chimiokines tel que le CCL2 et le CXCL10. Ils infiltrent la moelle spinale lésée dès les premières vingt-quatre heures, avec une pic d'infiltration sept jours après la lésion et se maintiennent dans le tissu de manière chronique pendant des mois (Beck *et al.*, 2010). Les LT sont divisés au regard de leur fonction. On distingue les LT effecteurs et régulateurs ainsi que les LT helpers (eux même subdivisé en lymphocytes Th1, 2 et 17). Leurs rôles exacts, en particulier s'ils sont bénéfiques ou délétères, dans la physiopathologie de la LMT est encore débattu. Des études s'intéressant à la

physiopathologie des LMTs dans des souris déficientes pour certains gènes nécessaires à la génération des lymphocytes, comme RAG2, montrent une amélioration de la récupération fonctionnelle. Cependant dans des modèles où les LTs et les LBs sont inhibés, il n'est pas possible de distinguer le rôle précis que jouent ces deux types cellulaires (Wu *et al.*, 2012).

La réalisation d'une LMT chez une souris BCKO, souris dans laquelle les LBs sont spécifiquement inhibés et les LTs normaux, favorisent la régénération médullaire se traduisant par une diminution du volume lésionnel et une amélioration de la récupération. Cette amélioration est corrélée à une diminution de la quantité d'anticorps dans le LCR. L'amélioration s'explique du fait que les anticorps produits par les LBs (après transformation en plasmocytes), ont un rôle dans l'activation des molécules du complément via leur fixation sur le récepteur CR3 mais aussi dans l'activation des Mi-M Φ en se fixant sur le récepteur Fc γ R (Ankeny *et al.*, 2009). Les anticorps produits après la LMT par les LBs, lors des douze premières heures, sont des IgM puis leurs productions diminuent au profit des IgG1 et des IgG2, se maintenant pendant des jours après la lésion (Ankeny *et al.*, 2006; Capuz *et al.*, 2022). Les anticorps participent aux mécanismes d'auto-immunité. En effet, les anticorps produits, sont dirigés contre les débris de myéline comme MBP, MAG, OMgP, contre le récepteur au glutamate GluR ou contre l'ADN. L'injection d'anticorps dans une moelle spinale non lésée ou dans un hippocampe sain, est liée à une augmentation de la mort neuronale (Ankeny *et al.*, 2006, 2009). Cependant, une récente étude *in vitro* à partir de neurones sensitifs du DRG, s'intéressant à l'interaction des neurones avec les anticorps, a mis en avant que les anticorps, en se fixant sur les récepteurs neuronaux CD16 et CD32b, modulent la croissance des neurites des neurones. Alors que la fixation sur le CD16 stimule la croissance axonale, la fixation sur le CD32b quant à elle, la réprime. Cela met en avant un système de régulation de la croissance axonale, influencée par l'équilibre entre les cascades de signalisation des récepteurs CD16/CD32b (Capuz *et al.*, 2022).

Les LTs, par la diversité de leurs populations, jouent un rôle à la fois bénéfique et délétère dans la physiopathologie de la LMT. Les LTs communiquent par voie directe et indirecte avec les Mi-M Φ . En effet, ils produisent un ensemble de cytokines et chimiokines comme l'IFN γ , le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-12, le CCL2, le CXCL10 ou encore le CCL5, exacerbant l'activation des Mi-M Φ et le maintien de la réponse inflammatoire (Jones *et al.*, 2005). Ils ont aussi la capacité d'induire l'apoptose cellulaire par contact direct cellule-cellule via la communication ligand-récepteur de mort cellulaire, comme FasL-Fas (Yu & Fehlings, 2011). Cependant ces cellules, en particulier les Th1, produisent en grande quantité des facteurs

trophiques comme le NGF, le BDNF, le NT3 ainsi que de l'IL-10, favorisant la survie cellulaire et la croissance axonale (Moalem *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2009). Les LTs comme les LBs semblent jouer un rôle ambivalent, comme les Mi-MΦ. Une étude s'est intéressée à inhiber, à des temps précis, les LTs et a observé que leur inhibition sept jours après la LMT, au moment de leur pic d'infiltration, permet une diminution des dégâts secondaires et une amélioration de la récupération fonctionnelle. Cependant la poursuite de leur inhibition lors de la phase chronique est liée à une augmentation de la mort des cellules médullaires et un ralentissement de la récupération fonctionnelle (Satzler *et al.*, 2015).

3.1.4. Cicatrice médullaire

La cicatrice médullaire est une structure nécessaire à la protection du tissu nerveux mais limitant la régénération axonale. Ce processus de cicatrisation se met en place à la fin du premier jour de la lésion pour se poursuivre durant les dix jours suivants. On retrouve deux composantes : la cicatrice fibrotique, au centre la cicatrice médullaire et la cicatrice gliale, située autour de la cicatrice fibrotique.

La rupture vasculaire et tissulaire entraîne l'apparition de fibroblastes méningés, de fibroblastes périvasculaires dérivés de cellules stromales et de péricytes de type A qui se mettent à proliférer dans le cœur lésionnel formant ainsi la cicatrice fibrotique (Göritz *et al.*, 2011; Sabelström *et al.*, 2013). La prolifération de ces cellules est accompagnée de l'activation des astrocytes et des cellules microgliales présents au cœur lésionnel amorçant le processus de cicatrisation en éliminant par phagocytose les déchets cellulaires. Elles sont rapidement rejointes, comme décrit précédemment, par un grand nombre de macrophages dérivés de monocytes participant à la phagocytose (Burda & Sofroniew, 2014). Au fur et à mesure que la cicatrice fibrotique devient mature et que les déchets cellulaires sont éliminés, un tissu cicatriciel se forme en son centre. Il est composé de cellules stromales, de progéniteurs de cellules endothéliales, accompagnés de vaisseaux sanguins néoformés mélangés à l'infiltrat de lymphocytes, de macrophages et de neutrophiles. La cicatrice fibrotique est aussi composée d'une dense MEC se développant en concomitance avec le tissu cicatriciel, produit principalement par les astrocytes réactifs et les cellules stromales (Silver & Miller, 2004; Pekny & Nilsson, 2005). La MEC de la cicatrice fibrotique est composée en grande majorité de protéoglycanes de chondroïtine sulfate, *chondroitin sulphate proteoglycans* (CSPG). Les CSPGs, comme les débris de myéline, sont de puissants inhibiteurs de la repousse axonale, ils contribuent négativement à la régénération du réseau axonal médullaire. En effet, les neurones expriment à leur surface le récepteur tyrosine-phosphate σ , *tyrosine phosphatase receptor σ*

(PTP σ), reconnaissant les CSPGs. L'interaction PTP σ -CSPG inhibe les mouvements des cônes de croissance axonaux, nécessaires à la régénération axonale (Shen *et al.*, 2009). La cicatrice fibrotique n'est pas seulement composée de molécules inhibitrices de la régénération axonale. Par exemple, on distingue en grande quantité la présence de laminine favorisant la formation des cônes de croissance et servant de structure facilitant leur adhésion (**Figure 39, 40**) (Sosale *et al.*, 1988). La présence d'une cicatrice fibrotique perdurant de façon chronique est observée dans les modèles de LMTs chez la souris. Chez le rat et l'Homme, dès le début de la phase chronique, la cicatrice fibrotique disparaît progressivement laissant place à des cavités cystiques dépourvues de cellules. La formation de ces cavités et l'environnement acellulaire, diminuent la capacité des axones à se régénérer en agissant comme une barrière imperméable à leur croissance.

La cicatrice gliale est caractérisée par une astrogliose massive au niveau du site de lésion (Barnabé-Heider *et al.*, 2010). En réponse à l'environnement inflammatoire et au manque d'oxygène et de glucose, les astrocytes s'hypertrophient et deviennent hyper réactifs. Ils commencent à proliférer 2 jours après la LMT et continuent pendant 2 semaines, stimulés par les Mi-M Φ M1 pro-inflammatoires (Pekny & Nilsson, 2005). Les astrocytes prolifératifs migrent et s'associent avec leur ramification formant une cicatrice autour du cœur lésionnel (Burda & Sofroniew, 2014). La formation de cette cicatrice est essentiellement réalisée à partir de nouveaux astrocytes et est complète à partir d'un mois après la lésion. Son rôle principal est de confiner les cellules immunitaires inflammatoires à l'intérieur de la zone endommagée afin de protéger le tissu neural sain adjacent. La dysfonction de la cicatrice gliale contribue à la propagation de l'inflammation et par conséquent à des dommages tissulaires plus larges, responsables d'une augmentation des pertes neuronales. Entremêlés avec les astrocytes, on observe aussi quelques OPC exprimant la protéine NG2.

Les nouveaux astrocytes proviennent de la prolifération des astrocytes résidents et de la différenciation des cellules épendymaires ayant proliféré. En fonction de leurs origines, les astrocytes ne vont pas avoir le même rôle dans la physiopathologie de la LMT. Alors que les astrocytes locaux ont un effet inhibiteur sur la repousse axonale, ceux dérivés des cellules épendymaires contribuent à la neuroprotection. Frisen et son équipe, ont généré une lignée de souris, la lignée FoxJ1-CreERT2, dont nous avons parlé précédemment, permettant de suivre et d'identifier les cellules épendymaires ainsi que leurs « progénies ». Grâce à cette lignée de souris, ils ont démontré que la LMT entraîne la prolifération des cellules épendymaires et que le pic de prolifération est situé entre le troisième et le septième jour suivant la LMT. Les cellules

épendymaires contribuent à la génération de 2 millions de nouvelles cellules dans le site de lésion lors du premier mois. Les cellules épendymaires se différencient majoritairement en astrocytes et en quantité plus faible, en oligodendrocytes (**Figure 39, 40**) (Barnabé-Heider *et al.*, 2010; Sabelström *et al.*, 2013; Grégoire *et al.*, 2015; Stenudd *et al.*, 2015).

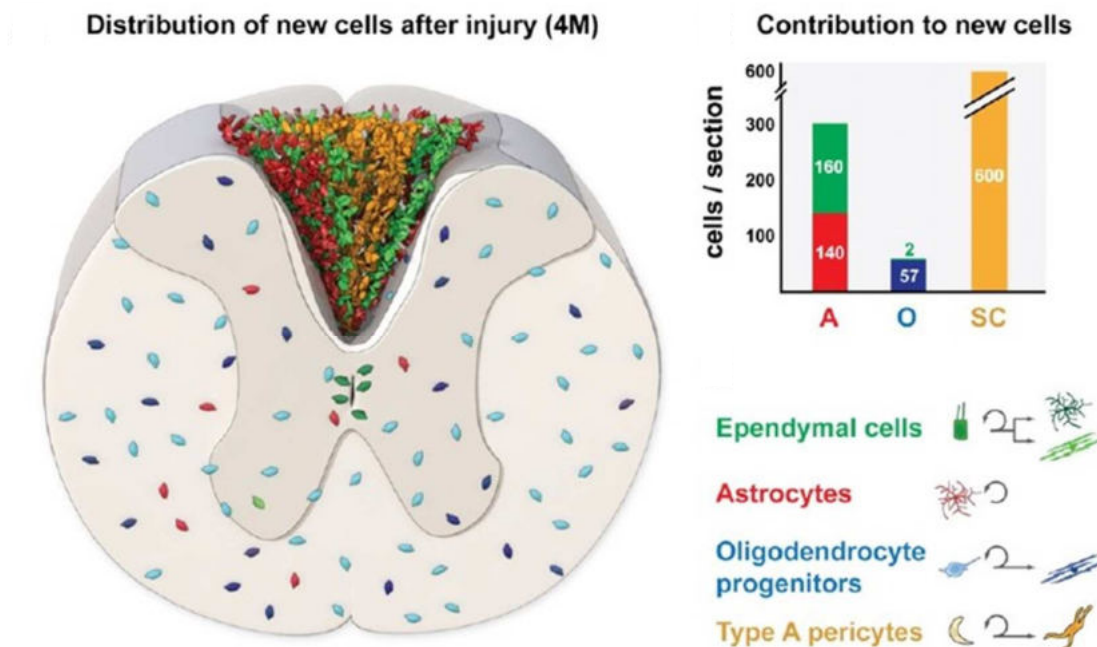


Figure 39 : Représentation schématique de la cicatrice médullaire. Elle est constituée en son centre d'une cicatrice fibrotique composée de cellules stromales originaires des vaisseaux et des méninges, ainsi que de péricytes de type A, provenant des vaisseaux lésés. Entourant la cicatrice fibrotique, la cicatrice gliale est constituée d'astrocytes locaux hyper réactifs ayant proliféré et de nouveaux astrocytes originaires de la migration et la différenciation des cellules épendymaires. Répartis dans l'ensemble de la moelle spinale et entremêlés avec les astrocytes de la cicatrice gliales, les oligodendrocytes sont générés à partir des OPC, eux aussi présents dans l'ensemble de la moelle spinale. Ils sont aussi générés en très faible quantité par les cellules épendymaires activées (Sabelström *et al.*, 2014).

Ces expériences de « *fate mapping* » ont permis d'observer que les astrocytes dérivés des cellules épendymaires, produisent de l'IGF-1, du CNTF et de l'HGF (Sabelström *et al.*, 2013). Une seconde étude a aussi mis en avant que ces astrocytes produisent du BDNF, du GDNF, du NGF, du FGF-2 et de la laminine (Lukovic *et al.*, 2015). Pendant des années il était considéré que les astrocytes étaient néfastes pour la régénération tissulaire après la LMT. Cette vision des astrocytes a depuis été remise en cause et actuellement il est considéré que dans la cicatrice médullaire, la présence d'astrocytes est bénéfique à la repousse axonale, en opposition aux fibroblastes qui eux, sont délétères à la régénération des axones (Anderson *et al.*, 2016).

3.1.5. Régénération

Après une LMT, l'atteinte physique et l'environnement cytotoxique conduit à la démyélinisation des axones s'étendant au-delà de la zone lésionnelle. En effet, la première semaine suivant la lésion, on observe une augmentation du nombre d'oligodendrocytes en nécrose ou en apoptose et continuant pendant 3 mois (McTigue *et al.*, 2001; Plemel *et al.*, 2014). Cependant en parallèle de la mort des oligodendrocytes matures, la génération de nouveaux oligodendrocytes augmente. Ils proviennent de la différenciation des progéniteurs oligodendrocytaires (OPC) et des cellules épendymaires. Les OPC sont distribués dans l'ensemble de la moelle spinale et s'activent après la LMT. Ils sont recrutés et activés par la sécrétion de facteurs trophiques et de chimiokines tels que le CXCL10 ou le PDGF α , par les cellules microgliales en réponse aux zones démyélinisées (Lee *et al.*, 2019). L'activation des OPC se traduit par une différenciation en oligodendrocytes immatures. Après une étape de prolifération, les oligodendrocytes immatures se différencient en oligodendrocytes matures myélinisants, possédant alors la capacité de remyéliniser les axones épargnés et régénérés (Alizadeh *et al.*, 2015). En ce qui concerne les oligodendrocytes provenant des cellules épendymaires, leur quantité est assez faible. Cela s'explique par la différenciation majoritaire des cellules épendymaires en astrocytes du fait de l'absence de facteur de croissance stimulant l'oligodendrogenèse comme l'EGF, le FGF et le PDGF. La présence de débris de myéline contrôle la différenciation des OPC et la myélinisation des axones. En effet, ces molécules inhibent la génération d'oligodendrocytes les jours suivant la lésion, le processus de différenciation se déclenchant seulement lorsque les Mi-M Φ ont phagocyté une grande partie des débris de myéline (Plemel *et al.*, 2014).

En comparaison des axones du système nerveux périphérique (SNP), la capacité de croissance et de régénération des axones du CNS est très faible. L'environnement cellulaire généré par la lésion dans la moelle spinale est délétère à la croissance axonale. En effet, la vascularisation insuffisante, la dérégulation bioénergétique, le défaut de conduction bioélectrique terminale, la suractivation de la réaction immunitaire et son prolongement dans le temps, inhibent la formation de cônes de croissance axonaux (Li, Li, *et al.*, 2018). Une étude dans un modèle de lésion médullaire au niveau des cornes dorsales, induisant la formation d'une faible cicatrice médullaire, a conclu que 30% des axones sensitifs se régénéraient spontanément (Curcio & Bradke, 2018). Cependant lors d'une LMT dorsale plus importante s'étendant jusqu'aux cornes ventrales, la régénération au travers de la cicatrice médullaire est quasi inexistante. La reconstruction des réseaux axonaux résulte d'une plasticité permettant la

formation d'un réseau axonal contournant la cicatrice médullaire et faisant le lien entre les réseaux sectionnés. (Sofroniew, 2018).

Lors de la lésion, la destruction physique de l'axone provoque une exposition du milieu intracellulaire au milieu extracellulaire responsable d'une dérégulation de l'homéostasie ionique. On observe une augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire se propageant jusqu'au soma du neurone. Cela a pour effet d'induire les processus de régénération, se traduisant par une augmentation de la synthèse de molécules, d'un réarrangement du cytosquelette local et de la formation d'un complexe vésiculaire formant un « patch de fermeture » (Erez *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2013). Cette réponse de l'axone, a pour but de limiter les échanges ioniques et ainsi de rétablir l'homéostasie. Elle est accompagnée par un autre mécanisme limitant l'entrée d'ions dans le milieu intracellulaire. En effet, les ions Ca^{2+} ont la capacité de rejoindre le milieu intracellulaire en traversant la membrane de l'axone via des canaux ioniques. Dans un modèle de contusion médullaire, il a été mis en évidence que les axones étaient capables de fermer ces canaux afin de limiter l'entrée du Ca^{2+} et contribuer au retour de l'homéostasie ionique. L'incapacité des axones à fermer ces canaux conduit à une dégénérescence de celui-ci (Williams *et al.*, 2014). A l'opposé, l'entrée de Ca^{2+} est nécessaire pour l'induction de la régénération. Une concentration extracellulaire de Ca^{2+} faible, est responsable d'absence de réponse de l'axone et de ce fait, d'une dégénérescence de celui-ci (Spira *et al.*, 1993). Une fois la membrane refermée, le cytosquelette de l'extrémité de l'axone se réarrange afin de former un cône de croissance. Cette structure dynamique, indispensable à la croissance de l'axone, se forme et se rétracte constamment. Ce mécanisme, dépendant de la présence d'ATP, permet à l'axone de rechercher une cible lui permettant de réaliser une synapse (identifiable par immunohistochimie en utilisant des anticorps dirigés contre les transporteurs vésiculaires, *vesicular glutamate transporters*, vGlut1 et 2) et de se stabiliser. La réalisation de cultures de DRG *in vitro*, a mis en avant que la formation du cône de croissance est dépendante de la présence de mitochondries dans l'extrémité de l'axone. Les mitochondries présentes dans le soma du neurone migrent jusqu'aux cônes de croissance afin de libérer de l'ATP localement. Cependant, alors que *in vitro* on constate que 20 à 30% des mitochondries restent statiques dans le soma, *in vivo*, on observe qu'une très faible quantité de mitochondries migrent jusqu'à l'extrémité de l'axone empêchant le dynamisme du cône de croissance et sa stabilisation, conduisant à sa dégénérescence (Maday *et al.*, 2014). Des études ont essayé de limiter la dégénérescence des axones en stabilisant les cônes de croissances, cela a permis d'améliorer la repousse axonale (Ruschel *et al.*, 2015). Après la lésion, l'environnement cellulaire composé

des cytokines pro-inflammatoires, de fragments de myéline, d'une dense MEC constituée de protéoglycanes, ainsi que d'inhibiteurs de la croissance axonale sont délétères à la régénération axonale et limite la reconstruction des réseaux axonaux (Anderson *et al.*, 2016).

Les réseaux neuronaux et axonaux, en condition physiologique, sont stabilisés par la présence de molécules de la MEC formant un réseau appelé le perineural net (PNN). Le PNN est composé d'un squelette d'hyaluronane, de CSPGs agrégés, de tenascines et de la protéine de liaison hyaluronane et protéoglycane 1 (HAPLN1), essentielle à la formation et à la stabilisation des structures du PNN. Dans la moelle épinière celui-ci encapsule les motoneurones permettant leur protection et la stabilisation des connexions neuronales. Cependant, agissant comme un mur étanche, il restreint la plasticité et le remodelage des réseaux axonaux (Carulli *et al.*, 2006; Irvine & Kwok, 2018). Après lésion médullaire, l'inflammation et le remodelage de la MEC provoquent une disruption du PNN associée à un dysfonctionnement des réseaux neuronaux préservés. Il est possible d'observer le PNN en utilisant une agglutinine se fixant sur les glycosaminoglycanes situés sur les chaînes de CSPG, la *Wisteria floribunda agglutinin* (WFA). La mesure chez le rat de l'intensité du WFA, deux semaines après la lésion, montre une diminution de la densité de sa structure suivie d'une augmentation six semaines après la lésion. Fait intéressant, si cette structure dynamique joue un rôle important dans la régénération axonale après lésion, la réalisation d'exercice de rééducation comme la marche sur un tapis roulant, diminue l'intensité du WFA six semaines et est associée à une augmentation du nombre de connexions synaptiques (Grycz *et al.*, 2022). Le PNN joue donc un double rôle dans la physiopathologie de la LMT. Son maintien les premiers jours, préserve les neurones du milieu extracellulaire mais la plasticité et la régénération des réseaux axonaux nécessitent une diminution de sa densité lors de la phase chronique. Dans une étude portant sur un modèle de lésion de nerfs périphériques, les auteurs se sont intéressés au rôle que pouvait jouer le PNN sur la transmission axonale. Ils ont mis en avant que la lésion entraîne une dégradation, dans la moelle spinale, du PNN enveloppant les neurones à proximité des neurones cibles du nerf périphérique lésé. La diminution de la quantité de PNN autour de ces neurones induit une augmentation de leur activité entraînant une augmentation de la transmission nociceptive. Les auteurs ont aussi observé que la dégradation est médiée par les $M\mu$, grâce à l'identification de co-marquages immunohistochimiques des marqueurs CD68 et WFA, trois jours après la lésion du nerf. Ceci ayant été confirmé par l'absence de dégradation du PNN et de douleurs neuropathiques lorsqu'ils ont inhibé les cellules microgliales (Tansley

et al., 2022). Par la sécrétion de MMPs, en particulier la MMP9, ils dégradent les CSPGs constituant le PNN puis recyclent les fragments en les phagocytant (Kawasaki *et al.*, 2008).

L'absence de régénération spontanée nécessite donc la présence de cellules stimulant la croissance axonale et modulant le milieu extracellulaire afin de générer un environnement cellulaire favorable à l'établissement des cônes de croissance. Les acteurs principaux de la régénération axonale sont les Mi-M Φ . Alors que pendant la phase aiguë de la lésion, leur action conduit à la génération d'un environnement cellulaire pro inflammatoire et à la formation de la cicatrice médullaire inhibant la croissance axonale, comme décrit précédemment, la phagocytose des débris de myéline, des débris cellulaires et des fragments de MEC, induit un « switch » phénotypique des M1. Chez la souris, l'activité phagocytaire est à son maximum sept jours après la lésion et commence à décroître à partir du quatorzième jour (Xu *et al.*, 2021). L'accumulation des Mi-M Φ M2c induit le début de la phase de régénération tissulaire deux à trois semaines après la lésion et se déroule pendant plusieurs mois chez la souris (Xu *et al.*, 2021). Les Mi-M Φ M2 sécrètent un ensemble de cytokines telles que l'IL-4 et l'IL-10, stimulant la formation d'un environnement cellulaire permissif à la régénération axonale, ainsi que du TGF- β , de l'IGF1 et du VEGF stimulant la survie cellulaire, la gliogenèse, la remyélinisation et l'angiogenèse (Gensel & Zhang, 2015). Même si la quantité de Mi-M Φ M1 diminue par leur polarisation en Mi-M Φ M2, ils restent présents et participent à la régénération.

Chez le rat, 60 jours après la lésion, les Mi-M Φ présentent un deuxième pic de population détectables encore 180 jours après la lésion. Ils contribuent à la présence de métabolites oxydatifs et inflammatoires au cœur lésionnel. En effet, à l'opposé de celle émergeant après la lésion, l'inflammation latente en phase chronique semblerait participer à la régénération tissulaire et axonale. Son inhibition conduit à une diminution de la myélinisation et de la récupération fonctionnelle. Cependant la présence des métabolites est responsable d'une hypersensibilité à la pression mécanique (Beck *et al.*, 2010; Dulin *et al.*, 2013). Malgré la présence des acteurs cellulaires et la mise en place des mécanismes de régénération tissulaire et axonale, la régénération après la LMT reste un processus limité n'aboutissant pas à une cicatrisation fonctionnelle du tissu. Du fait de la maturation de la cicatrice médullaire et de la persistance de molécules inhibitrices de la croissance axonale, le tissu médullaire cicatriciel se stabilise au cours du temps en une barrière hétérogène à la poursuite de la régénération des réseaux axonaux. Sans intervention exogène, en particulier lors des phases précoces, la croissance axonale fonctionnelle ne peut se réaliser.

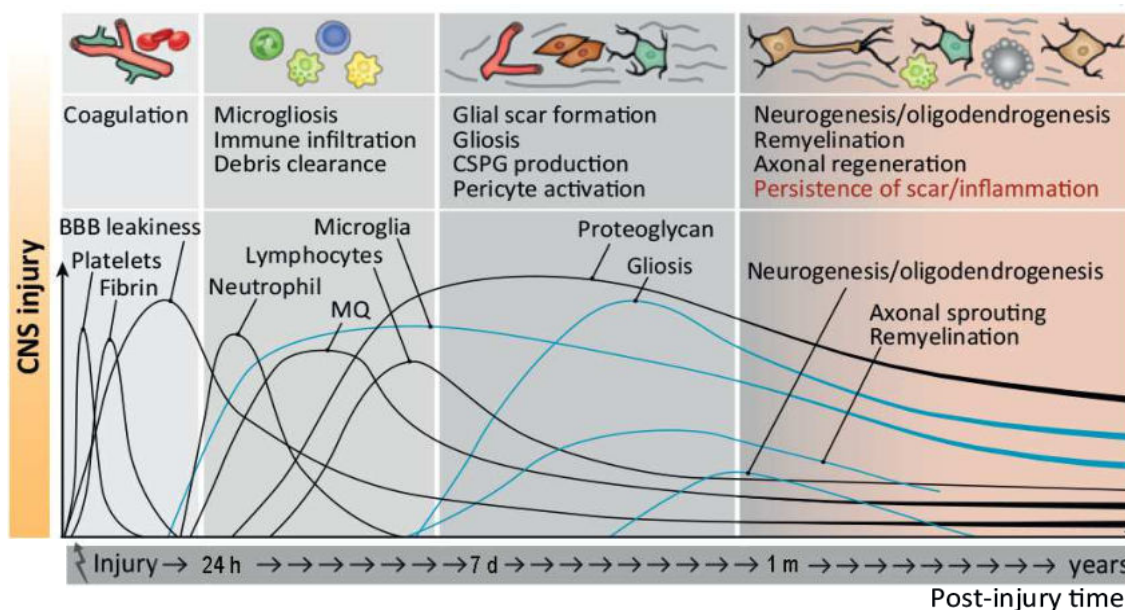


Figure 40 : Chronologie d'apparition des événements cellulaires et moléculaires se déroulant après la LMT. La rupture des vaisseaux sanguins lors la phase immédiate conduit à une inflammation, augmentant la perméabilité de la BBB. L'activation microgliale et le recrutement des premiers neutrophiles lors de la phase aiguë provoque l'infiltration des lymphocytes et des macrophages participant à la phagocytose du cœur lésionnel et à la formation de la cicatrice médullaire constituée de protéoglycanes et formée par la gliose astrocytaire et les cellules stromales. En parallèle de la formation de la cicatrice médullaire les premiers mécanismes de régénération axonale et de myélinisation se mettent en place favorisés par une neurogenèse et oligodendrogenèse. Ces mécanismes se poursuivent lors de la phase chronique et restent présents pendant plusieurs mois (Shechter and Schwartz, 2013, modifié).

La LMT entraîne une physiopathologie complexe faisant intervenir un grand nombre d'acteurs cellulaires et moléculaires à des instants précis lors des phases aiguë et chronique. Il est nécessaire d'arriver à comprendre précisément la temporalité d'apparition des différents mécanismes d'activation, de protection et de régénération. Le développement d'une thérapie efficace reposera sur la capacité à influencer précisément ces mécanismes afin de limiter les réponses cellulaires dans la phase aiguë de la physiopathologie, sans pour autant les inhiber complètement.

4. Conséquences périphériques

La LMT, par la rupture des axones, supprime la communication avec les organes innervés par les projections nerveuses en aval de la lésion. Pour les systèmes moteurs et sensitifs, les pertes fonctionnelles sont dépendantes de l'étage médullaire atteint. En ce qui concerne le système végétatif, comme décrit précédemment, alors que les projections du système nerveux sympathique sont localisées sur l'ensemble des segments médullaires thoraciques et les premiers segments lombaires, celles du système parasympathique (mise à part les projections innervant la vessie et l'appareil génital) quittent la moelle spinale au niveau du

tronc cérébral. Lors d'une LMT on observe alors généralement une perte fonctionnelle du système sympathique alors que la majorité de l'innervation parasympathique est préservée. Cela a pour conséquence d'induire au moment de la LMT un « choc neurogénique » dérégulant l'équilibre des efférences sympathiques/parasympathiques favorisant l'action parasympathique, responsable de perturbations respiratoires, gastrointestinales, thermorégulatrices ou encore cardiaques (Henke *et al.*, 2022). Comme par exemple, lors d'une lésion au-dessus de l'étage médullaire Th6, la rupture des axones induit une activation sympathique responsable d'une hypertension pendant les 3 à 4 minutes suivant la LMT, mais du fait de la perte d'efférences sympathiques, le système parasympathique induit ensuite, une bradycardie et une hypotension sévère. La diminution de la perfusion a des effets délétères sur les organes, en particulier sur le cerveau où elle entraîne une dysfonction cérébrovasculaire. (Popa *et al.*, 2010). Le cerveau représente 2% de la masse corporelle mais sa consommation compte pour 20% de la consommation énergétique du corps humain. La diminution de la perfusion et de l'apport énergétique sont responsables d'une augmentation du risque d'accident vasculaire cérébral (AVC) de 300 à 400% et d'un dysfonctionnement cognitif (Phillips & Krassioukov, 2015).

De plus, la réponse inflammatoire entraînée par la LMT, est associée à la présence de TNF- α , de l'IL-1 α , 1 β et de l'IL-6 dans la circulation sanguine, communiquant vers les organes périphériques (Anthony & Couch, 2014). Ces messagers pro-inflammatoires induisent une activation systémique du système immunitaire. On retrouve alors dans la rate, les reins, les poumons ou encore le foie, la présence de molécules du complément activées, de cytokines, de chimiokines et de neutrophiles (Lenz *et al.*, 2007; Gris *et al.*, 2008). La présence de cytokines inflammatoires dans le foie entraîne une réponse appelée *acute phase response* (APR). En réponse aux cytokines, les hépatocytes, les macrophages tissulaires et les cellules de Kupffer, produisent du CCL2 et du CXCL1 dans la circulation sanguine qui se retrouvent alors dans la moelle spinale (Anthony & Couch, 2014). Cela a pour effet d'augmenter la clairance et la phagocytose des cellules nécrotiques et apoptotiques, le chimiotactisme et l'adhérence des macrophages et des lymphocytes, mais aussi une protection contre les ROS (Campbell *et al.*, 2005). L'APR modifie aussi les fonctions hépatiques. On observe des perturbations dans la filtration des hématies, dans les fonctions métaboliques et dans le stockage du glycogène, des vitamines, des minéraux et du fer (Farkas & Gater, 2018; Goodus *et al.*, 2018) conduisant à une aggravation de la perturbation de l'homéostasie. La première semaine suivant la LMT, les changements systémiques sont importants avec une augmentation de la quantité de neutrophiles,

de glucocorticoïdes, de protéines, des molécules du complément et une perturbation dans les concentrations d'électrolytes et de fer ionique (Albayar *et al.*, 2019). Un mois et demi après la lésion, les concentrations d'ARNm de *tnfa*, *il1a*, *1b* et de *ccl2* sont encore élevées dans le foie (Goodus *et al.*, 2018) et persistent pendant au moins six mois, entretenues en partie par la présence de bactéries dans la circulation sanguine provenant de l'intestin. En effet, la perturbation du système végétatif et la présence de cytokines et d'adipokines pro-inflammatoires systémiques conduisent à une augmentation de la perméabilité intestinale dès les premières 24 heures suivant la LMT (Goodus & McTigue, 2020). Au cours du temps, chez les patients souffrant d'une LMT chronique, l'inflammation aiguë se transforme en une inflammation périphérique de bas grade et on retrouve dans leur sérum la présence d'IL-6, 1Ra et de TNF- α (Jeffries & Tom, 2021).

5. Conséquences cérébrales

Le cerveau est en communication directe avec la moelle spinale par les réseaux axonaux, le LCR, la lymphe et la circulation sanguine. Celui-ci est donc directement affecté par la LMT. L'analyse par IRM de cerveaux de patients paraplégiques réalisant un mouvement volontaire avec un doigt n'ayant pas subi de perte fonctionnelle (*finger movement evoked*), montre des différences dans l'activation des aires cérébrales responsables de la locomotion. En comparaison avec des patients contrôles, l'activation du cortex moteur primaire, du cortex pariétal et du cervelet est beaucoup plus importante. Cela s'observe aussi avec le cortex primaire somatosensoriel qui se retrouve altéré suite à l'absence d'afférences sensorielles (Endo *et al.*, 2009).

La présence de cytokines pro-inflammatoires, de facteurs neurotrophiques, de DAMPs et de cellules dans le LCR, dans le système glymphatique et dans la circulation sanguine (Davies *et al.*, 2007; Capirossi *et al.*, 2020) conduit à l'émergence d'une inflammation cérébrale. En effet, la présence de récepteurs sensibles aux cytokines pro-inflammatoires sur les cellules endothéliales mais aussi de macrophages (espaces périvasculaires) et de cellules dendritiques (méninges et plexus choroïde) à l'interface sang-cerveau, favorise la génération de la réponse inflammatoire cérébrale. Les macrophages et les cellules dendritiques sont capables de détecter la présence d'antigènes dans le sang, le LCR et la lymphe puis de les présenter aux LTs « patrouillant » en dehors du parenchyme dans ces compartiments liquidiens et infiltrant transitoirement le parenchyme.

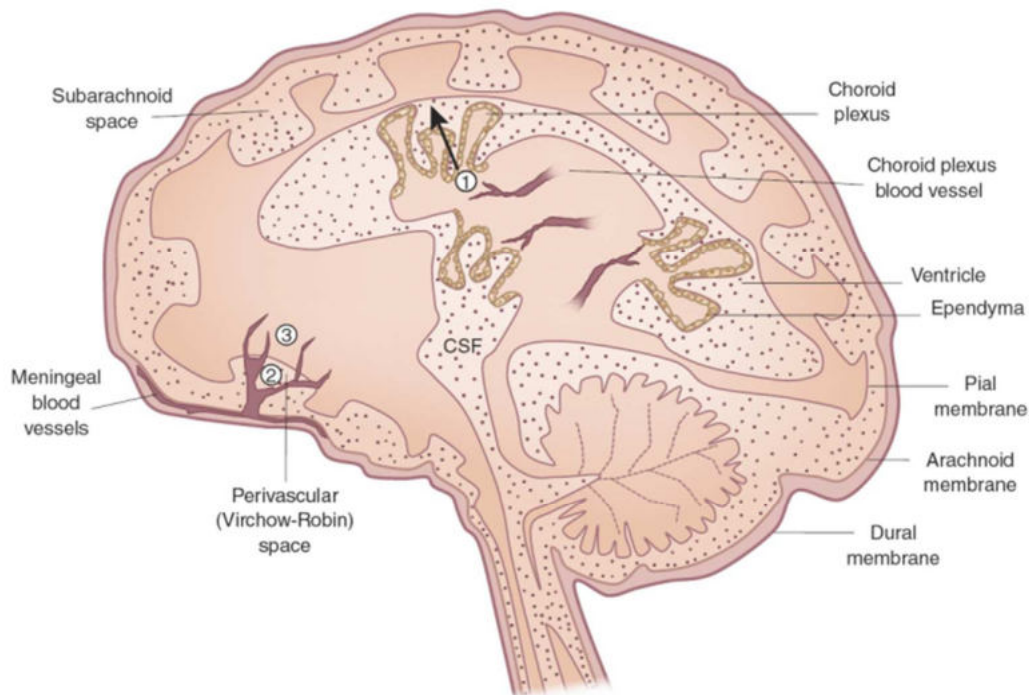


Figure 41 : Schéma représentant les différentes voies d'entrée des lymphocytes dans le parenchyme cérébral. Les lymphocytes pénètrent dans le parenchyme cérébral en empruntant les capillaires du plexus choroïde (1), les espaces de Virchow-Robin (2) et les veinules post capillaires (3) (Ousman and Kubes, 2012).

Les lymphocytes traversent la BBB au niveau des capillaires du plexus choroïde, des espaces de Virchow-Robin, des artères profondes ou encore au niveau des veinules post capillaires. Ils migrent le long de l'endothélium vasculaire et de la *glia limitans* et pénètrent par diapédèse dans le parenchyme. Les cellules du plexus choroïde expriment à leur surface, des molécules d'adhésion telles que les selectines P et E ainsi que des molécules d'adhésion intercellulaire, *intercellular adhesion molecules* (ICAM) facilitant l'entrée des LTs dans le parenchyme à ce niveau, c'est pour cela que 80% des cellules immunitaires composant le LCR sont des LTs (**Figure 41**) (Ousman & Kubes, 2012).

Les cellules microgliales sont des cellules réagissant rapidement en cas de variation, même faible, de leur milieu. L'entrée de cytokines pro-inflammatoires et autres molécules comme l'ATP dans le parenchyme ainsi que de LTs activés, favorise l'expression de marqueurs d'activation des cellules microgliales, comme le complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II), le CD80 et le CD86 (Neumann, 2001). Elles libèrent alors des chimioattractants et des cytokines tels que le TNF- α et l'IL-1, favorisant le recrutement de cellules circulantes. La diminution de l'activité neuronale est aussi corrélée à l'activation des cellules microgliales. En effet, l'activité neuronale induit une diminution de l'expression du CMH II par les cellules microgliales et les astrocytes périphériques aux neurones. Comme la rupture de la

communication cellules microgliales/neurones par l'intermédiaire du CD200R-CD200, entraînant aussi l'activation microgliale (Ousman & Kubes, 2012).

L'activation microgliale dans le cerveau est liée à des modifications cellulaires et tissulaires perturbant la neurogenèse et la plasticité. Une étude réalisée en 2012 à Marseille s'est intéressée aux conséquences que pouvaient avoir une LMT cervicale sur la neurogenèse cérébrale chez le rat. Ils ont mis en évidence qu'en phase aiguë, la LMT diminue la génération de nouveaux neurones dans le OB et le DG et qu'en phase chronique, alors que la neurogenèse du OB retourne à un niveau basal, celle du DG reste perturbée. Ils ont corrélé cette perturbation de la neurogenèse avec une augmentation de l'activation microgliale dans les aires correspondantes ainsi qu'une diminution de la quantité de BDNF (Felix *et al.*, 2012).

Les études suivantes ont confirmé que les cellules microgliales après une LMT, dans l'hippocampe mais aussi dans le thalamus et le cortex, s'activaient. L'activation et la génération d'un environnement pro-inflammatoire dans l'hippocampe sont associées à une neurodégénération et à une diminution des performances cognitives, des capacités mémorielles et d'état anxieux et « dépressifs » chez la souris (Wu, Stoica, *et al.*, 2014; Wu, Zhao, *et al.*, 2014; Maldonado-Bouchard *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016). L'intensité de la LMT est proportionnelle aux conséquences cognitives. Une étude a comparé trois paradigmes de contusions médullaires (légère, modérée et sévère) et a mis en évidence que seuls les rats ayant subi une lésion modérée ou sévère présentent une réactivité microgliale, une diminution de la neurogenèse et de faibles performances cognitives (Wu *et al.*, 2016). Chez la souris, l'administration du PLX5622 au moment de la LMT et tout au long de la pathologie, permet d'inhiber l'activation microgliale cérébrale et de restaurer des fonctions cognitives identiques aux animaux témoins (Li, Ritzel, *et al.*, 2020).

Ces résultats sont en adéquation avec les observations réalisées chez l'humain. Comme dans une étude où les auteurs se sont intéressés aux états anxieux et dépressifs chez des patients au moment de leur prise en charge médicale, de la sortie de l'unité de soins et six mois après la sortie. Au moment de la prise en charge, ils ont classé les patients en fonction de leurs performances cognitives après la LMT, constituant deux groupes, faibles capacités cognitives et hautes capacités cognitives. Ils ont mis en évidence que six mois après la sortie, seuls les patients ayant de plus faibles capacités cognitives suite à la LMT développent un état anxieux et dépressif alors que ceux ayant conservé de bonnes fonctions cognitives sont moins sujets à ces états. Cela met en avant l'étendue des conséquences de la LMT, particulièrement sur les

fonctions cognitives et sur la réactivité microgliale perdurant plusieurs mois après la LMT, responsable de perturbations cérébrales majeures (Craig *et al.*, 2017).

La LMT entraîne une réactivité aiguë générale de l'organisme et l'installation chronique d'une inflammation systémique de bas grade. L'ensemble des cellules de l'organisme sont donc en contact permanent avec un ensemble de signaux de danger et de cytokines inflammatoires induisant une réactivité de l'ensemble des cellules de l'organisme différente de leur état observé en condition physiologique.

Chapitre III : Stratégies thérapeutiques

Les premières descriptions médicales des LMTs datent de 1700 avant notre ère. Consignées par un chirurgien de l'ancienne Egypte sur un papyrus, il est fait mention de six cas de LMTs et de l'impossibilité de les soigner (**Figure 42**) (Breasted, 1924). Depuis plusieurs siècles, différentes approches ont été réalisées afin de permettre de soigner ce traumatisme mais sans permettre la mise en place d'une thérapie efficace. Depuis quelques décennies, l'amélioration des connaissances et le développement de nouvelles technologies ont permis d'améliorer la prise en charge des patients ainsi que leur qualité de vie. Malheureusement malgré le développement de traitements prometteurs, aucun ne permet actuellement une récupération complète des fonctions motrices ou neurologiques perdues. Au-delà des pertes fonctionnelles empêchant les patients de se déplacer, on observe un ensemble de complications liées à la perte de la conduction nerveuse entre les organes et le SNC. En fonction de l'étage médullaire lésé et du caractère de la lésion (complète ou incomplète), on observe des troubles respiratoires, cardiovasculaires, urologiques, génitaux, ano-rectaux, digestifs, neuro-orthopédiques, métaboliques, anxio-dépressifs, la formation d'escarres, des phénomènes de spasticité ainsi qu'un risque augmenté de contracter des infections telles que les infections pulmonaires.

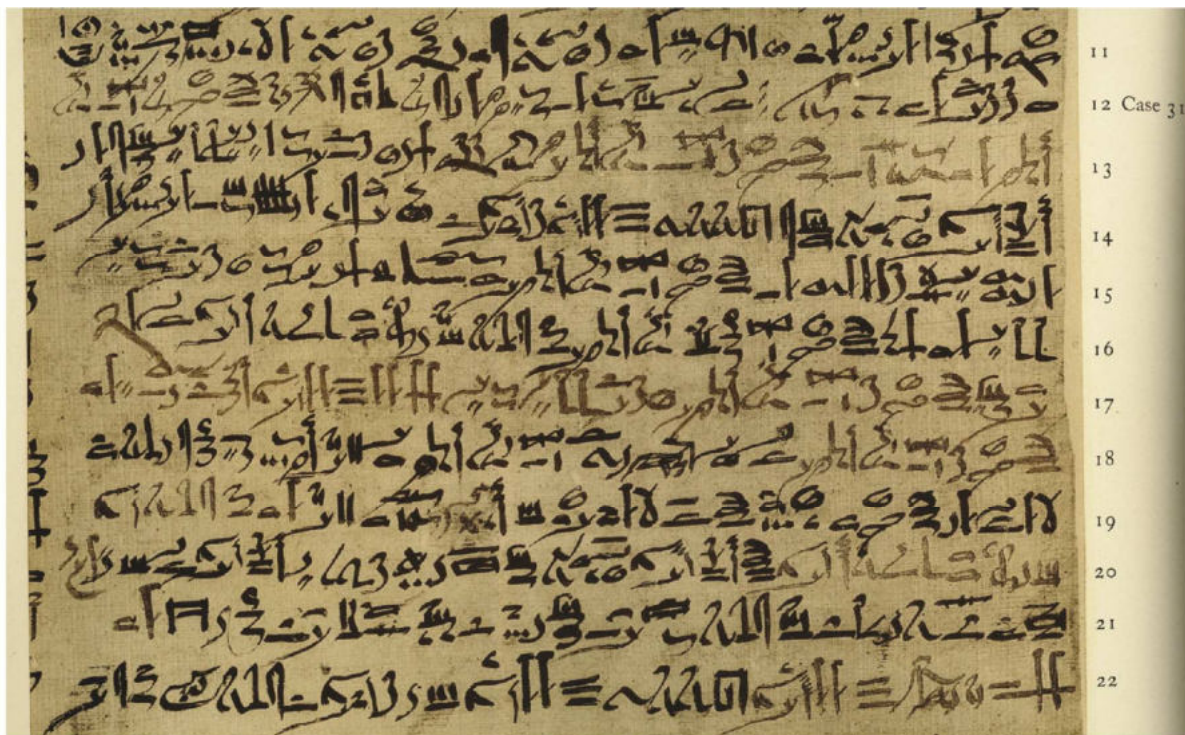


Figure 42 : Page de “The Edwyn Smith surgical papyrus” décrivant les LMTs sous l’Egypte ancienne en 1700 avant notre ère. (Domaine public)

Le but des stratégies thérapeutiques mises en place afin de soigner les LMTs, est de restaurer un réseau axonal fonctionnel. On distingue différentes approches comme la dégradation de la matrice extracellulaire inhibitrice de la repousse axonale au sein de la cicatrice médullaire, le blocage des débris cellulaires et de myéline, la stimulation de la croissance axonale, la stimulation de la gliogenèse, de la neurogenèse et de la survie cellulaire ou encore le remplacement des cellules mortes du tissu par la réalisation de transplantations cellulaires. Dans cette section, nous allons aborder les différentes approches thérapeutiques mises en place en recherches fondamentale et clinique, illustrées par des exemples précis, mais ne représentant pas une liste exhaustive de l'ensemble des thérapies qui sont ou ont été essayées pour traiter les LMTs. Nous nous intéresserons particulièrement aux transplantations de cultures primaires de bCGOs.

1. Pratiques cliniques actuelles

Lors d'une LMT, le temps s'écoulant entre l'atteinte et la prise en charge du patient est un des paramètres importants. En effet l'expression « *time is spine* » permet de se rendre compte de l'importance de la mise en place précoce, durant la phase aiguë, de stratégies neuroprotectrices. La destruction des axones, la mort cellulaire, les processus inflammatoires, l'ischémie ou encore l'œdème peuvent irrémédiablement conduire à une perte du tissu nerveux. C'est pour cela que dès l'arrivée des secours, l'utilisation d'un collier cervical et d'un plan dur permet l'immobilisation de l'axe craniale-spinal afin d'éviter toutes lésions supplémentaires pouvant survenir pendant le transport vers les unités de soins. En parallèle, les constantes vitales comme le rythme cardiaque, la respiration et l'hémodynamisme sont surveillées afin de conserver une perfusion médullaire optimale et éviter toute hypotension responsable d'une exacerbation de la lésion médullaire. Il est recommandé par l'agence américaine des neurochirurgiens de maintenir une pression systolique inférieure à 90 mmHg, une pression artérielle entre 85 et 90 mmHg et un taux d'oxygénation supérieur à 90%, dès la prise en charge et pendant les sept premiers jours suivant le traumatisme (Resnick, 2013).

Une fois en unité de soins, le patient subit un bilan radiologique rachidien, un scanner rachidien et une IRM médullaire en urgence, afin d'identifier les atteintes médullaires ainsi qu'un bilan biologique standard, complété par une calcémie et une natrémie. Une intervention chirurgicale est alors réalisée afin de diminuer les effets directs de l'altération structurelle engendrée par l'impact initial sur la colonne vertébrale. Cette approche chirurgicale a pour but de réaligner la colonne vertébrale et de stabiliser la moelle spinale. En fonction du type de

lésion, des supports orthopédiques sont utilisés tels que les broches ou les implants métalliques. Cela permet de diminuer la compression médullaire occasionnée par les dommages osseux ou ligamentaires. En effet, diminuer la compression médullaire est très important car celle-ci exacerbe les phénomènes ischémiques et de ce fait potentialise la lésion secondaire (Ahuja *et al.*, 2017). On observe de meilleurs résultats en terme de récupération neurologique lorsque l'intervention est pratiquée dans les vingt-quatre premières heures suivant le traumatisme (Fehlings *et al.*, 2012).

Afin de déterminer cliniquement les étages médullaires atteints et les fonction motrices et sensibles perdues, les cliniciens ont recours à l'utilisation d'une échelle définie par l'*American Spinal Cord Injury Association* (ASIA). Cette échelle appelée échelle de dépréciation ASIA, *ASIA impairment scale* (AIS) est déterminée grâce à la capacité du patient à réaliser des mouvements définis et sur sa sensibilité tactile légère (bord plat d'une épingle) et douloureuse (pique d'épingle).

Afin de définir le score AIS, un ensemble d'items présentés dans la **figure 43**, sont analysés. Ces items permettent d'isoler les différents dermatomes et myotomes encore fonctionnels, et de ce fait l'étage médullaire le plus caudal encore fonctionnel.

Pour la composante sensitive, un score de 0 à 2 (ainsi que NT lorsque le test ne peut être réalisé) est défini :

- 0 : Absence de sensibilité.
- 1 : Sensibilité altérée (le patient ne fait pas de différence entre la pointe et le bord plat de l'épingle).
- 2 : Sensibilité normale.

Pour la composante motrice, ce score est défini entre 0 et 5* (ainsi que NT lorsque le test ne peut être réalisé) :

- 0 : Paralysie totale.
- 1 : Contraction palpable ou visible.
- 2 : Mouvement actif, gamme complète de mouvements avec élimination de la gravité.
- 3 : Mouvement actif, gamme complète de mouvement contre la gravité.
- 4 : Mouvement actif, amplitude totale des mouvements contre la gravité et une résistance modérée dans une position spécifique du muscle.

- 5 : Mouvement actif normal, amplitude totale des mouvements contre la gravité et résistance totale dans une position musculaire spécifique attendue d'une personne non handicapée.

- 5* : Mouvement actif normal, amplitude totale des mouvements contre la gravité et résistance suffisante pour être considérée comme normale si les facteurs d'inhibition identifiés, c'est-à-dire la douleur et la désuétude, ne sont pas présents.

Grâce à cette classification, les cliniciens peuvent définir le niveau neurologique (niveau médullaire où les fonctions motrices et sensitives sont conservées), le niveau sensoriel et le niveau moteur de la LMT :

Le niveau neurologique de la lésion est déterminé en identifiant le segment le plus caudal de la moelle avec une sensation intacte et une force de la fonction musculaire antigravitaire (grade 3 ou plus) des deux côtés du corps.

Le niveau sensoriel se réfère au dermatome intact le plus caudal pour la sensation de toucher léger et de piqûre d'épingle (Score = 2).

Le niveau moteur fait référence au myotome le plus caudal avec une fonction musculaire clé d'un grade d'au moins 3 à l'examen moteur.

Les lésions de la moelle épinière sont classées en termes généraux de complète ou incomplète sur le plan neurologique. Ces termes ne définissent pas l'état de la moelle épinière (rupture complète ou incomplète du cordon médullaire) mais l'état de conservation des fonctions sensorielles ou motrices dans les segments sacrés les plus caudaux, c'est-à-dire la préservation de la sensation de toucher léger ou de piqure d'épingle au dermatome S4-5, de la pression anale profonde ou de la contraction volontaire du sphincter anal. On classe alors le degré d'atteinte de la lésion par un score AIS allant de A à E :

- A complète : aucune fonction motrice ou sensorielle n'est préservée dans les segments sacrés S4-S5.

- B sensorielle incomplète : la fonction sensorielle mais pas motrice est conservée sous le niveau neurologique et comprend les segments sacrés S4-S5. Aucune fonction motrice n'est préservée à plus de trois niveaux au-dessous du niveau moteur de chaque côté du corps.

- C moteur incomplète : la fonction motrice est préservée au-dessous du niveau neurologique. Plus de la moitié des fonctions musculaires clés situées en dessous du niveau neurologique de la lésion ont un grade musculaire inférieur à 3 (Grades 0-2).

- D moteur incomplète : la fonction motrice est préservée au-dessous du niveau neurologique. Au moins la moitié (la moitié ou plus) des fonctions musculaires clés sous le niveau neurologique ont un grade musculaire ≥ 3 .
- E normal : les fonctions sensorielles et motrices sont considérées comme normales dans tous les segments médullaires alors que le patient présentait des déficits antérieurs.

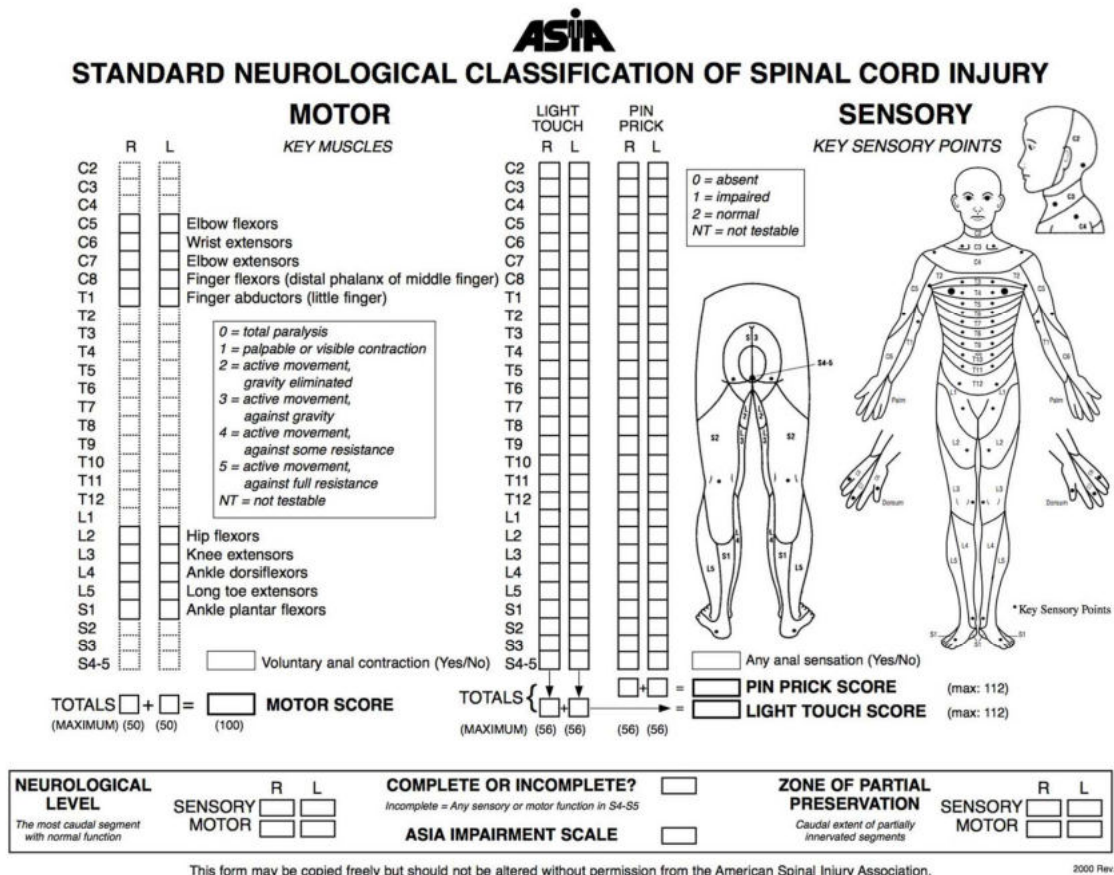


Figure 43 : Support à destination du clinicien permettant de tester les fonctions motrices et sensorielles du patient afin de déterminer le score AIS.

Actuellement aucune approche thérapeutique mis à part les protocoles de neuroprotections, n'a montré d'intérêt clinique chez l'Homme. Seule la prise en charge du patient dans un centre adapté fournissant une rééducation adaptée et intensive permet d'améliorer les récupérations des fonctions sensorimotrices, pendant les 6 premiers mois suivant la LMT.

2. Thérapies étudiées

2.1. Approche pharmacologie

2.1.1. Modulation de la matrice extracellulaire

L'une des limites à la récupération fonctionnelle après une LMT est la composition de la MEC. Les CSPGs ou encore les débris de myéline et de cellules ont un effet inhibiteur sur la repousse axonale. C'est pour cela que différentes études se sont intéressées à l'élimination de ces molécules. Parmi ces études, on distingue deux approches ayant des effets intéressants dans des modèles animaux. Les chondroïtinases ABC sont des enzymes dégradant les CSPGs inhibiteurs de la repousse axonale, présent dans la MEC. La dégradation des CSPGs permet d'induire une repousse axonale plus importante et une meilleure récupération fonctionnelle (Shinozaki *et al.*, 2016).

Les débris de myéline, en particulier Nogo-A, ont un puissant effet inhibiteur sur la repousse des axones. L'utilisation d'Ac bloquant Nogo-A, le blocage de son récepteur ou encore la délétion de son gène dans une souris transgénique, stimule la croissance des axones et la récupération fonctionnelle après la LMT. Chez l'Homme une étude basée sur l'utilisation d'Ac bloquant Nogo-A a permis de démontrer la faisabilité de cette approche, mais n'a pas permis de conclure sur l'efficacité de ces Ac (Zhao *et al.*, 2013; Kucher *et al.*, 2018; Schneider *et al.*, 2019).

2.1.2. Anti-inflammatoire

Les heures suivant la LMT, une réponse immunitaire inflammatoire délétère à la récupération tissulaire se met en place. L'efficacité de l'utilisation d'anti-inflammatoires ou d'immunorégulateurs n'est pas totalement prouvée. Dans la bibliographie on observe des études montrant un effet bénéfique de leur utilisation alors que d'autres mettent en avant le rôle négatif de l'inhibition de la réponse inflammatoire. Cette ambivalence peut être expliquée par la prise en compte d'effets bénéfiques à court ou à long terme. De plus, de nombreuses complications peuvent être observées comme le développement d'infections bactériennes.

Il existe deux type d'anti-inflammatoires, les stéroïdiens et non stéroïdiens. Parmi les anti-inflammatoires stéroïdiens, on distingue le methylprednisolone (MPD). L'effet de cette molécule dans les LMTs est étudié depuis 1984. Trois études cliniques intitulées *National Acute Spinal Cord Injury Study* (NASCIS) ont essayé de déterminer l'effet de l'administration du MPD. La première, NASCIS I, n'a pas permis de mettre en avant d'effets bénéfiques et a démontré que les patients ayant reçu le MPD, ont développé un plus grand risque de

complications (Bracken *et al.*, 1984). Une deuxième étude, la NASCIS II, a ré-évalué l'effet du MPD. Elle a conclu que l'administration du MPD dans les 8 heures suivant la LMT, induisait une amélioration de la récupération fonctionnelle (Bracken *et al.*, 1990; Bracken & Holford, 1993). La dernière étude, la NASCIS III, conclut sur les effets bénéfiques du MPD lors d'une administration pendant 48 heures en respectant une première prise entre 3 et 8 heures après la LMT. Cependant elle conclut aussi que le risque de développer des complications telles qu'une septicémie ou une pneumonie était augmenté (Bracken *et al.*, 1997). En 2013, l'*American Academy of Neurosurgeons* s'est positionnée contre l'utilisation du MPD alors que depuis 2016 l'*AOSpine guidelines*, directive sur la prise en charge des lésions médullaires, recommande l'utilisation du MPD dans les 8 heures suivant la lésion. Cependant, de récentes études se sont intéressées à l'effet du MPD sur les cellules épendymaires après lésion médullaire. Elles en ont conclu que l'administration de MDP lors de la phase aiguë induit une inhibition de la prolifération des cellules épendymaires limitant leur contribution dans la gliogenèse nécessaire au contrôle de l'inflammation et à la régénération du tissu médullaire (Ye *et al.*, 2018; Nelson *et al.*, 2019). L'utilisation du MDP comme thérapie chez les patients médullo-lésés reste donc actuellement controversée.

En ce qui concerne les anti-inflammatoires non stéroïdiens, on retrouve la minocycline. Il est connu que cet antibiotique de la famille des tétracyclines, possède des propriétés anti-inflammatoires. Des études fondamentales chez le rat dans des modèles de maladies neurologiques comme Huntington et la sclérose en plaque, ont mis en avant sa capacité à inhiber le TNF- α , la cyclooxygénase-2 (enzyme catalysant l'ARA en prostaglandine, intermédiaire réactionnel inflammatoire), l'IL-1 β , la NOS et l'activation microgliale, favorisant un effet neuroprotecteur. Dans un modèle de LMT chez le rat cet effet neuroprotecteur a été caractérisé par l'amélioration de la récupération fonctionnelle (Festoff *et al.*, 2006). Cet effet bénéfique a aussi été observé chez l'Homme dans une étude clinique de phase II (Casha *et al.*, 2012). Une étude de phase III est actuellement en cours.

Comme décrit précédemment, les cellules microgliales jouent un rôle important dans la physiopathologie des LMTs. Elles sont les principales actrices et coordinatrices de la réponse inflammatoire et de la régénération du tissu nerveux. Afin de déterminer exactement leur implication, plusieurs études chez l'animal se sont intéressées aux conséquences de leur déplétion lors d'une LMT. Par une approche pharmacologique, utilisant un antagoniste du récepteur au facteur de stimulation des colonies 1, *colony stimulating factor 1* (CSF1R), le PLX5622, l'équipe de Steve Lacroix a démontré le rôle crucial joué par les cellules

microgliales. En effet, la déplétion de ces cellules altère la formation de la cicatrice médullaire et aggrave le déficit moteur (Bellver-Landete *et al.*, 2019). Ces résultats ont été confirmés par une étude utilisant un autre antagoniste du CSF1R semblable au PLX5622, le PLX3397. Dans cette étude les auteurs confirment les effets observés par l'équipe de Steve Lacroix, mettant en avant une exacerbation du déficit moteur et de la régénération tissulaire (Fu *et al.*, 2020). Cependant une troisième étude utilisant le PLX5622, a conclu à des effets opposés à ceux obtenus par l'équipe de Steve Lacroix, mettant en avant une meilleure récupération fonctionnelle en absence de cellules microgliales. Dans cette étude, les auteurs se sont aussi intéressés aux conséquences de la déplétion microgliale sur la diminution des performances cognitives. Par des tests comportementaux visant à étudier la mémoire (labyrinthe en Y, reconnaissance d'objets), l'anhédonie (consommation d'eau sucrée) et la résilience (suspension par la queue, nage forcée) de souris médullo-lésées, les auteurs ont conclu que la déplétion microgliale limite les perturbations cognitives observées après la LMT (Li, Ritzel, *et al.*, 2020). L'observation d'effets opposés de la déplétion microgliale dans ces trois études peut être expliquée par une différence de mode opératoire. Dans les deux premières études (Fu *et al.*, 2020; Rosin *et al.*, 2021) l'administration du PLX est réalisée avant et après la LMT alors que dans la troisième (Li, Ritzel, *et al.*, 2020) elle est réalisée seulement après la LMT. On observe aussi une différence sur le choix des sexes utilisés dans ces études. La première s'est intéressée à la fois à des souris mâles et femelles alors que dans les deux autres, les auteurs se sont intéressés seulement à un seul sexe, respectivement, des femelles et des mâles. Une étude très récente s'est intéressée aux changements des populations médullaires et la communication intercellulaire après une LMT et l'administration de PLX5622, par technique de *single cell sequencing*. Ils ont observé que la déplétion des cellules microgliales conduisait à un défaut de recrutement des autres types cellulaires, en particulier des macrophages, conduisant à diminuer la phagocytose dans le site de lésion et limitant l'induction des mécanismes de régénération. Les cellules microgliales sont les chefs d'orchestre de la réponse physiopathologique après la LMT. Leur inhibition est aussi corrélée à un défaut d'activation des cellules endothéliales, des astrocytes, des cellules épendymaires et des oligodendrocytes. L'absence d'activation de ces cellules et des mécanismes de régénération provoque une diminution de l'angiogenèse, de l'astroglie liée à la formation de la cicatrice médullaire et à un défaut de myélinisation des axones (Brennan *et al.*, 2022).

Finalement, l'ensemble des études fondamentales et cliniques réalisées ne permettent pas de conclure précisément sur l'effet bénéfique de l'inhibition des différents acteurs

cellulaires et moléculaire responsables de la réponse inflammatoire après la LMT. Cependant la comparaison des études entre elles, laisse imaginer que la modulation de la réponse inflammatoire peut être bénéfique sur la régénération de la moelle spinale lésée, lorsqu'elle est réalisée sur une période précise, laissant les effecteurs pro-inflammatoires induire les mécanismes de régénérations.

2.1.3. Neuroprotection et neurorégénération

Une autre approche dans les LMTs, est de protéger le tissu nerveux en limitant la mort cellulaire et la présence de molécules cytotoxiques aggravant l'étendue de la lésion, tout en stimulant la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi qu'en stimulant la croissance axonale.

Afin de diminuer l'excitotoxicité se mettant en place après la LMT, différentes molécules ont été étudiées. Le magnésium est utilisé dans le traitement et la prévention de plusieurs désordres neurologiques. Il a été démontré qu'il avait la capacité de diminuer l'apparition de dégâts secondaires. Cela a été mis en évidence dans des études fondamentales de LMTs. L'administration de magnésium permet de préserver le tissu nerveux et d'améliorer la récupération fonctionnelle (Ahuja *et al.*, 2017). Le FGF possède des capacités similaires au magnésium. Son action a été étudiée dans des modèles animaux de LMTs, démontrant sa capacité à diminuer la quantité de radicaux libres de l'oxygène et l'excitotoxicité neuronale, réduisant ainsi la mort neuronale (Ahuja *et al.*, 2017). Après la lésion primaire, du fait de la rupture des axones, une quantité importante de Ca^{2+} se retrouve libérée dans la MEC. Le riluzole est un bloqueur des canaux calciques utilisé dans le traitement de la sclérose en plaque chez l'humain (Grossman *et al.*, 2014; Fehlings *et al.*, 2016). Dans cette pathologie, elle permet de réduire l'apoptose cellulaire et de ce fait, de diminuer la quantité de glutamate relarguée par les cellules apoptotiques, diminuant ainsi l'excitotoxicité. Son utilisation dans un modèle animal de LMT a permis d'améliorer les performances locomotrices des animaux (Wu *et al.*, 2013). Deux essais cliniques de phase II et III sont actuellement en cours de réalisation (Fehlings *et al.*, 2016).

D'autres approches ont essayé d'améliorer la neurorégénération en stimulant les cellules médullaires. Le facteur de stimulation des colonies de granulocytes, *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF), a la capacité d'induire la survie et la prolifération cellulaire (Yoon *et al.*, 2007). Cette molécule agit aussi en diminuant la production de cytokines inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1 β . Des études ont mis avant que le G-CSF diminuait l'apoptose et

favorisait la récupération fonctionnelle (Nishio *et al.*, 2007). Chez l'Homme, la première étude clinique réalisée, a évalué son effet lorsqu'il est administré en phase aiguë. Sur les 16 patients traités dans les 48 heures après la LMT, 9 ont vu leur score AIS augmenter d'un point (Takahashi *et al.*, 2012). Une deuxième étude a voulu comparer l'effet du G-CSF aux résultats de l'étude NASCIS II. Cette étude a mis en avant une meilleure récupération fonctionnelle des patients avec le G-CSF comparé au MDP (Kamiya *et al.*, 2015).

L'étude des mécanismes et la compréhension de la physiopathologie de la LMT a permis d'identifier une voie de signalisation, Rho, s'activant après lésion. Cette voie de signalisation impliquée dans le dynamisme de l'actine intracellulaire, induit l'apoptose des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes ainsi que le collapse des cônes de croissance des axones. La Cethrin est un inhibiteur de cette voie de signalisation, elle inhibe la voie de signalisation Rho en bloquant la protéine RhoA qui joue un rôle important dans la transduction du signal. Son utilisation chez l'animal permet de stimuler la croissance des axones et favorise la récupération fonctionnelle. En ce qui concerne son utilisation chez l'Homme, une première étude sur 48 patients souffrant d'une LMT complète a été réalisée. Dans cette étude, une seule administration de Cethrin dans les sept jours suivant la lésion a permis d'améliorer le score AIS chez 6% des patients ayant une atteinte thoracique et 66% des patients ayant une atteinte cervicale, passant de AIS A à AIS C ou D. Pour confirmer l'effet bénéfique de la Cethrin, d'autres études cliniques sont actuellement en cours (Forgione & Fehlings, 2014; Fehlings *et al.*, 2018)

Une autre approche pour limiter l'installation de la réponse inflammatoire et l'apparition de dégâts secondaires est l'utilisation de biogels faiblement immunogènes. Ils peuvent être naturel et biologique, composés de chitosan, de collagène, de galactine, d'acide hyaluronique, d'acide polyglycolique, d'acide polylactique, d'acide polylactique-glycolique et polyepsilon-caprolactone ou hybrides (Dai, 2020). Leur bonne biocompatibilité et dégradabilité permet de les utiliser comme échafaudage ayant plusieurs intérêts pour la régénération médullaire. Ils forment un « pont » entre les extrémités médullaires lésées et promeuvent ainsi la croissance axonale. Ils fournissent un support structurel pour la migration, l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules neurales tout en reproduisant les propriétés mécaniques naturelles du tissu médullaire. Ils participent aussi à la modulation de la MEC en réduisant les cavitations et la formation de la cicatrice médullaire (Chedly *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018). Il est possible d'améliorer leurs effets par l'ajout et le contrôle de la délivrance dans le temps de nanoparticules (exosomes dérivés de cellules souches, liposomes, ...), de drogues (anti-inflammatoires, anti-

oxydants, ...), de facteurs neurotrophiques (NT-3, BDNF, FGF, VEGF, ...) ou encore de cellules (NSC, ...), (**Figure 44**) (Shen *et al.*, 2022).

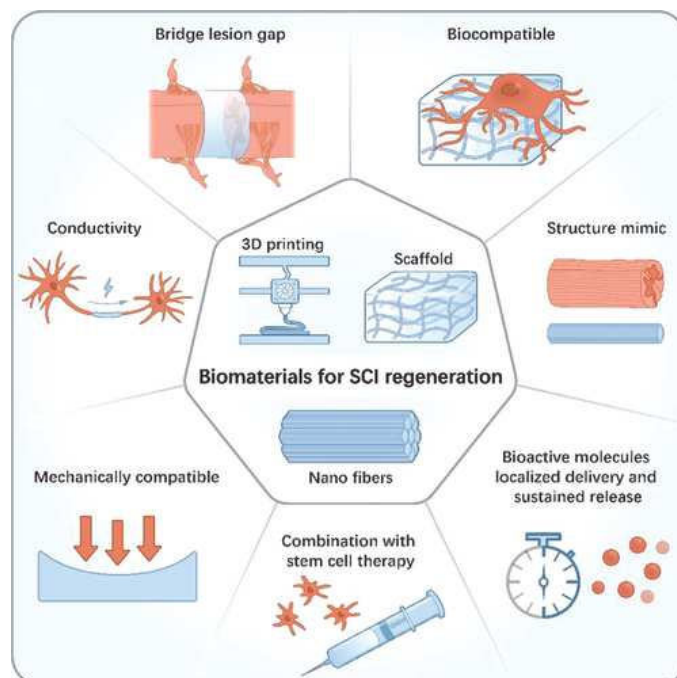


Figure 44 : Schéma résumant les principales caractéristiques des biogels. Les biogels, fabriqués à partir de molécules naturelles ou synthétiques biocompatibles, fournissent un support physique totalement compatible avec les contraintes imposées, permettant de combler la moelle spinale lésée favorisant ainsi la croissance axonale. Il est possible d'ajouter des cellules ou des molécules bioactives afin d'améliorer la régénération tissulaire (Shen *et al.*, 2022).

2.2. Stimulation électrique

Chez les mammifères, la motricité des membres postérieurs est générée en suivant un schéma et un rythme défini par un réseau de neurones médullaires situés au niveau des étages médullaires L4-L5, le CPG (Grillner & Zangger, 1979). La découverte des CPGs, a changé la vision et la compréhension de la régulation de la motricité, mettant en avant le rôle du cortex moteur dans l'induction et l'arrêt volontaire des mouvements, mais pas dans le contrôle de la marche une fois celle-ci initiée. C'est sur la base de ces observations que des chercheurs ont eu l'idée d'utiliser la stimulation électrique, *electrical stimulation* (ES), afin de remplacer le réseau axonal détruit, induisant l'activation des CPGs. Les travaux réalisés sur des modèles de LMTs chez le chat et le rat, ont apporté beaucoup d'espoir sur l'efficacité de cette thérapie chez l'Homme. En effet, dans ces travaux, la stimulation épидurale (insertion d'une électrode de stimulation électrique entre la colonne vertébrale et la dure-mère) des CPGs a réussi à induire une locomotion rythmée grâce à une induction exogène (Iwahara *et al.*, 1992; Gerasimenko *et al.*, 2002, 2003). De récents travaux réalisés par l'équipe de Grégoire Courtine basés sur cette

technologie, ont permis à des singes ayant une lésion médullaire cervicale de retrouver un contrôle volontaire des membres supérieurs (Barra *et al.*, 2022).

La première étude utilisant la ES chez l'humain après une LMT, ne s'est pas intéressée à la stimulation des réseaux supraspinaux et intraspinaux, mais à la stimulation des muscles des membres inférieurs lors de sessions de rééducation sur un bicycle. Cette approche cumulant stimulation électrique et physiologique des muscles a montré des effets bénéfiques chez un patient AIS A qui, après 3 ans, a vu son score AIS passer à C (McDonald *et al.*, 2002). Cependant une deuxième étude s'intéressant au même protocole n'a pas réussi à identifier d'effet bénéfique à long terme de cette thérapie chez un patient souffrant d'une LMT complète. Cette approche permettant d'améliorer le métabolisme aérobie des muscles et de limiter leur atrophie, a un effet se limitant aux muscles et ne permet pas d'induire de régénération médullaire du réseau axonal du fait de l'absence d'engagement des réseaux spinaux (Ragnarsson, 2008; Griffin *et al.*, 2009). À la suite de ces résultats, de nouvelles approches combinant la stimulation électrique des muscles avec la stimulation du CPG lombaire ont été réalisées. Les résultats obtenus ont été très intéressants car la réactivation du CPG, permet à des patients AIS A de se lever, de marcher ou de pédaler avec une assistance minimale (Harkema *et al.*, 2011; Angeli *et al.*, 2018). En combinant cette approche avec des entraînements physiques, des exercices multimodaux (équilibre du tronc en position assise, équilibre et pas en position debout, amplitude de mouvement) et un réentraînement au pas ou à la marche avec un soutien du poids du corps, la récupération fonctionnelle se voit améliorée (Wenger *et al.*, 2016; Angeli *et al.*, 2018; Wagner *et al.*, 2018). Initialement, la stimulation électrique nécessite de réaliser une chirurgie afin de placer l'électrode de stimulation au contact du tissu nerveux. C'est pour cela que de nouvelles approches non invasives ont été développées. La stimulation électrique transcutanée, *transcutaneous electrical stimulation* (TES) est une alternative non invasive à la stimulation électrique dans laquelle, les électrodes sont positionnées à la surface de la peau entre les processus spinaux (cathode) et sur la crête iliaque (anode). La TES module l'excitabilité de la moelle spinale et permet de reconnecter les réseaux supraspinaux et intraspinaux (Kakulas, 1999). Une étude pilote sur 5 patients souffrant d'une lésion médullaire motrice complète cervicale ou thoracique (AIS-B), ont reçu cette stimulation pendant 18 semaines. La TES a permis à ces patients de réaliser un mouvement semblable à un pas lorsqu'on leur demandait de produire un mouvement volontaire (**Figure 45**) (Gerasimenko *et al.*, 2015).

Ces deux approches efficaces montrent une limite quant à leur réalisation. En effet, pour activer le générateur il est nécessaire d'avoir la présence d'une personne extérieure. De plus, cette stimulation ne reflète pas l'activation cérébrale naturelle induite dans le cortex. C'est pour cela que l'approche appelée « *brain-computer interfaces* » (BCIs), interface ordinateur cerveau, a été développée. La BCI par l'implantation d'une électrode cérébrale, permet de considérer le réseau cérébral cortical pendant la réhabilitation (Donati *et al.*, 2016). La BCI traduit le signal obtenu par électro-encéphalogramme (EEG) en une commande « signal » représentant l'intention de mouvement de l'utilisateur. L'implantation d'un « *bypass* » contournant la lésion et reliant le cortex au CPG, permet alors à l'utilisateur par la volonté de mouvement d'induire l'activation du CPG (Ethier *et al.*, 2012). La BCI est en perpétuelle évolution car elle fait intervenir des algorithmes avancés d'intelligence artificielle qui ne cessent d'être continuellement améliorés afin d'augmenter la quantité de données EEG décodées en instructions motrices coordonnées pour actionner directement les muscles ou les exosquelettes (Lotte *et al.*, 2018; Benabid *et al.*, 2019).

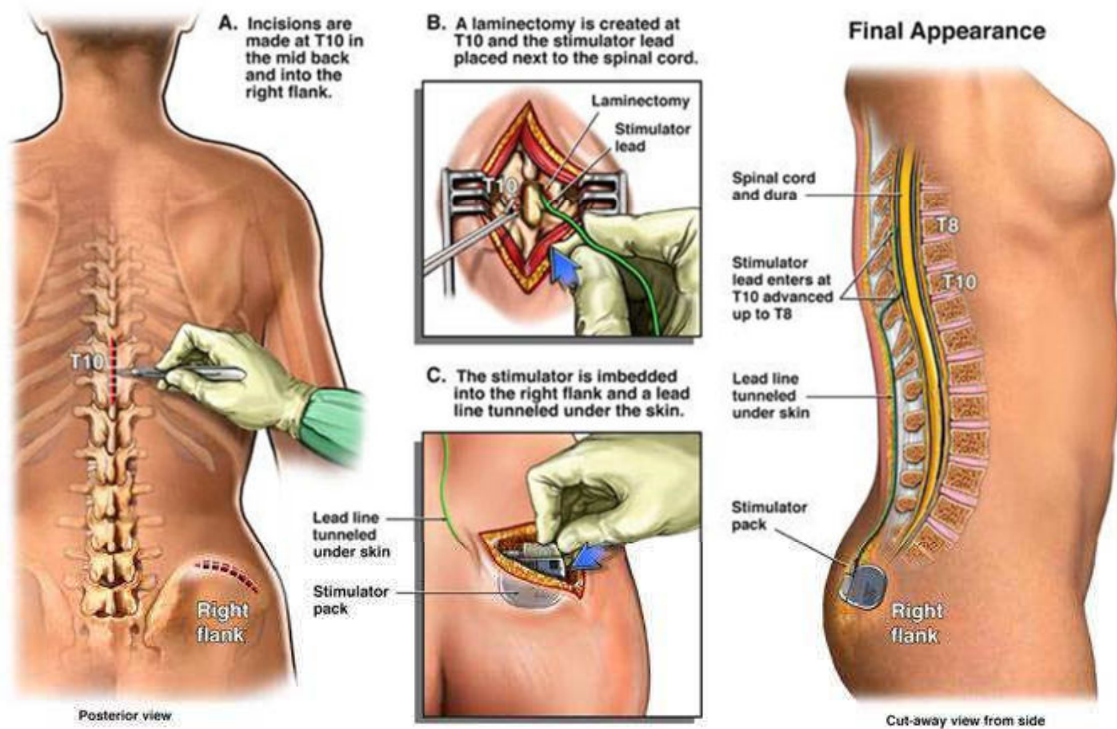


Figure 45 : Schéma représentant l'installation du dispositif de stimulation électrique épurale. Après chirurgie et laminectomie, un réseau d'électrodes est implanté dans l'espace épural au-dessus de la région médullaire lésée. Les électrodes sont reliées à un stimulateur greffé sous la peau au niveau du flanc droit (NeuroRehab).

2.3. Stimulation magnétique

Initialement, la stimulation magnétique (SM) a été développée comme outil de diagnostic pour la mesure des seuils d'excitabilité et de la vitesse de conduction motrice chez

des patients ayant un déficit moteur. Par la suite, elle a été utilisée pour différentes pathologies neurologiques cérébrales et a montré des effets bénéfiques chez des patients souffrant de dépression (Becker *et al.*, 2019), d'AVC (Dionísio *et al.*, 2018), de Parkinson (Torres *et al.*, 2015) ou encore d'Alzheimer (Rabey & Dobronevsky, 2016). En plus des effets bénéfiques observés chez ces patients, la SM se distingue par son caractère non invasif, indolore, sa facilité d'utilisation et la rareté des effets secondaires observés (**Figure 46**).

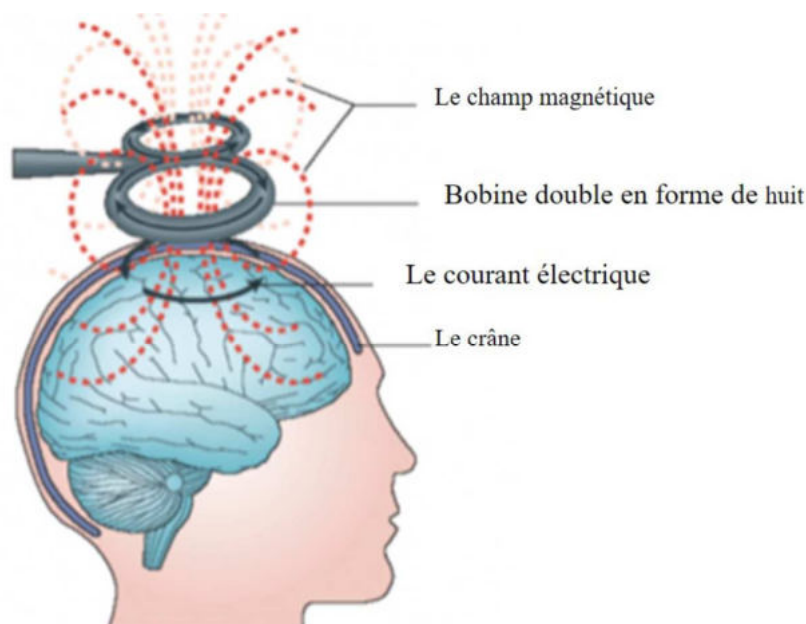


Figure 46 : Schéma représentant l'application de la TMS dans le traitement des désordres neurologiques. La bobine est appliquée à la surface du scalp au-dessus de l'aire corticale à stimuler. Le passage du courant électrique dans la bobine électromagnétique, induit un champ magnétique perpendiculaire à la bobine (Ridding 2007).

La SM repose sur le principe d'induction électromagnétique décrite pour la première fois en 1831 par Michael Faraday. Le champ magnétique est généré par l'intermédiaire d'une bobine électromagnétique constituée d'un ou plusieurs solénoïdes fabriqués à partir d'un fil conducteur enroulé, dans lequel passe de l'électricité. On observe alors la génération d'un champ magnétique perpendiculaire à la bobine électromagnétique.

La première description de l'effet du magnétisme sur l'organisme et en particulier sur le SNC a été réalisée en 1896 par Jacques Arsène d'Arsonval, médecin et fondateur de l'école supérieure d'électricité de Paris. Il demanda à des volontaires d'introduire leur tête dans une bobine magnétique et observa l'induction de magnétophosphène, c'est à dire des phosphènes (sensation de lumière ou de taches dans le champ visuel), des vertiges et même des syncopes. C'est en 1985 que Baker et ses collègues, ont utilisé cette technique afin de stimuler précisément le cortex cérébral en plaçant la bobine magnétique à la surface de scalp. Il décrivit pour la première fois la stimulation magnétique transcrânienne, *transcranial magnetic stimulation*

(TMS). Le champ magnétique ainsi généré, traverse les tissus sans modification de celui-ci, et induit un courant électrique dans les neurones. Ce courant a pour effet de dépolariser les axones et les neurones corticaux. Il est généralement décrit qu'en fonction de la fréquence de stimulation, on observe soit une inhibition des neurones lors de basses fréquences (<1Hz) ou une activation ou facilitation avec de hautes fréquences (>5Hz). Cependant les effets de la TMS ne sont pas seulement liés à la fréquence d'induction du champ magnétique. Il est maintenant admis que l'intensité, la fréquence, la durée ou encore le pattern de stimulation, dans le cas de rTMS (*repetitive transcranial magnetic stimulation*) influencent les effets observés dans les différentes études.

Depuis la fin des années 80, en plus de son étude sur des modèles de lésions cérébrales, plusieurs études ont pu démontrer l'efficacité de la SM sur des lésions de nerfs périphériques *in vivo* et *in vitro*, améliorant la régénération et la croissance axonale. Néanmoins, pendant cette même période, peu d'études se sont intéressées à l'effet de la SM sur des modèles de lésions médullaires. On peut toutefois citer une étude réalisée en 1976, sur un modèle d'hémicordotomie (section chirurgicale de faisceaux de fibres nerveuses sensibles de la moelle spinale) chez le chat. L'application de la SM sur ce modèle a permis d'améliorer la repousse axonale au niveau de la cicatrice (Wilson & Jagadeesh, 1976). Il faudra attendre 2003 et les travaux de Crowe et al., pour que la SM soit de nouveau étudiée dans un modèle de lésion médullaire. Dans cette étude, les auteurs se sont intéressés à un modèle de contusion médullaire thoracique (T5-T6) chez le chat, et ont observé que la SM permettait un effet neuromodulateur et régénératif se traduisant par une diminution de la taille de la zone lésionnelle et par une amélioration de la récupération motrice (Crowe *et al.*, 2003). Ces résultats ont aussi été observés dans des modèles de compression et de transection médullaire thoracique chez la souris (Poirier *et al.*, 2004; Ahmed & Wieraszko, 2008). L'étude de Poirier et al., est la première à utiliser une bobine à proximité du site de lésion, démontrant ainsi l'effet focal de cette thérapie sur la moelle spinale, limitant l'apparition d'effets secondaires induits par la stimulation magnétique de l'animal entier (Ahmed & Wieraszko, 2008). En s'inspirant de cette approche focale, le laboratoire UR3830 – GRHVN a fait de la SM l'une de ses thématiques de recherche. Les recherches réalisées dans le laboratoire, sur des modèles de transection médullaire thoracique chez la souris et le rat, ont permis de mieux comprendre l'effet neuroprotecteur et régénératif de la SM. En effet, chez les animaux traités par rTSM, on observe une diminution de la taille de la cicatrice médullaire, une amélioration de la repousse axonale et de la myélinisation des axones, une diminution de l'inflammation et de la mort cellulaire, se

traduisant par une amélioration des performances fonctionnelles lors de tests sensorimoteurs (Chalfouh *et al.*, 2020; Robac *et al.*, 2021).

Des travaux de recherches cliniques ont été réalisés afin de déterminer l'effet de cette thérapie chez des humains médullo-lésés. Le but de ces études était de déterminer le rôle que pouvait jouer la SM sur trois problèmes majeurs liés à la lésion médullaire chez l'Homme (Tazoe & Perez, 2015) :

- Le déficit fonctionnel sensitif et moteur.
- La spasticité (désordre moteur induisant des spasmes en flexion et extension avec augmentation du tonus musculaire).
- Les douleurs neuropathiques et la vessie neurogène (dysfonction vésicale).

La plupart de ces études ont utilisé comme approche, la stimulation des aires corticales motrices dans le cortex moteur primaire (M1) associées à ces problèmes (Belci *et al.*, 2004; Kuppuswamy *et al.*, 2011; Benito *et al.*, 2012). Toutefois, une étude s'est intéressée à la SM spinale au niveau lombaire (T11-L1) chez des patients souffrant de vessie neurogène (dysnergie vésico-sphinctérienne). Seize semaines après la stimulation, les patients ont vu leur capacité à contracter leur vessie de manière volontaire et à coordonner leur sphincter urinaire améliorée.

2.4. Transplantation cellulaire

Depuis des dizaines d'années, la transplantation cellulaire est une thérapie étudiée dans un grand nombre de pathologies. L'objectif de cette thérapie est d'utiliser les propriétés de certains types cellulaires de manière à recoloniser les tissus lésés ou d'apporter un support trophique afin de limiter la mort cellulaire tout en stimulant le remplacement des cellules mortes par les cellules endogènes. Pour le traitement des LMTs de nombreux types cellulaires ont été étudiés et les résultats obtenus montrent que les effets bénéfiques sont dépendants du type cellulaire. En fonction de leur origine, les cellules transplantées ont un effet anti-inflammatoire ou immuno-modulateur, pro-neurogénique, anti-gliotique, pro-oligodendrogénique, pro-angiogénique, anti-apoptotique, sources de facteurs neurotrophiques et un rôle structurel en s'intégrant dans le tissu lésé, remplaçant ainsi les cellules mortes (Vawda *et al.*, 2012; Siddiqui *et al.*, 2015). On distingue trois grandes familles de cellules : les cellules souches (elles même subdivisées en quatre groupes : totipotentes, pluripotentes, multipotentes et unipotentes), les cellules différenciées et les cellules dédifférenciées, possédant chacune des propriétés

thérapeutiques qui leur sont propres mais aussi des contre-indications limitant leur utilisation en clinique humaine (**Figure 47**).

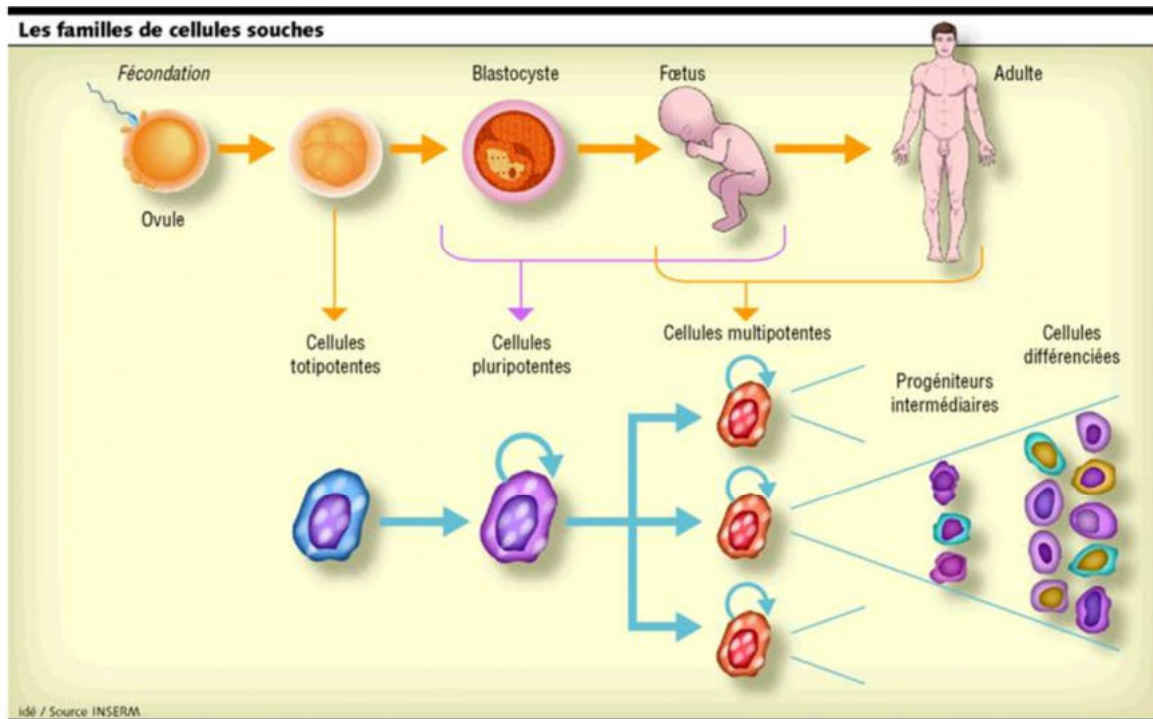


Figure 47 : Schéma représentant les stades de différenciation des cellules souches. Les cellules souches totipotentes peuvent former les trois feuillet embryonnaires et ont la capacité de se différencier en n'importe quelles cellules d'un organisme adulte. Les cellules souches pluripotentes ont la capacité de s'auto renouveler et peuvent générer l'ensemble des types cellulaires, présents dans le feuillet embryonnaire auquel elles appartiennent. Les cellules souches multipotentes ont aussi la capacité de s'auto renouveler comme les cellules souches pluripotentes, mais ne peuvent générer qu'un faible nombre de cellules différentes, spécifiques d'un tissu ou d'un organe. Les progéniteurs intermédiaires ou cellules souches unipotentes sont un stade intermédiaire entre les cellules souches multipotentes et les cellules totalement différenciées. Elles ne peuvent générer qu'un seul type cellulaire (Giraud 2016).

2.4.1. Cellules de Schwann

Dans le SNP, les CS permettent la myélinisation des nerfs périphériques de la même manière que les oligodendrocytes dans le SNC. Du fait de leur similitude avec les oligodendrocytes et de leur facilité de prélèvement (à partir d'un nerf distal chez l'Homme et du nerf sciatique chez l'animal), les CS ont été les premières cellules étudiées dans un modèle de lésion médullaire murin (Duncan *et al.*, 1981). Après une lésion nerveuse périphérique, les CS participent activement à la régénération axonale.

Ces cellules ont la capacité de libérer un ensemble de facteurs neurotrophiques favorisant la survie cellulaire et la croissance axonale, comme le NGF, le BDNF, le NT-3, le CNTF, le GDNF ou encore le FGF (Oudega & Xu, 2006). Elles ont également la capacité à moduler la MEC par la production de laminine, de fibronectine et de collagène (Chernousov &

Carey, 2000; Mirsky *et al.*, 2002). Leur étude dans un modèle de lésion de la zone d'entrée de la racine dorsale, *dorsal root entry zone* (DREZ) a mis en avant leur capacité de migration. En effet, dans ce modèle les CS des racines nerveuses, ont migré jusqu'à la zone de lésion et ont remyélinisé les axones présents (Brook *et al.*, 1998; Nagoshi *et al.*, 2011).

En ce qui concerne les LMTs, les CS ont été très étudiées chez l'animal. Il a été démontré dans différents modèles de LMTs, que les CS stimulent la repousse et la myélinisation des axones sensitifs et des faisceaux proprio-spinaux (Bunge & Wood, 2012; Kanno *et al.*, 2014) tout en augmentant la survie des neurones, améliorant ainsi la préservation du tissu par la réduction de la taille et de la quantité des lésions kystiques (Barbour *et al.*, 2013). Cette capacité à myéliniser les axones et à stimuler leur croissance, se traduit par une amélioration de la récupération de certaines fonctions sensorimotrices et donc une amélioration comportementale de l'animal après la LMT (Park *et al.*, 2010; Kanno *et al.*, 2014). Cependant, dans l'ensemble des modèles étudiés, leur utilisation seule n'a pas été suffisante pour générer une réponse axonale conduisant à la récupération des fonctions motrices (Fouad *et al.*, 2005; Kanno *et al.*, 2014). L'une des explications à cela, est l'incapacité des axones à s'étendre au sein de la zone de lésion. La présence de CS dans le SNC entraîne une communication entre les astrocytes et les CS. Cette communication induit l'hypertrophie et l'hyperréactivité astrocytaire, inhibant la capacité de migration des CS ainsi que la capacité des axones à repousser, du fait de la production de molécules inhibitrices par les astrocytes (Bunge & Wood, 2012; Li *et al.*, 2012). C'est pour cela que dans les études s'intéressant à cette thérapie dans le SNC, les CS sont fréquemment associées avec d'autres traitements comme les bloqueurs de molécules inhibitrices, des facteurs neurotrophiques ou encore des neuroprotecteurs (Kanno *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014).

Il existe peu d'études cliniques utilisant les CS comme thérapie après une LMT. Seulement trois études cliniques ont été réalisées et les résultats obtenus ont démontré la non iatrogénéicité de l'utilisation des CS, mais un faible effet thérapeutique. Dans l'étude menée par Saberi *et al.*, sur 33 patients transplantés, 4 ont eu des niveaux accrus de paresthésie et de spasmes musculaires alors que seulement 1 patient a vu une augmentation de ses fonctions motrices (Saberi *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2012).

2.4.2. Cellules souches embryonnaires

Par leur capacité à générer les trois feuilletts embryonnaires (le mésoderme, l'ectoderme et l'endoderme) les cellules souches embryonnaires (CSE) sont des candidates idéales pour la

régénération tissulaire. En effet, les CSE sont des cellules souches pluripotentes dérivées de la masse cellulaire interne du blastocyste, capable de générer n'importe quelles cellules constituant un individu (Conley *et al.*, 2004). Cette capacité fait de la transplantation des CSE une thérapie prometteuse pour un ensemble de pathologies, mais aussi une limite à leur utilisation en clinique humaine, en raison du risque élevé de formation de tératomes. Les CSE ne sont donc jamais directement transplantées, mais préalablement différenciées *in vitro* en progéniteurs cellulaires avant la transplantation (Hendricks *et al.*, 2006).

Dans les LMTs, des résultats intéressants ont été obtenus lorsque ces cellules sont dérivées en NSC, en motoneurons ou en OPC. Dans des modèles murins mais aussi chez le primate, ces études ont mis en avant que la transplantation de CSE dérivées vers un phénotype neural après la LMT, est liée à une amélioration de la repousse des axones des neurones sérotoninergiques endogènes mais aussi à une augmentation de la survie des neurones endogènes. Ces effets bénéfiques conduisent à une diminution de l'atteinte tissulaire et donc à une amélioration des fonctions motrices (Rossi *et al.*, 2010; Nógrádi *et al.*, 2011; Iwai *et al.*, 2015).

Les cellules obtenues à partir des CSE ont la capacité de s'intégrer au tissu et de remplacer les cellules mortes. En effet, dans un modèle de LMT, la transplantation de neurones GABAergiques dérivés de CSE, entraîne une diminution des douleurs neuropathiques (Hwang *et al.*, 2016). Cela a aussi été observé après transplantation d'OPC dérivés de CSE. Une fois transplantés, les OPC ont la capacité de se différencier en oligodendrocytes matures et de remyéliniser les axones du SNC, conduisant à une amélioration des fonctions motrices (Keirstead *et al.*, 2005).

Cependant, malgré des résultats chez l'animal très encourageants, l'utilisation des CSE en clinique, même différenciés, soulève des questions d'ordre éthique et religieuse du fait de la capacité de ces cellules à pouvoir générer un individu. De plus, en 2008, une étude a fait état de la formation de tératomes après transplantation de CSE créant de réelles préoccupations quant à l'innocuité de ces cellules (Li *et al.*, 2008). Une étude clinique de phase I initiée en 2009 aux Etats-Unis et rapidement interrompue faute de moyens financiers, a permis d'apporter quelques informations sur l'intérêt de leur utilisation après une LMT en clinique humaine. Cet essai clinique a démontré la non-dangereuse des CSE dérivées chez l'Homme malgré l'observation de quelques phénomènes kystiques chez certains patients. En ce qui concerne

leurs effets thérapeutiques, aucune récupération neurologique n'a été observée lors de cet essai (Bretzner *et al.*, 2011; Wilcox *et al.*, 2012).

2.4.3. Cellules souches pluripotentes induites

Chaque cellule d'un organisme adulte possède le même ADN. Une cellule peut donc théoriquement remplir les fonctions d'une autre cellule de l'organisme. C'est dans cette optique, qu'en 2006, que Takahashi et Yamanka se sont intéressés à la reprogrammation génétique de cellules différenciées. Grâce à un vecteur viral, ils ont réussi à obtenir des cellules souches pluripotentes à partir de fibroblastes (Takahashi & Yamanaka, 2006). Les cellules obtenues, baptisées *induced pluripotent stem cells* (iPSC), présentent des caractéristiques communes aux CSE, comme la capacité à générer les différents types cellulaires des trois feuilletts embryonnaires, tout en s'affranchissant des contraintes éthiques et religieuses des CSE (Takahashi *et al.*, 2007). De plus, cette approche peut être réalisée à partir de n'importe quelle biopsie facilitant l'obtention de ces cellules. (Figure 48).

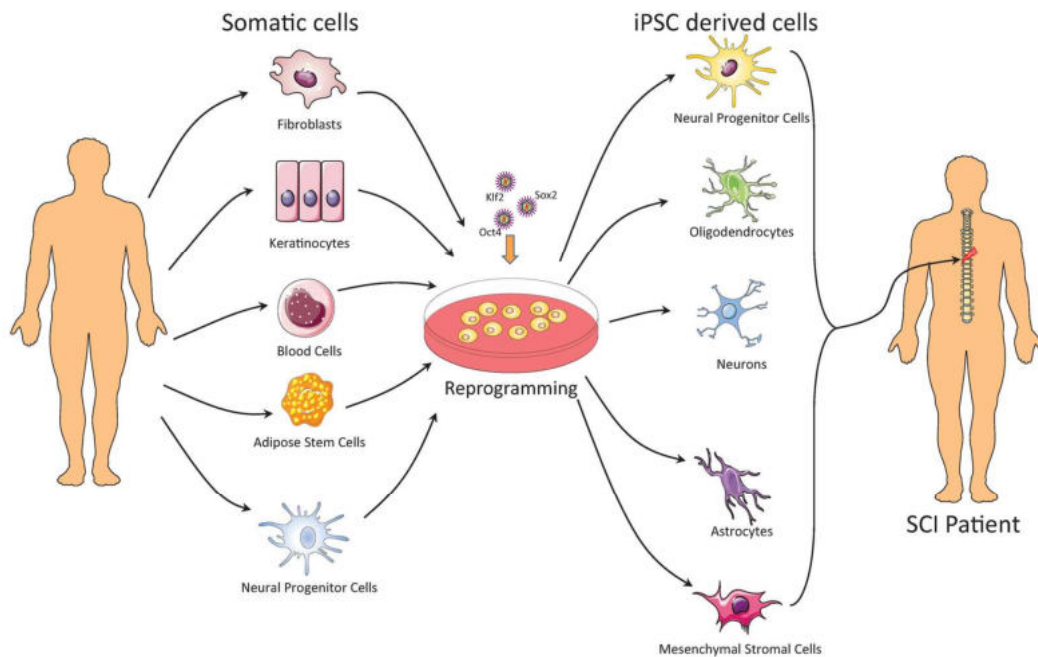


Figure 48 : Schéma représentant les types cellulaires utilisés dans la génération d'iPSC et les cellules différenciées obtenues à partir des iPSCs permettant la réalisation de transplantation cellulaire chez des patients souffrant d'une LMT. Il est possible de générer n'importe quelles cellules nerveuses à partir d'une biopsie de patient. En agissant sur les gènes *Klf2*, *Sox2* et *Oct4*, il est possible de dédifférencier n'importe quelle cellule et de générer un type cellulaire précis (Khazaei 2015).

Quelques études se sont intéressées à la transplantation de progéniteurs neuronaux ou gliaux dérivés d'iPSC dans des modèles animaux de LMTs. Les résultats obtenus, ont mis en avant des effets bénéfiques tels qu'une remyélinisation des axones, une augmentation de la

régénération axonale et une amélioration de la survie des neurones endogènes, favorisant la récupération de certaines fonctions motrices et sensitives (Hatami *et al.*, 2009; Nutt *et al.*, 2013; Salewski *et al.*, 2013). Un premier essai clinique chez l'Humain s'intéressant à la transplantation de cellules souches/progénitrices neuronales obtenues à partir d'iPSC, est prévu bientôt au Japon. Cet essai de phase I a pour but de déterminer la sûreté et la faisabilité de cette approche avant de poursuivre sur un essai de phase II déjà planifié par la même équipe (Sugai *et al.*, 2021).

2.4.4. Cellules souches neurales ou progéniteurs neuronaux

Les NSC et les progéniteurs neuronaux, *neural progenitor cells* (NPC) sont des cellules multipotentes ayant la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en l'un des trois types cellulaires neurales : les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones. Cette capacité à pouvoir remplacer les populations neurales endommagées, en particulier les neurones, a poussé à la réalisation d'études dans des modèles de LMTs (Tetzlaff *et al.*, 2011). L'objectif de leur utilisation est de remplacer le tissu nerveux endommagé mais aussi d'apporter un support trophique aux cellules épargnées par le traumatisme. En effet, les NSC ont la capacité de sécréter un ensemble de facteurs neurotrophiques, comme le BDNF, le NGF et le GDNF, *in vitro* et *in vivo* (Lu *et al.*, 2003). Le but premier des chercheurs était de générer de nouveaux neurones afin de rétablir les réseaux axonaux détruits par la lésion primaire, cependant, lorsque les NSC sont transplantées, elles génèrent rarement de nouveaux neurones. Elles restent essentiellement indifférenciées ou se différencient vers un type glial (Shihabuddin *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2001). La différenciation de ces cellules est liée à l'environnement dans lequel elles sont transplantées. Il a été démontré que la transplantation de NSC provenant de la moelle spinale de rat dans une zone neurogénique du cerveau comme le DG, conduit à la formation de nouveaux neurones dérivés de ces cellules. Cependant, si ces mêmes cellules sont transplantées dans une moelle spinale, elles génèrent essentiellement des cellules gliales (Shihabuddin *et al.*, 2000). Toutefois, une étude menée en 2012, observa la génération de nouveaux neurones (ne provenant pas des NSC) s'intégrant au réseau neuronal existant. L'intégration de ces nouveaux neurones formant un relai fonctionnel a permis la restauration d'une activité électrophysiologique et une amélioration de la récupération de l'animal lésé (Lu *et al.*, 2012). La transplantation de NSC montre donc des effets bénéfiques intéressants, permettant l'amélioration des performances de l'animal lors de tests d'évaluation de leurs fonctions locomotrices (Hofstetter *et al.*, 2005; Bottai *et al.*, 2008).

Afin de mieux contrôler la différenciation des progéniteurs transplantés, certains laboratoires se sont intéressés aux NPC issu de NSC. La transplantation de NPC, d'origine humaine ou murin dans des modèles animaux, montre un effet bénéfique semblable à la transplantation de NSC. Ces cellules améliorent la réparation et la régénération neuronale du tissu médullaire augmentant la récupération des fonctions motrices et sensibles après une LMT chez le rat (Edgar & Nave, 2009; Karimi-Abdolrezaee *et al.*, 2010; Alexanian *et al.*, 2011). Leurs principales actions sont de remyéliniser les axones des neurones présents dans la moelle spinale ainsi que l'apport d'un support neurotrophique, conduisant à une régénération axonale et un effet immuno-modulateur. La remyélinisation des axones locaux est réalisée par les oligodendrocytes matures dérivés des NPC, montrant la capacité de ces cellules à s'intégrer dans le tissu hôte (Hawryluk *et al.*, 2014).

Néanmoins, malgré des résultats intéressants et prometteurs, la transplantation de NSC s'oppose à une limite qui est celle de leur prélèvement chez l'Homme. En effet, ces cellules peuvent être isolées à partir de la V-SVZ, du DG ou encore de la moelle spinale, mais du fait de leur localisation anatomique, leur prélèvement est difficile et pourrait être responsable de complications. Leur utilisation chez l'Homme semble donc difficilement réalisable. Il serait intéressant de trouver une alternative comme la génération de NSC ou de NPC à partir des CSE ou des iPSC, mais leur utilisation reste limitée du fait des contraintes abordées précédemment.

2.4.5. Cellules souches mésenchymateuses

Un autre type de cellules souches multipotentes a été étudié dans des modèles de LMTs, les cellules souches mésenchymateuses, *mesenchymal stem cells* (MSC). Ces cellules ont l'avantage d'être facilement isolables à partir de tissus adultes ou postnataux, tels que la moelle osseuse, le tissu adipeux, le liquide amniotique, le cordon ombilical ou encore d'autre tissus fœtaux. Elles sont aussi facilement cultivables et sont connues pour présenter une faible immunogénicité ainsi qu'un faible risque tératogène. Les MSCs sont donc des candidates thérapeutiques intéressantes d'autant plus qu'elles possèdent également des effets anti-inflammatoires et immuno-modulateurs (Vawda *et al.*, 2012). Ces effets ont été confirmés après une LMT chez l'animal. Une fois transplantées, elles exercent un effet immuno-modulateur, apportent un support trophique, modifient l'environnement lésionnel et facilitent l'élongation axonal en agissant comme support physique. Leurs actions permettent de diminuer la démyélinisation axonale et de réduire la quantité de molécules inhibitrices présentes au sein de la lésion, stimulant ainsi la régénération axonale (Malgieri *et al.*, 2010). Dans un modèle de

compression médullaire, leur transplantation pendant la phase aiguë, a permis de diminuer l'étendue des dégâts secondaires en limitant les phénomènes kystiques, se traduisant par une amélioration de la récupération des fonctions sensori-motrices chez l'animal (Boido *et al.*, 2014).

Quelques études cliniques ont été réalisées chez l'Homme. Dans l'une d'elles, réalisée en république Tchèque, vingt patients souffrant d'une lésion médullaire complète ont reçu une transplantation autologue de cellules souches de la moelle osseuse par voie intraveineuse ou intraartérielle. Une amélioration des fonctions motrices a pu être observée chez sept patients ayant reçu les cellules dans les 30 jours suivant la LMT (Syková *et al.*, 2006). Dans une autre étude, neuf patients de score AIS A ont reçu une transplantation intra médullaire dans le site de lésion de MSCs. Un an après la transplantation, tous les patients ont eu une augmentation de leur score AIS, passant à B ou C (Deda *et al.*, 2008). Une dernière étude s'est intéressée à quarante-quatre patients médullo-lésés chroniques (3,6 ans après la lésion en moyenne). Chez une grande partie de ces patients, la transplantation a augmenté les phénomènes de spasticité et de douleurs neuropathiques sans apporter d'effet significatif sur la récupération fonctionnelle (Kishk *et al.*, 2010). Malgré des résultats intéressants chez l'animal, en particulier lors de la phase aiguë, et l'absence d'observation de complication, la transplantation de MSCs chez l'Homme n'a pas permis d'apporter un réel bénéfice aux patients médullo-lésés.

2.4.6. Cellules gliales olfactives

C'est en 1992 que Ramon-Cuedo et Nieto-Sampedro ont décrit les cultures primaires de BO de rat. Ils ont mis en évidence que cette culture permettait d'obtenir un mélange cellulaire composé de CGOs et de fibroblastes olfactifs identifiés respectivement par le p75NTR et la fibronectine. Les cultures primaires sont composées de 40% à 50 % de CGO et de 50% à 60% de fibroblastes olfactifs lorsqu'elles sont réalisées à partir des BO (Ramón-Cueto & Nieto-Sampedro, 1992; Gómez *et al.*, 2018).

Comme décrit précédemment dans la partie « bulbes olfactifs », il a été mis en avant que ces cellules secrètent un ensemble de molécules comme des facteurs neurotrophiques tels que le CNTF, le NGF et le BDNF mais aussi des molécules modulant la MEC comme les MMP2 et 9 (Wewetzer *et al.*, 2001; Gueye *et al.*, 2011). Ces caractéristiques ont donc poussé les chercheurs à analyser les propriétés de ces cellules en culture. La réalisation de co-cultures avec différentes lignées neuronales a permis de mettre en avant leur capacité *in vitro* à stimuler la croissance des neurites et leur myélinisation, à augmenter la prolifération et à stimuler la

survie des NSC en prévenant leur apoptose (Doncel-Pérez *et al.*, 2009; Pellitteri *et al.*, 2009; Runyan & Phelps, 2009).

Leurs propriétés *in vitro* combinées à leurs rôles physiologiques, ont fait des cultures primaires de CGOs, des candidates idéales pour la régénération tissulaire en particulier lors d'atteinte du SN. La première étude reportant les effets bénéfiques de la transplantation de CGO a été publiée en 1990, depuis elles ont été étudiées dans différents modèles pathologiques, permettant d'observer leurs propriétés *in vivo*. Par exemple, dans des modèles de transection de ganglion de la racine dorsale (DRG) au niveau thoracique, de lésion cérébrale (transection du fimbria-fornix) ou encore de transection du nerf sciatique, la transplantation de ces cellules a induit la régénération des axones (Ramón-Cueto & Nieto-Sampedro, 1994; Verdú *et al.*, 1999).

Le modèle le plus étudié est celui de la LMT. La première étude s'intéressant aux CGOs dans les LMTs a été publiée en 1997 et a démontré que cette transplantation favorisait la repousse axonale et la récupération fonctionnelle après une transection de la voie corticospinale (Li *et al.*, 1997). Ces résultats ont été confirmés en 1998 par Ramon-Cueto dans un modèle de transection complète de la moelle spinale chez le rat (Ramón-Cueto *et al.*, 1998). Il a aussi été mis en évidence que les CGOs stimulaient la remyélinisation après lésion médullaire chez le primate non-humain (Radtke *et al.*, 2004).

L'observation de ces effets bénéfiques malgré le manque de compréhension exacte des mécanismes, a amené à la réalisation de nombreux essais cliniques chez l'humain. Le premier a été reporté par Féron et son équipe en 2005, ne mettant pas en avant d'efficacité thérapeutique mais démontrant la faisabilité et la sécurité de cette technique. Depuis des dizaines de patients ont été transplantés après une LMT dans le monde entier (Féron *et al.*, 2005). Cependant l'observation de la récupération fonctionnelle de ces patients, a montré une efficacité thérapeutique hétérogène (Gómez *et al.*, 2018).

La première étude clinique sur plusieurs patients a été réalisée en Chine sur plus de 400 patients. Les auteurs ont observé chez la quasi-totalité des patients, une amélioration de la récupération 3 jours après la transplantation. Cependant Dobkin *et al.*, se sont intéressés à cette étude et ont conclu qu'il fallait modérer les résultats obtenus. Le phénotype et l'origine des cellules n'étaient pas clairement définis, de nombreuses complications peropératoires ont été observées et un faible effet bénéfique a réellement été observé (Dobkin *et al.*, 2006). Cette approche a aussi été réalisée au Portugal sur 7 patients AIS A et en Inde sur cinq patients médullo-lésés complets chroniques. La première conclut au potentiel bénéfique apporté par les

CGOs alors que dans la deuxième, aucun effet n'a été observé au niveau neurologique, électrophysiologique et sur les variables urodynamiques (Lima *et al.*, 2006; Chhabra *et al.*, 2009). En 2010, Lima et son équipe ont réalisé de nouveau une étude clinique sur vingt patients ayant une lésion médullaire moteur ou sensorimoteur complète et chronique. Ils ont observé une amélioration du score AIS chez onze patients, une amélioration de la réponse à l'électromyographie volontaire chez quinze patients et une amélioration des réponses urodynamiques (Lima *et al.*, 2010). Deux études réalisées en Pologne par Tabakow et son équipe ont montré des effets importants de la transplantation de CGOs. Dans la première, deux patients sur trois transplantés avec un mélange de CGOs et de fibroblastes olfactifs ont eu une augmentation du score AIS passant de A à B pour l'un et de A à C pour l'autre, corrélée à une augmentation de la récupération fonctionnelle (Tabakow *et al.*, 2013). Dans la seconde, un patient atteint d'une transection à l'étage médullaire Th9 depuis 21 mois a reçu ce même mélange cellulaire après résection de la cicatrice médullaire, ainsi qu'une greffe de quatre nerfs périphériques permettant la réalisation d'un pont. Après 6 mois, le score AIS de ce patient, est passé de A à B, et après 11 mois, de B à C (Tabakow *et al.*, 2014). Plus récemment, Chen *et al.*, ont publié les résultats d'un patient souffrant d'une LMT en C6-C7 depuis ses 21 ans et ayant reçu une transplantation de CGOs un an après le traumatisme, combinée à une rééducation intensive. Trois semaines après la transplantation, son score AIS était de A, avec un score moteur, de piqure d'épingle et de touché léger de 42, 34 et 40 respectivement. Six ans après la transplantation, ce patient a vu ses capacités motrices et sa sensibilité augmentée. Son score AIS est passé à C et le score moteur, de piqure d'épingle et de touché léger sont passés à 54, 66 et 82, respectivement. Ces scores sont associés à une récupération sur les mouvements des membres supérieurs, du tronc et des membres inférieurs, à une autonomie pour manger, s'habiller et écrire et une capacité à se lever et à marcher avec l'aide d'un déambulateur. Ce patient a aussi retrouvé une fonction rectale, urinaire et sexuelle.

L'obtention de tels résultats conforte dans l'efficacité des CGOs dans le traitement des LMTs malgré une hétérogénéité dans l'observation d'effets bénéfiques entre toutes les études cliniques (Chen *et al.*, 2022). Toutefois, l'obtention d'une telle hétérogénéité peut s'expliquer par un ensemble de paramètres. Dans ces études cliniques on observe des différences sur l'étage médullaire lésé, la proportion de CGO/fibroblastes olfactifs injectée, le temps passé depuis l'atteinte, le nombre de cellules, les points d'injections ou encore la profondeur de la lésion.

Afin de comprendre cette hétérogénéité et les mécanismes liés à la transplantation de CGOs, le laboratoire UR3830 s'intéresse, depuis plusieurs années, à la transplantation de ces

cellules dans des modèles de transection aux étages médullaires Th9-Th10 chez le rat et la souris. Les travaux de thèse réalisés par Xiaofei Li et Axel Honoré et moi-même, ont permis d'expliquer en partie, l'effet thérapeutique des BCGOs.

Pour cela, des cultures de neurosphères à partir de moelle spinale de souris hFoxJ1-CreERT2::YFP lésées ou lésées et transplantées avec des BCGOs ont été réalisées. Les résultats obtenus montrent que lorsque les BCGOs sont transplantées après une LMT, la quantité de neurosphères formées est doublée. Il est intéressant de voir que lorsque les BCGOs sont transplantées dans des animaux sains, n'ayant pas subi de lésion, la quantité de neurosphères est aussi doublée en comparaison de la quantité obtenue avec des cultures réalisées à partir d'animaux contrôles sains sans transplantation. On observe que 90% des neurosphères obtenues proviennent des cellules épendymaires, confirmant leur fonction de cellules souches neurales. Les BCGOs influencent aussi la différenciation des neurosphères. Celles obtenues à partir des animaux transplantés contiennent une proportion de neurones, identifiés par l'expression de Tuj1, plus importante que celle obtenue pour des cultures réalisées à partir d'animaux SCI (**Article I**).

Les neurosphères sont des structures propres à la culture cellulaire et les résultats obtenus *in vitro* ne permettent pas de prédire exactement les effets observés *in vivo*. C'est pour cela qu'une analyse *in vivo* des cellules épendymaires a été réalisée. Des souris FoxJ1-CreERT2-YFP, ont subi une LMT et ont reçu une transplantation de BCGOs, puis 15 jours après la LMT les moelles épinières ont été analysées en coupe transversale afin de pouvoir visualiser le canal central. On observe que la transplantation de BCGOs induit la prolifération des cellules épendymaires et de leur migration vers le site de lésion.

On observe que deux semaines après la lésion, la proportion d'astrocytes GFAP+ provenant des cellules épendymaires est plus importante chez les animaux ayant reçu les BCGOs après la LMT. Elle représente 40% des cellules épendymaires différenciées contre 20% chez les animaux lésés. Quatorze semaines après la LMT, la proportion de cellules Foxj1-YFP+/GFAP+ retourne à 20% chez les animaux transplantés. Malgré l'obtention de neurones *in vitro* à partir de neurosphères FoxJ1-YFP, on n'observe pas de neurone s'étant différencié à partir d'une cellule épendymaire *in vivo* (**Article I**).

Cependant, les BCGOs induisent une neurogenèse médullaire, identifiée deux semaines après la lésion par la présence de cellules DCX+/Edu+ (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine, analogue de la thymidine s'intégrant à l'ADN lors de la division cellulaire). En effet, après une LMT et

sans thérapie, il est connu qu'il n'existe pas de neurogenèse médullaire. La transplantation de bCGOs permet d'observer deux semaines après la LMT l'apparition de nouveaux neurones immatures (DCX+) provenant de cellules s'étant divisées (Edu+). Ces nouveaux neurones vont alors subir une étape de maturation et exprimer le marqueur des neurones matures NeuN (*neuronal nuclei*) sept et quatorze semaines après la LMT. Les bCGOs induisent donc l'activation de précurseurs neuronaux médullaires n'étant pas les cellules épendymaires FoxJ1. Cette observation est corrélée à la proportion de neurosphères Foxj1-YFP qui n'est pas totale. L'obtention de 10% de premières neurosphères non recombinaisons et la présence de nouveaux neurones n'exprimant pas la YFP, témoignent de la présence d'un précurseur neuronal médullaire qui n'a pas encore été identifié. On aurait donc, après la LMT et la transplantation de bCGOs, l'activation des cellules épendymaires spécialisées dans la génération de cellules gliales et l'activation d'un deuxième précurseur spécialisé dans la génération de neurones (**Article I**).

En plus d'agir sur l'activation et la différenciation des précurseurs neuronaux, la transplantation de bCGOs a aussi un effet sur la modulation de la MEC et sur l'équilibre moléculaire influençant la régénération axonale. En effet, l'analyse du site de lésion par RT-qPCR des ARN codant pour des molécules connues pour leurs effets inhibiteurs ou permissifs de la repousse axonale, a mis en avant une modulation de leur expression en présence de bCGOs. On observe que les bCGOs ont une faible action sur l'augmentation de l'expression des gènes permissifs mais induisent une diminution de l'expression d'un grand nombre de gènes inhibiteurs de la repousse axonale (**Article I**).

Afin de déterminer si l'effet des bCGOs sur la régénération tissulaire est dépendant des cellules épendymaires, le laboratoire a réalisé ces mêmes expériences avec des souris transgéniques permettant l'inhibition de la prolifération des cellules épendymaires, la lignée murine hFoxJ1-CreERT2::YFP-Rasless. L'analyse par RT-qPCR du site de lésion utilisant le même panel de gènes, montre que lorsque la prolifération des cellules épendymaires est inhibée, les bCGOs ne modulent plus la balance entre molécules permissives et inhibitrices de la repousse axonale. Ces résultats montrent que le mécanisme d'action des bCGOs sur la régénération médullaire après une LMT passe par une communication directe ou indirecte avec les cellules épendymaires. Les cellules épendymaires activées participent alors à la régénération médullaire en se différenciant en astrocytes bénéfiques à la survie cellulaire et à la croissance axonale (**Article I**).

La transplantation des bCGOs nécessite la réalisation de micro-injections dans la moelle spinale. En plus des risques de complications peropératoires provoquées par la rupture des méninges, la transplantation nécessite une chirurgie et une laminectomie affaiblissant la colonne vertébrale et un risque d'atteinte supplémentaire de la moelle spinale. C'est pour cela que récemment, une équipe a injecté des bCGOs à des rats médullo-lésés par voie intraveineuse, en passant par la queue. Elle a observé que les bCGOs vont au site de lésion et participaient à la régénération du tissu nerveux de la même façon que lorsqu'elles sont injectées directement dans la moelle spinale. Dès le premier jour et jusqu'au septième jours suivant la LMT et l'injection, la quantité de cônes de croissances identifiés par GAP-43 est augmentée. En parallèle, du troisième jour et jusqu'au vingt-huitième jours, on observe aussi une augmentation de la densité neuronale, comparé aux animaux n'ayant pas reçu de bCGOs. Les bCGOs injectées par voie intraveineuse ont aussi une action sur les cellules microgliales/macrophages, identifiées par Iba-1. A partir du septième jour, la réactivité des cellules microgliales/macrophages est diminuée, en comparaison des animaux n'ayant pas reçu de cellules. L'action des bCGOs sur les populations médullaires, se traduit par une amélioration de la récupération fonctionnelle identifiée par une amélioration du BBB score (Zhang *et al.*, 2019, 2021).

L'effet thérapeutique des bCGOs décrit dès la fin des années 1990 dans des modèles animaux et à partir des années 2000 chez l'humain, a depuis été confirmé dans un grand nombre d'études précisant chacune à leur tour, les paramètres importants à respecter pour l'obtention d'effets bénéfiques, comme la proportion de fibroblastes olfactifs/CGOs, la concentration des cellules injectées, les sites d'injections et la phase physiopathologique. Elles ont apporté des connaissances sur leurs effets sur la modulation de la réponse inflammatoire, la cicatrice médullaire, la modulation de l'environnement cellulaire, la croissance axonale et la récupération fonctionnelle. Les différents essais cliniques réalisés, confirment l'intérêt que suscite la transplantation de CGOs après une lésion médullaire chez l'homme. Malgré plusieurs essais cliniques n'ayant rapporté aucun effet bénéfique, la transplantation de CGOs est l'une des thérapies cellulaires favorisant le plus la régénération médullaire.

La poursuite de la compréhension des propriétés des CGOs et des effets qu'elles produisent permettront d'optimiser leur utilisation, mais aussi d'expliquer les différences observées entre les modèles animaux et les essais cliniques. Chez l'animal, les CGOs apportent des effets thérapeutiques plus importants, conduisant à une régénération axonale et à la récupération de fonctions sensorimotrices supérieures à celles obtenues chez l'humain. Les

différences évidentes entre les modèles animaux et l'Homme permettent de comprendre que les CGOs ne soient pas aussi efficaces chez l'Homme. Cependant un paramètre important, jamais exploré jusqu'à présent, semblerait pouvoir influencer les effets bénéfiques des CGOs. Dans les études chez l'animal, des transplantations allogéniques sont réalisées. Les cultures primaires de CGO sont réalisées à partir de OB provenant d'animaux sains, n'ayant pas subis de LMTs. Alors que chez l'Homme, on réalise des transplantations autologues, à partir de prélèvements provenant du patient médullo-lésé. La LMT, engendrant un traumatisme généralisé de l'organisme, influence l'état des cellules périphériques et encore plus celles du cerveau dont le OB. Dans ce contexte, la LMT pourrait donc influencer l'effet thérapeutique de la transplantation autologue de CGOs chez les patients.

OBJECTIFS DE THESE

L'ensemble des travaux de thèse a été réalisé dans le laboratoire UR 3830 – GRHVN (Groupe de Recherche sur le Handicap Ventilatoire et Neurologique), sous la direction du Pr. Nicolas Guérout. Ils s'inscrivent directement dans la continuité des travaux de recherche réalisés au sein du laboratoire ayant pour objectif, de contribuer à la compréhension de la physiopathologie des LMTs et de développer de nouvelles approches thérapeutiques capables de restaurer les fonctions neurologiques perdues à la suite des lésions nerveuses centrales et périphériques.

Depuis plusieurs années, notre laboratoire s'est intéressé particulièrement aux propriétés neuro-régénératives des CGOs. Les premiers travaux réalisés ont mis en avant les atouts liés à l'utilisation de CGO provenant du bulbe olfactif plutôt que de celles provenant de la muqueuse olfactive en particulier dans la réhabilitation des lésions des nerfs périphériques. Afin d'expliquer ces effets, le laboratoire a poursuivi l'étude de CGOs en comparant la composition cellulaire de la muqueuse olfactive et des bulbes olfactives. Il a mis en évidence que les populations de CGOs étaient divisées en deux sous-populations ayant des fonctions variées lors de la neurogenèse du système olfactif chez le modèle murin. Les études suivantes se sont intéressées à comparer les propriétés thérapeutiques des CGOs de la muqueuse olfactive et du bulbe olfactif dans un modèle murin de lésion médullaire. Comme précédemment, l'utilisation de cultures primaires de CGOs provenant du bulbe olfactif (bCGOs) a apporté de meilleurs résultats d'un point de vue neurorégénératif que les cultures primaires de CGOs provenant de la muqueuse olfactive (mCGOs).

Afin de poursuivre les travaux réalisés dans le laboratoire, l'objectif global de ma thèse a été d'améliorer les connaissances de la physiopathologie des LMTs ainsi que la caractérisation et l'amélioration de deux thérapies médullaires : La transplantation de bCGOs et la rTSMS. Pour cela, cinq objectifs ont été définis.

Le premier objectif, s'inscrivant dans la poursuite des travaux de thèse du Dr. Xiaofei Li et du Dr. Axel Honoré, a été d'améliorer la compréhension du mode d'action des bCGOs après LMT, d'un point de vue cellulaire et moléculaire, en s'intéressant particulièrement à l'interaction des bCGOs avec les cellules épendymaires, et sur la modulation de l'environnement cellulaire de la cicatrice gliale. L'étude présentée dans l'**Article II** a été

développée en s'appuyant sur les résultats obtenus dans l'**Article I**. De ce fait les résultats de ce dernier, ont été détaillés précédemment dans l'introduction (**Article I et II**).

Convaincu de l'effet thérapeutique des bCGOs, le deuxième objectif a été d'améliorer cet effet thérapeutique et d'essayer d'expliquer les différences d'efficacité observées entre les modèles animaux et les essais cliniques sur l'Homme. Pour cela, les conséquences de la LMT sur le potentiel thérapeutique des bCGOs ainsi que des MSCs lorsqu'elles sont transplantées dans un contexte d'autogreffe chez la souris, ont été explorées. Dans un premier temps, les conséquences ont été étudiées *in vivo* sur les bulbes olfactifs et le tissu adipeux puis *in vitro* sur des cultures primaires de bCGOs et des cultures purifiées de MSCs. Ensuite, l'effet thérapeutique de ces deux types cellulaires selon qu'ils proviennent d'animaux sains ou médullo-lésés a été comparé *in vivo* dans un modèle de LMT chez la souris. Pour cela la réponse cellulaire, la régénération axonale et la récupération fonctionnelle ont été analysées lors de trois stades de la pathologie, au stade aigu (14 jours), au début du stade chronique (28 jours) et au stade chronique (56 jours) (**Article II**).

Le troisième objectif quant à lui, a pour but de définir si la transplantation médullaire de bCGOs après LMT, peut agir sur le cerveau. En effet, de nombreuses études permettent maintenant de considérer la LMT comme une atteinte entraînant une perturbation généralisée de l'organisme, provoquant des modifications cérébrales responsables d'états dépressifs, anxieux et d'une baisse des capacités mémorielles chez le patient. Pour cela les performances cognitives ont été étudiées, complétées par une analyse histologique des populations cellulaires de l'hippocampe (**Article II**).

A la vue des contraintes cliniques que présentent la transplantation de bCGOs dans la moelle épinière, le laboratoire a décidé d'explorer un traitement non invasif connu pour ses effets neuroprotecteurs et neurotrophiques dans le SNC; la rTSMS. Une première étude a démontré que la rTSMS apporte un important effet thérapeutique dans un modèle de LMT chez la souris en stimulant le recrutement des cellules épendymaires au site de lésion et en réduisant la cicatrice médullaire favorisant la régénération axonale (**Annexe I et Annexe II**). Le quatrième objectif a donc été de poursuivre le développement de cette thérapie en réalisant une étude semblable mais sur un autre modèle animal, le rat (**Article III**).

Enfin le cinquième et dernier objectif de ma thèse a été d'essayer de déterminer le mode d'action de la transplantation de bCGOs et de la rTSMS, en réalisant une comparaison de ces deux thérapies. Afin d'y répondre, des souris ont reçu soit une transplantation de bCGOs, soit

l'application de la stimulation magnétique pendant 14 jours ou soit les deux thérapies. Après une caractérisation des effets de la rTSMS sur la survie des bCGOs transplantées, la régénération tissulaire et la récupération fonctionnelle des souris ont été analysées (**Article IV**).

RÉSULTATS

Article I

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

Li, X.*, Honore, A.*, Delarue, Q.*, Chalfouh, C., Di Giovanni, M., Vaudry, D., Salaun, M., Marie, J.P., A., Barnabé-Heider, F., Guérout, N.

En cours de finalisation pour une future soumission.

*: equal contribution

Introduction article I

Un nombre important d'études s'est intéressées à l'effet des CGOs dans des modèles animaux de LMTs mais aussi chez l'Homme. Beaucoup se sont intéressées aux effets neurorégénératifs et immunomodulateurs qui conduisent à l'amélioration de la récupération motrice. Cependant, peu ont investigué le mode d'action des CGOs après transplantation. L'hypothèse que les CGOs communiquent de façon directe ou indirecte avec les cellules médullaires, en particulier avec les cellules épendymaires, serait l'un de leurs mécanismes d'action, ceci a donc été exploré dans le laboratoire.

Ce projet a fait l'objet en partie d'une thèse commune réalisé par le Dr. Xiaofei Li et le Dr. Axel Honoré, sous la direction du Pr. Nicolas Guérout, au sein du laboratoire UR3830. Il repose sur la mise en commun de l'expertise du laboratoire sur la transplantation des CGOs dans des modèles animaux de lésions nerveuses et de l'expertise des cellules épendymaires apprise par le Dr. Xiaofei Li et le Pr. Nicolas Guérout au Karolinska Institutet à Stockholm en Suède. À la suite de leur départ, les travaux étant inachevés, j'ai donc poursuivi leurs recherches.

Notre étude repose sur l'utilisation de deux lignées transgéniques hFoxJ1-CreERT2::YFP, permettant le suivi spécifique dans la moelle spinale des cellules épendymaires et de leurs progénies, et la lignée hFoxJ1-CreERT2::YFP-Rasless, permettant l'inhibition du cycle cellulaire des cellules épendymaires. L'action des transgènes est dépendante de la recombinase Cre, induite par l'injection de tamoxifène, permettant ainsi un contrôle de l'induction de la recombinaison.

Ces deux lignées de souris ont été divisées en deux groupes : contrôle, nommé DF10S et transplanté, nommé bOEC. Après une LMT modérée à l'étage médullaire Th9, elles ont reçu deux injections de 2 μ L, rostro-caudales de part et d'autre de la lésion. Les souris du groupe DF10S ont reçu deux injections de milieu de culture et les souris du groupe bOEC ont reçu deux injections de cultures primaires de bCGOs, à raison de 50 000 cellules par injection. L'effet de la transplantation a été évalué *in vitro* et *in vivo*.

Tout d'abord, des cultures de neurosphères à partir de moelles spinales obtenues sur des animaux non transgéniques, *wild type* (WT), transplantés ou non, ont été réalisées afin d'étudier l'effet des bCGOs sur l'induction du potentiel souche médullaire. Ensuite, la contribution des cellules épendymaires dans la génération de neurosphères et la différenciation de ces dernières

en astrocytes, oligodendrocytes et neurones, en présence ou en absence de bCGOs a été explorée. Afin de corréler les résultats obtenus *in vitro*, la contribution des cellules épendymaires dans la régénération médullaire en présence de bCGOs a été analysée *in vivo* sur des souris hFoxJ1-CreERT2::YFP. Pour cela, 2 et 14 semaines après la lésion et la transplantation cellulaire ou l'injection de DF10s, le pourcentage de différenciation des cellules épendymaires en oligodendrocytes (Olig2+) et en astrocytes (GFAP+) a été étudié. Cette analyse appuyée par l'étude d'Anderson et al., montrant qu'après une LMT les astrocytes sécrètent des facteurs à la fois inhibiteurs et permissifs de la repousse axonale, a été complétée par la caractérisation immunohistochimique de l'astroglie et de la survie neuronale, ainsi que par la mesure par RT-qPCR, des variations d'ARNm codant pour ces facteurs.

La neurogenèse médullaire est un processus inexistant en absence d'une thérapie. Pour déterminer si les bCGOs induisent une neurogenèse médullaire après LMT, les moelles spinales d'animaux hFoxJ1-CreERT2::YFP provenant des groupes DF10S et BOEC, ont été analysées par immunohistochimie. L'identification de la neurogenèse et la génération de nouveaux neurones immatures a été réalisée à deux semaines après la lésion en utilisant les marqueurs EdU et DCX, puis elle a été réalisée quatorze semaines après la lésion à l'aide des marqueurs EdU et NeuN afin d'observer la maturation de ces nouveaux neurones.

Enfin, pour confirmer le rôle joué par la communication cellules épendymaires/bCGOs, la survie neuronale et les variations d'ARNm codant pour des molécules permissives et inhibitrices de la repousse axonale ont été mesurées deux semaines après la lésion et la transplantation chez des souris hFoxJ1-CreERT2::YFP-Rasless.

Afin de finaliser cette étude, des analyses par *single cell nucleus sequencing* sont en cours de réalisation, dans le but de caractériser au mieux les effets des transplantations de bCGOs sur les cellules épendymaires mais aussi sur les autres populations médullaires. Ces analyses sont en collaboration avec le Karolinska Institutet à Stockholm, le MIT de Boston et l'université hébreux de Jérusalem.

Ces travaux sont actuellement en cours de finalisation pour une future soumission dans laquelle je serai co-premier auteur.

**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-Heider^{1,5},
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., Pfrieger, F.W., Meletis, K., and Frisen, J. (2010). Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell* 7, 470-482.

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., Lundeborg, 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 ± 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 ± 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/immunocytochemistry 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

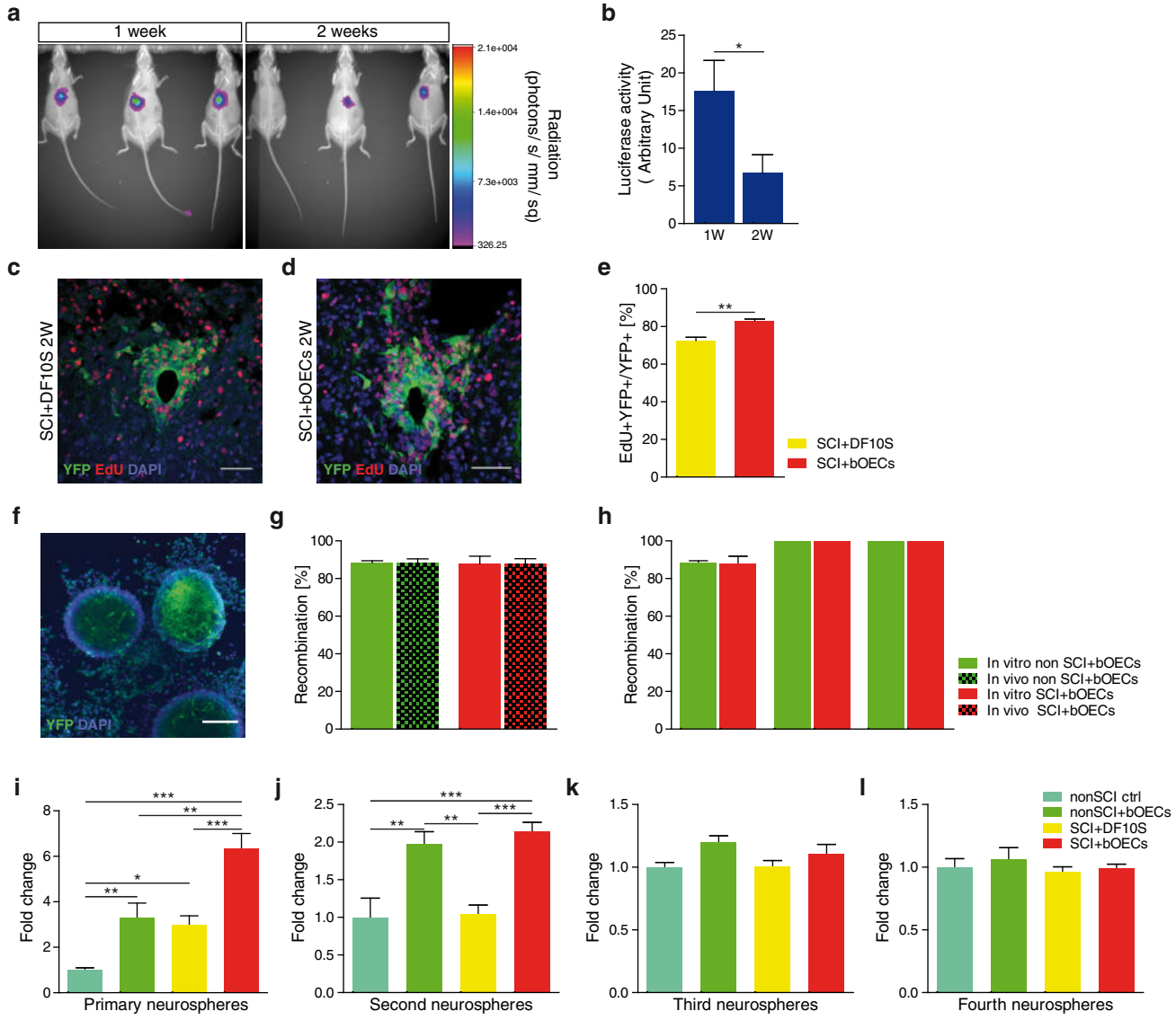


Figure 2

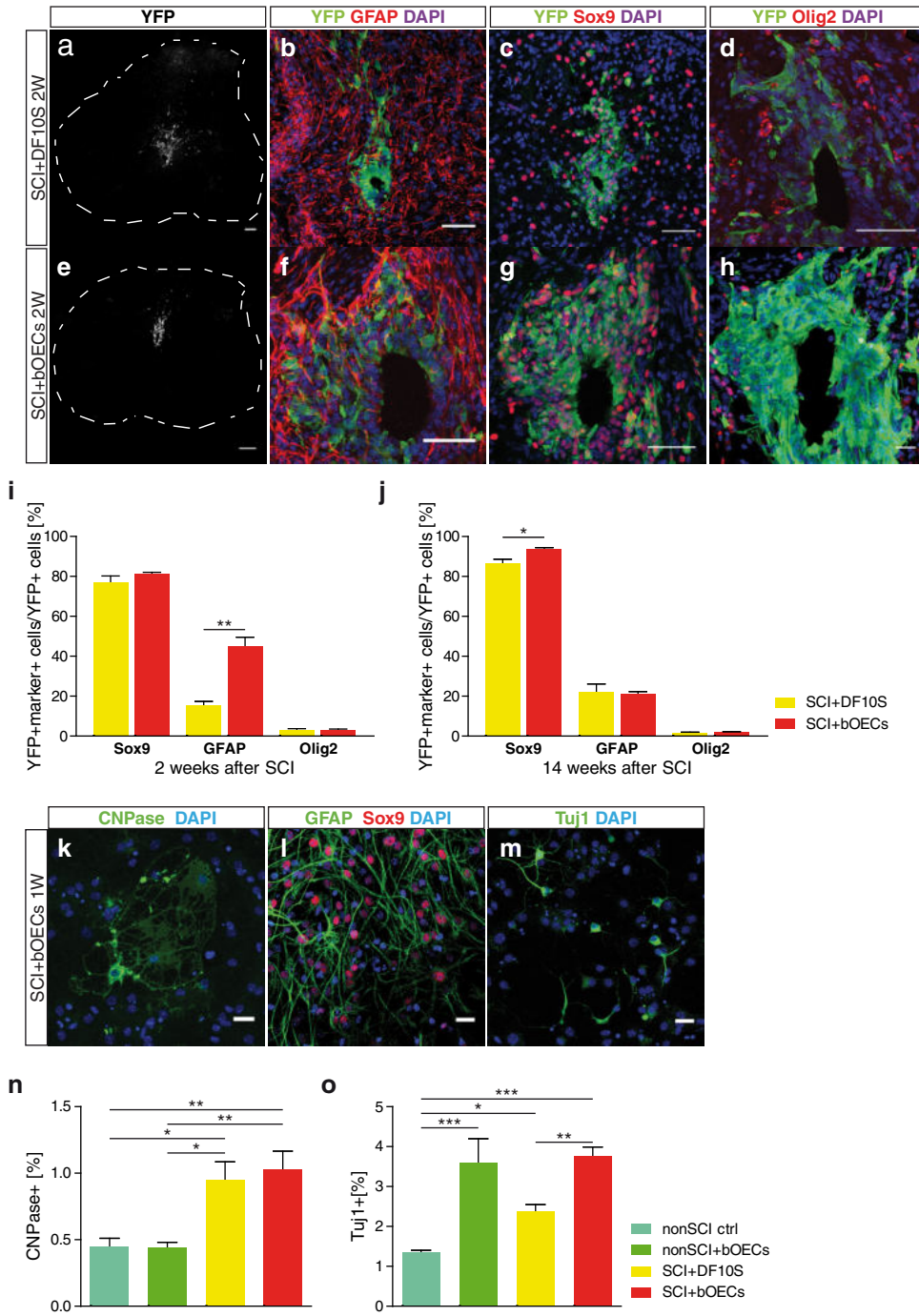
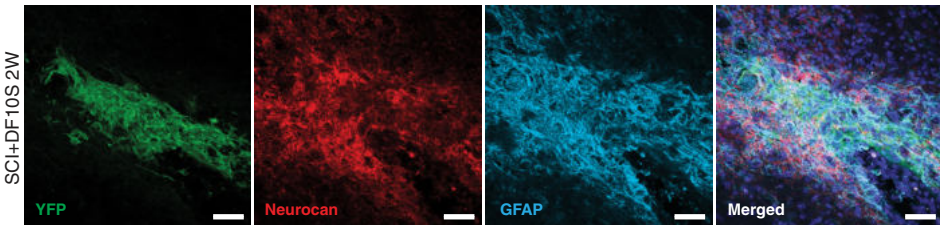
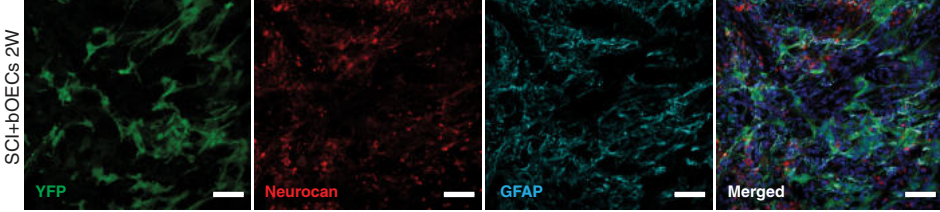


Figure 3

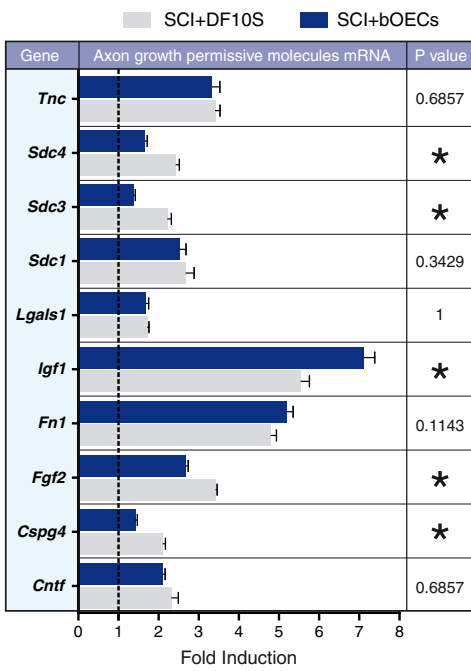
a



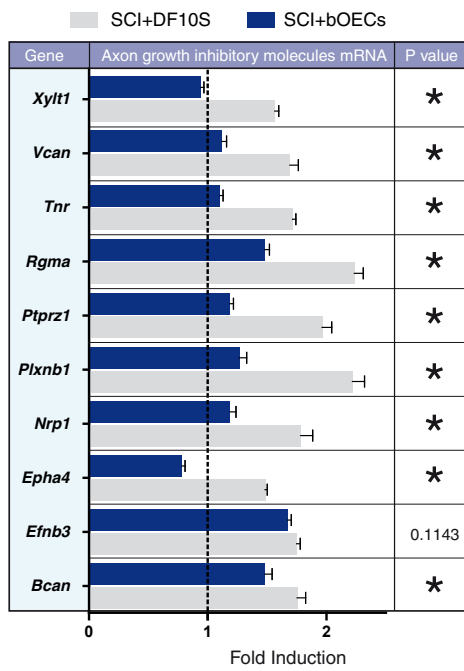
b



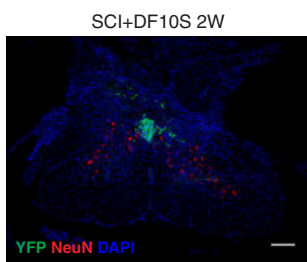
c



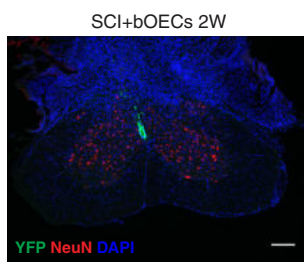
d



e



f



g

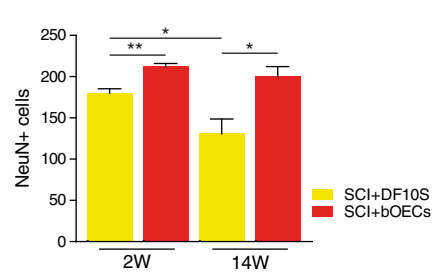
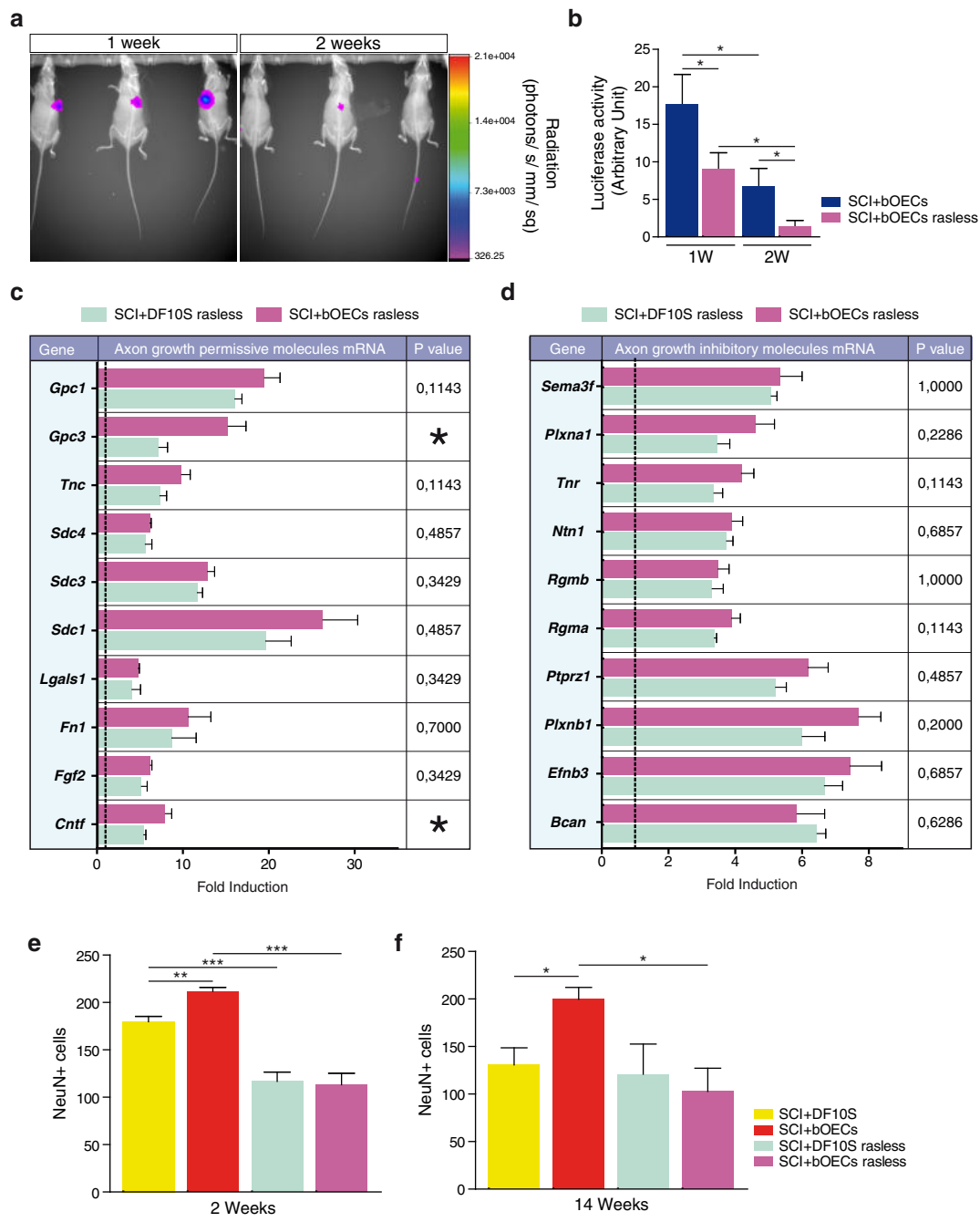


Figure 4



Article II

Spinal cord Injury: Can the lesion alter the therapeutic potential of the transplanted cells in an autograft model

Delarue Q., Brodier M., Robac A., Blondin A., Guillou C., Duclos C., Pileyre B., Moncomble L., Lecras P., Hugede A., Neveu P., Riou G., Cosette P., Marie J. P., Guerout N.

En cours de finalisation pour une future soumission.

Introduction article II

La découverte de perturbations cellulaires et moléculaires dans les organes périphériques et dans le cerveau, induites par la LMT, ont changé la considération de la physiopathologie de la LMT et suscité des questions quant à l'utilisation de matériel biologique, à des fins thérapeutiques, provenant d'un organisme traumatisé. En effet, après la LMT, la libération de cytokines pro-inflammatoires et de signaux cellulaires de « danger », provoquent une activation générale du système immunitaire et la réactivité des cellules présentes dans les organes périphériques et dans le cerveau (Anthony & Couch, 2014). Notre hypothèse était que la transplantation cellulaire autologue chez un patient souffrant d'une LMT, apporterait des effets thérapeutiques réduits, provoqués par une dégradation du matériel biologique lorsque celui-ci est prélevé sur un patient médullo-lésé.

Afin d'explorer la qualité thérapeutique des cellules lorsqu'elles sont prélevées après une LMT, la transplantation de bCGOs a été choisie comme modèle cellulaire thérapeutique. Les bCGOs sont étudiées depuis plusieurs décennies par différentes équipes dont la nôtre, et ont apporté beaucoup d'espoirs quant à leur efficacité dans le traitement des LMTs. En effet, dans différents modèles animaux, la transplantation de bCGOs a favorisé la régénération tissulaire et la croissance axonale se traduisant par une récupération de certaines fonctions, dans des modèles de LMTs mais aussi de lésions de nerfs périphériques. Cependant les études cliniques chez l'Homme n'ont pas toujours réussi à confirmer les effets thérapeutiques observés chez les animaux, apportant une hétérogénéité dans les résultats. L'une des différences majeures entre les études chez les modèles animaux et chez l'Homme, est le type de transplantation réalisé. Chez l'animal elle est souvent allogénique, les cellules sont prélevées sur un animal sain avant d'être transplantées dans un deuxième animal lésé, alors que chez l'Homme, des transplantations autologues sont réalisées. C'est pourquoi nous nous sommes demandé qu'elles seraient les conséquences de la LMT sur l'effet thérapeutique des bCGOs.

Pour cela, j'ai tout d'abord réalisé une caractérisation *in vivo* de la réactivité microgliale ainsi que de la variation des ARNm présents dans les bulbes olfactifs d'animaux sains, sans LMT et chez des animaux ayant subi une LMT modérée (rupture non complète des cornes ventrales), à l'étage médullaire Th9, sept jours après la lésion. La caractérisation a été complétée *in vitro* par l'analyse des cultures primaires de bCGOs H (prélevées sur des animaux non médullo-lésés) et de bCGOs I (prélevées sur des animaux sept jours après une LMT), en se focalisant sur la proportion de chaque type cellulaires présent, et sur le profil d'expression des

ARNm, selon un panel de gènes permissifs et inhibiteurs de la régénération axonale défini précédemment (Anderson *et al.*, 2016). Ensuite, les deux populations cellulaires, bCGOs H et bCGOs I, ont été transplantées par deux injections rostro-caudales de part et d'autre de la lésion à raison de 50 000 cellules par injection, chez des animaux ayant subi une LMT. Après une analyse de la survie des cellules transplantées, la comparaison de leurs effets thérapeutiques a été mesurée par des tests fonctionnels sensori-moteurs et par une analyse tissulaire, cellulaire et moléculaire de la zone lésionnelle et périphérique 14, 28 et 56 jours après la lésion.

Cette étude a été complétée par une analyse du potentiel thérapeutique que pouvait avoir les bCGOs H sur la réactivité cérébrale et plus précisément sur la modulation des populations cellulaires de l'hippocampe, lorsqu'elles sont transplantées après une LMT. Afin de répondre à cette question, des souris souffrant d'une LMT ont reçu une transplantation de bCGOs H comme décrit précédemment. Un ensemble de tests cognitifs mesurant la mémoire, l'anxiété, la résilience et l'anhédonie des animaux ont été réalisés un et deux mois après la lésion. Afin d'expliquer les résultats obtenus lors des tests cognitifs, une analyse de la neurogenèse, de la densité neuronale et de la réactivité microgliale hippocampique a été réalisée 14, 28 et 56 jours après la lésion.

Pour compléter cette étude et améliorer la compréhension des mécanismes impliqués, les conséquences de la LMT sur la qualité thérapeutique des cellules prélevées sur un animal médullo-lésé, un deuxième modèle de transplantation cellulaire a été utilisé : les MSCs. Ces cellules obtenues à partir du prélèvement du tissu adipeux, ont aussi montré leur potentiel thérapeutique après une LMT. En suivant le paradigme précédent, des MSCs H et MSCs I ont été générées et transplantées par deux injections rostro-caudales de part et d'autre de la lésion à raison de 100 000 cellules par injection, chez des animaux ayant subi une LMT. La comparaison de leurs effets sur la régénération médullaire, la repousse axonale et la récupération fonctionnelle a été conduite 56 jours après la LMT. Pour finir, nous nous sommes aussi intéressés aux potentiels effets que pouvait amener la transplantation médullaire de MSCs H après une LMT, sur la réactivité cérébrale. Pour cela, une analyse des performances mémorielles des animaux et une analyse histologique de leur hippocampe ont été réalisées.

Ces travaux sont actuellement en cours de finalisation pour une future soumission dans laquelle je serai premier auteur.

Spinal cord Injury: Can the lesion alter the therapeutic potential of the transplanted cells in an autograft model?

Authors:

Quentin Delarue^{1*}, Matthis Brodier¹, Amandine Robac¹, Axelle Blondin¹, Clément Guillou³, Célia Duclos¹, Baptiste Pileyre², Laurine Moncomble¹, Pamela Lecras⁴, Alizée Hugede¹, Pauline Neveu¹, Gaëtan Riou², Pascal Cosette³, Jean-Paul Marie¹, Nicolas Guérout^{1,5*}.

Affiliations:

1. Normandie univ, UNIROUEN, UR3830 GRHVN, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000 Rouen, France.

2. Normandie univ, UNIROUEN, INSERM U1234, CHU Rouen, Department of Immunology and Biotherapy, F-76000 Rouen, France.

3. Normandie Univ, UNIROUEN, PISSARO Proteomics Facility, IRIB, 76130 Mont-Saint Aignan, France & PBS-UMR6270 CNRS, FR3038 CNRS, 76130, Mont-Saint Aignan, France.

4. Normandie Univ, UNIROUEN, PRIMACEN Facility, IRIB, 76130 Mont-Saint Aignan, France & PBS-UMR6270 CNRS, FR3038 CNRS, 76130, Mont-Saint Aignan, France.

5. Université Paris Cité, CNRS UMR8003, Saints-Pères Paris Institute for Neurosciences, F-75006 Paris, France.

***Corresponding Authors:**

Quentin Delarue: quentindelarue.rd@gmail.com

Pr. Nicolas Guérout: nicolas.guerout@u-paris.fr

Abstract:

Spinal cord injuries (SCI) are serious pathologies of the central nervous system (CNS) that lead to loss of motor, sensory and autonomic functions in affected patients and are currently incurable.

The consequences of SCI are not only limited to an inflammation of the CNS but induce also a systemic inflammation whose effects are increasingly well characterized. In particular, SCI leads to cerebral inflammation responsible for a loss of cognitive functions.

Numerous therapies, including cell-based therapies, have been tested as potential treatments for SCI. However, in animal models, the transplanted cells are systematically taken from healthy animals, whereas in humans, they are in the form of autografts.

Therefore, we were interested in the effects of the lesion on the neuro-repairing potential of two distinct cell types; olfactory ensheathing cells (OECs) harvested from the olfactory bulbs and mesenchymal stem cells (MSCs) harvested from the adipose tissue.

By means of functional sensory-motor studies, histological and gene expression analyses, we were able to demonstrate for the first time that the lesion negatively impacts the properties of the cultured and transplanted cells after SCI.

Furthermore, in a second approach, we are interested in the effects of cell transplantation on cognitive abilities in injured mice. Thus, for the first time, we show that a treatment applied at the spinal cord level can lead to a recovery of the cognitive functions disturbed by the initial SCI.

These innovative results shed new light on the future use of cell transplants in auto-transplantation, but also on the use of these cells in the context of cognitive losses following SCI.

INTRODUCTION:

Spinal cord injuries (SCI) are rare traumatic injuries of the spinal cord. These injuries are caused by road accidents, falls, violence or sports-related accidents. They occur most often in young, healthy people, but also in people over 60 (Golestani *et al.*, 2022). No curative treatment can be offered to people with SCI, so these patients remain disabled for life. Depending on the severity of the injury, SCI can result in complete or incomplete motor, sensory or autonomic deficits below the site of injury.

From a cellular and molecular point of view, following the primary traumatic injury, a series of events that characterize the secondary injury take place. In particular, the initial damage induces a rupture of blood vessels, cell death of neurons and oligodendrocytes, which leads to an infiltration of immune cells such as neutrophils and macrophages, but also enhances the reactivity of the resident immune cells; microglial cells (Shechter & Schwartz, 2013; Mortazavi *et al.*, 2015). The reactivity of these different immune cells induces a response from astrocytes and ependymal cells which, once activated, set up a medullary scar that prevents the expansion of the lesion (Sabelström *et al.*, 2013; Anderson *et al.*, 2016).

This series of events following SCI is well described and characterized in the spinal cord. However, it has more recently been reported that SCI also leads to brain and even systemic inflammation. Notably, in 2020, Li *et al.* described that the massive inflammation induced by SCI induces brain inflammation that leads to cognitive decline in mice (Li *et al.*, 2020).

From a therapeutic point of view, many treatments have been investigated through basic or clinical studies in order to propose a curative therapy to these patients. These include the modulation of the lesion environment by enzymes to increase axon regrowth or, more recently, methodologies that use human/machine interfaces (Benabid *et al.*, 2019; Schneider *et al.*, 2019). One of the therapeutic avenues that is the subject of a very large number of studies is cell transplantation. Indeed, different cell types have been studied in the context of SCI. Thus, the

effects of transplantation of stem cells such as haematopoietic or mesenchymal stem cells (MSCs) (Boido *et al.*, 2014), but also of differentiated cells such as Schwann cells (Park *et al.*, 2010) or olfactory ensheathing cells (OECs) (Ursavas *et al.*, 2021) have been studied after SCI. Although these cell types differ in their origin and properties, common repair mechanisms have been described in different studies. Thus, following transplantation of these different cell types, a modification of the lesion microenvironment could be observed, which allows modulation of the spinal scar and reduction of the secondary lesions (Assinck *et al.*, 2017).

It has also been described that cell transplantation can induce axonal regrowth or survival. In addition, more specific mechanisms for certain cell types have been reported. In particular, the transplantation of cell types such as OECs or MSCs has been described as able to modulate the inflammatory response that takes place after SCI. In particular, although these cells when transplanted after SCI do not integrate into the spinal cord parenchyma, it has been described that their transplantation can modulate the profile of microglia and macrophages; from a pro-inflammatory to an anti-inflammatory phenotype (Han *et al.*, 2015; Jiang, Wang, *et al.*, 2022). The properties of these cells and their ability to induce tissue repair and functional recovery after transplantation in SCI have led to their use in clinical trials. Studies on the transplantation of OECs in humans report inconsistent results (Gómez *et al.*, 2018). Indeed, some studies report an improvement of the ASIA score in treated patients and others show no difference after treatment. Differences in culture and transplantation methods between humans and rodents may explain these differences in results. An important difference between animal and human studies is that transplants in humans are autografts, whereas in animals, healthy animals are used to perform cell cultures. In the light of recent studies that highlight the systemic inflammatory role that SCI can play (Li *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2014; Solstrand Dahlberg *et al.*, 2018); it appears that the parameter of the lesion itself on the neuroregenerative capacities of the transplanted cells has never been investigated. Therefore, in our study we have investigated the effects of

SCI on the properties of OECs and MSCs in the context of transplantation for SCI treatment by mimicking an autograft model in mice. The inflammation-regulating properties that these cells can exert also led us to study the role of transplantation of these cells after SCI on cognitive functions and brain inflammation.

MATERIALS AND METHODS

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 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 (#26905)

Animals

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 326 mice were included in this study. We used three mouse lines in this study: 290 wild type (WT) C57BL/6 mice, 12 Rosa26-tdTomato mice and 4 (CAG-luc,-GFP) L2G85Chco^{+/+} (FVB-Tg(CAG-luc,-GFP) L2G85Chco/J,) mice called Luciferase (LUX) thereafter. Then, LUX mice have been crossed with C57BL/6 mice three times consecutively to be sure to avoid any problem related to the strains. LUX mice were obtained from the Jackson Laboratory (<https://www.jax.org/strain/008450>, RRID:IMSR_JAX:008450).

All experiments were performed on adult mice at 8-12 weeks of age (average weight 20 g for females and 25 g for males). All experimental groups were formed with sex ratio of 50:50. Our study was composed of four main experimental groups (**Figure 1**):

Non-injured control group: animals without SCI used to define base lines in histological and functional experiments.

SCI control group: animal received spinal cord injury without transplantation.

SCI + bOECs H group: animal received spinal cord injury and primary bOECs transplantation was performed right after SCI. OB used for preparing primary bOECs culture was obtained from non-injured animals.

SCI + bOECs I group: animal received spinal cord injury and primary bOECs transplantation was performed right after SCI. OB used for preparing primary bOECs culture was obtained from previously SCI-injured animals.

Primary olfactory bulb culture and cell transplant preparation

Olfactory bulb (OB) primary cultures were prepared as described previously (Delarue et al., 2020; Guérout et al., 2010). Briefly, mice were anesthetized with 2% of isoflurane (Iso-Vet, Osalia, Paris, France) then euthanized by decapitation and OBs were extracted from the brain and put in cold PBS. After incubation in trypsin 0.25% (2.5% Trypsin 10X, 15090-046, Thermofisher), the tissue was dissociated mechanically. When dissociated, cells were cultured in T25 flask with 5 ml of DF-10S media (DMEM:F12 + glutamax, 0.5% Penicillin/Streptomycin, and 10% heat-inactivated fetal bovine serum). One month after plating, cultures were trypsinized and cells were counted to prepare a cell suspension at 25.000 cells/ μ L in DF-10S for the transplantation.

Mesenchymal stem cell culture and cell transplant preparation

Mesenchymal stem cell (MSCs) cultures were prepared from adipose tissue. Briefly, mice were anesthetized with 2% of isoflurane (Iso-Vet, Osalia, Paris, France) then euthanized by decapitation. Adipose tissue from abdomen was isolated and put in cold PBS. After laceration with syringe, tissue was dissociated with NB5 collagenase (Nordmak, N0002778) on orbital shaker during 1h. When dissociated, cells were cultured in T75 flask with 15 ml of media

(DMEM:F12 + glutamax, 1% Penicillin/Streptomycin, and 20% heat-inactivated fetal bovine serum). One week after plating, culture was trypsinized and replating in T75 flask. The cultures are passed to obtain purified MSCs. After three passing, cells were counted, and cell suspension was prepared at 50.000 cell/ μ L in culture media for the transplantation.

Flow cytometry and bOECs characterization

Cells were characterized by flow cytometry 1 month after plating. The number of primary bOECs were adjusted to a density of 2×10^5 cells/ml PBS/ 0.5% bovine serum albumin (BSA) solution. TruStain FcX™ PLUS (BioLegend) was added to block non-specific binding. The cell populations were identified using anti-p75 nerve growth factor receptor (p75, Abcam, ab8874, RRID:AB_306827) and rat anti-platelet-derived growth factor β (PDGFR β , Abcam, ab91066, RRID:AB_10563302) primary antibodies. OECs were identified as P75 positive and PDGFR β negative cells. Stromal cells were identified as PDGFR β positive and P75 negative cells. P75 and PDGFR β primary antibody were revealed with the anti-rabbit phycoerythrin fluorochrome-conjugated (PE, poly4064, BioLegend, 406408, RRID:AB_10643424) and the anti-rat Alexafluor 488 fluorochrome-conjugated antibodies (AF488, MRG2b-85, BioLegend, RRID:AB_2715913) respectively. Data were analyzed using FlowJo software (version 10.3; FlowJo LLC).

Flow cytometry and MSCs characterization

Cells were characterized by flow cytometry after three passages. The number of MSCs were adjusted to a density of 2×10^5 cells/ml in PBS/ 0.5% BSA solution. TruStain FcX™ PLUS (BioLegend) was added to block non-specific binding. CD105 positive, CD31 negative and CD34 negative cells were defined as MSCs. CD105 negative, CD31 positive and CD34 positive cells were defined as endothelial cells. Cells were revealed with the anti-endoglin conjugated with peridinin-chlorophyll-protein complex-cyanine5.5 (CD105-PerCP-Cy5.5, Sony, 1202080), anti-PECAM1 conjugated with phycoerythrin (CD31-PE, Sony, 1112040) and anti-

mucosialin conjugated with allophycocyanin (CD34-APC, Sony, .1243060) antibodies. Data were analyzed using FlowJo software (version 10.3; FlowJo LLC).

Real-time quantitative polymerase chain reaction characterization

Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) experiments were performed to evaluate the mRNA expression level of cytokines, chemokines and inflammatory molecules in OBs and adipose tissue without SCI and 7 days after SCI and in BV2 cell cultures (BV2 control, BV2 + bOECs H CM and BV2 + bOECs I CM) (**Table 1**). In complement, RT-qPCR experiments were performed to measure the mRNA expression level of axon growth inhibitory and axon growth permissive molecules, as well as neurotrophic factors (**Table 2**) in primary bOEC cultures and MSCs cultures. Total RNAs from OBs and adipose tissue were extracted after dissociation, in the same way as for the realization of the cultures, 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). 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^{-DDCq}. To standardize the relative amount of cDNA, three housekeeping genes were used: gapdh, b2m and actb. All experiment were conducted in duplicate.

Surgical procedure and cell transplantation

SCI was performed at T9-T10 level as described previously (Delarue et al., 2020). After dorsal incision and laminectomy of T7 vertebrae, incomplete transection of the spinal cord was performed to preserve the lower part of the ventral horns while completely injured the central part and the dorsal horns of the spinal cord. The SCI performed with 25-gauge needle: right after making the lesion, bOECs were transplanted. BOECs or the MSCs were transplanted with micromanipulator arm fixed on stereotaxic frame (World Precision Instrument). Thus, bOECs or MSCs were injected using a 1 mm sterile glass capillary needle which was attached to the micromanipulator. Injections were delivered at 1mm depth, 1.5mm from the midline, 5mm rostrally and caudally from the lesion site. Two injections of 2 μ L which contained 25.000 cells/ μ L of bOECs or 50.000 cells/ μ L of MSCs, was delivered. Each injectate was carefully delivered within 1 min. After surgery, the muscles of the back then the skin were sutured and mice underwent daily check, any of them showed neither skin lesions, infection nor autophagy throughout the study.

BDA injection

For axonal growth analysis, mice received injection of 2 μ L biotinylated dextran amine (BDA, 0.2 g/ml, Thermo Fisher Scientific, D1956, Waltham, MA) diluted in PBS at cervical level two days before to be euthanized. BDA was injected using a 1 mm sterile glass capillary needle which was attached to the micromanipulator arm fixed on stereotaxic frame (World Precision Instrument). Injections were delivered at 1 mm depth, 1.5 mm from the midline. Injectate was carefully delivered within 1 min. After injection, the muscles and the skin were sutured.

BOECs survival

The survival of LUX^{+/-} bOECs was analyzed by bioluminescence with an *in vivo* XTREM 4XP spectrum cooled charge-coupled device optical macroscopic imaging system (Brucker). With intraperitoneal injections of D-Luciferin (0.3 mg/g body weight, XenoLight™,

Perkin Elmer), LUX^{+/-} bOECs was monitored for three weeks and measurement of the photon counts was performed as previously described using Bruker molecular imaging software (Takano et al., 2017).

In addition to the bioluminescence experiments, bOECs survival was explored with bOECs extracted from Rosa26-tdTomato mice. After transplantation in WT mice, intensity of bOECs Rosa26-tdTomato were analyzed by immunohistochemistry (described below).

Tissue preparation and sectioning

Thirty minutes before euthanasia, mice received analgesic to reduce pain (Buprenorphine 0.17 mg/kg). Then, mice were deeply anesthetized with 5% isoflurane and intraperitoneal Euthoxin injection was performed (100 mg/kg). Transcardial injections with cold PBS followed ice-cold 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma Aldrich, 252549) in PBS were carry out. Dissected spinal cord and brain were further post-fixed in 4% PFA overnight and cryoprotected in 30% sucrose (Life Technologies, Carlsbad, CA) for at least 48 hr. After embedding in Tissue-Tek OCT compound (Sakura, Tokyo, Japan), the spinal cords were cut sagittally to 20 μ m thickness and brain were cut sagittally to 30 μ m thickness. Sections were collected on slides and stored at -20°C until further use.

Immunohistochemistry

Identification of different cells and structure were performed in spinal cord and brain with primary antibodies diluted in PBS-blocking solution containing 10% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch, Cambridge, UK) and 0.3% Triton-X100 (Sigma-Aldrich) in order to block non-specific fixation. Antibodies incubation was performed overnight at room temperature in humidified chamber. The following primary antibodies were used: Rabbit anti-platelet-derived growth factor β (PDGFR β , Abcam, ab32570, RRID:AB_777165), mouse anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP Cy3-conjugated Sigma-Aldrich, C9205, RRID:AB_476889), rabbit anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1, Wako, 019-

19741, Osaka, Japan, RRID:AB_839504), rat anti-myelin basic protein (MBP, Millipore, MAB386, RRID:AB_94975), mouse anti-RNA binding Fox-1 homolog 3 (NeuN, Sigma, HPA030790, RRID:AB_10602305), rabbit anti-laminin (Abcam, ab11575, RRID:AB_298179), goat anti-mMMR (CD206, R&D systems, AF2535, RRID:AB_2063012), rat anti-B-lymphocyte activation antigen B7-2 (CD86, Invitrogen, MA1-10299, RRID:AB_11152324) goat anti-doublecortin (DCX, Santa Cruz, SC-8066, RRID:AB_2088494), guinea pig anti-vesicular glutamate transporter 1 (vGlut1, Millipore, AB5905, RRID:AB_2301751) and lectin from wisteria floribunda agglutinin biotin-conjugated (WFA, Sigma, L1516, RRID:AB_2620171).

After washing, antibody staining was revealed using species-specific fluorescence-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) and BDA staining was visualized with Cy3-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch) Sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI; 1 µg/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 and the Leica THUNDER Imager Tissue 3D microscope setup. For spinal cord analysis, epicenter of the lesion images was taken using 10x microscope objective. For brain analysis, hippocampus and bulb images were taken using 20x microscope objective. The image processing and assembly was acquired with ImageJ software.

Quantification of immunohistochemically stained areas

Spinal cord

Three to five sections per animal were observed to determine the epicenter of the lesion. Then, an image of the epicenter was taken and analyzed. On these sagittal sections, the GFAP-

(negative), PDGFr β + (positive), MBP- and laminin+ areas were measured. The NeuN+, WFA+, Iba1+, CD86+, CD206+ cells and BDA+/vGlut1+ axons were counted after standardization of area considered, with rectangle of 1000 μ m x 1000 μ m.

Brain

The depth and the number of the brain sections analyzed have been defined according to the depth and thickness of the granular cell layer in OB. On the OB sagittal section, the Iba1+/Cd86+ cells were counted after standardization with rectangle of 500 μ m x 500 μ m. On the hippocampal section, the Iba1+, DCX+, WFA+ and NeuN+ cells were counted after standardization with different rectangle for each hippocampal part. In dentate gyrus (DG) and cornu Ammonis (CA) 1, cells were counted in rectangle of 500 μ m x 250 μ m and in CA2 and CA3, cells were counted in rectangle of 250 μ m x 250 μ m.

Primary OB conditioned-medium preparation

OB primary cultures obtained from non-injured and injured mice have been performed as described above. One month after plating, cultures were washed twice with PBS. Then, the medium was changed and 4 days later the conditioned medium (CM) was obtained. The CM was placed in Amicon Ultra-15 3K ultrafiltration tubes (Millipore) and centrifuged at room temperature for 1h at 5000g in order to concentrate it. From an initial volume of 6 mL, ultrafiltration allowed to obtain approximately 1 mL of concentrated CM. CM was placed directly at -80°C for conservation.

BV2 Cell line cultures

BV2 cell line has been obtained from ATCC (EOC CRL-2467TM). The cells were first thawed gently in a water bath at 24°C. The cells were then cultured in T25 flasks containing DMEM high glucose (GIBCO), 20% FBS, 0.5% penicillin/streptomycin for the first 48 hours. After this initial culture, a first passage was performed. To pass the cells, the medium was removed and the cells were washed twice with PBS. The flasks were placed in the incubator for

10 minutes after the addition of 5mL of trypsin EDTA. To inhibit trypsin, culture medium containing FBS was added. Then, centrifugation at 500g for 5 minutes was performed, the cells were resuspended in 1mL of culture medium. The culture medium was then composed of DMEM glutaMAX high glucose (GIBCO), 10% FBS and 0.5% penicillin/streptomycin. One week after plating, cultures were passed and then replated and divided into three experimental groups: 1 - BV2 control, 2 - BV2 + bOECs H CM and 3 - BV2 + bOECs I CM. The cells from these 3 groups were cultured for 2 days. Then, the cultures were trypsinized and placed directly at -80°C for conservation for RT-qPCR analyses.

Locotronic test: Foot misplacement apparatus

Experiments have been performed as described previously by Chort et al. (Intellibio, Nancy, France) (Chort et al., 2013). The equipment consists of a flat ladder on which the animal can move from the starting zone toward 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 mice were pre-trained on the ladder, three-time 1 week prior to injury. Experiments were performed three-times 14, 28 and 56 days after SCI for bOECs transplanted groups and 56 days after SCI for MSCs transplanted ones.

Hargreaves

A Hargreaves plantar test (ugo basile®) was performed as described previously by (Robac ref Zhang et al 18). Briefly, after isolation during 5 min, a radiative heat source was applied at the plantar surface of the hindpaw. The time between the onset of the thermal radiation stimulus and the appearance of paw withdrawal was measured by computer. The time

of paw withdrawal was defined as hindpaw withdrawal latency. Experiments were performed 14, 28 and 56 days after SCI for bOECs transplanted groups and 56 days after SCI for MSCs transplanted ones.

CatWalk XT automated gait analysis

Motor coordination was performed and analyzed using the CatwalkXT automated system (Noldus; RRID:SCR_004074) (Ritzel *et al.*, 2020). In dark room, mice were placed on the walkway and allowed to traverse from one end to the other. The floor of the walkway was composed of glass surface transforming the footprint mice into light reflection in the form of illuminated footprints. The light reflection was recorded by a camera positioned under the walkway, converting footprint in image into digital signature and processed using CatWalk XT 9.1 software with a minimum threshold set at 80 (a.u. ranging from 0 to 225). Following footprint identification and labeling, data pertaining to static and dynamic gait parameters from 3 consecutive trials were generated. The mean data of this parameter was analyzed and compared between experimental groups. If mice stopped partway across or turned around during run, acquisition was stopped, and the run was started again to obtain 3 good crossings from one end to the other. Experiments were performed at 58 days after SCI.

Y-maze test

To test the spatial working memory in mice, Y-Maze (§§§§) was performed 36 and 64 days after SCI, as previously described (Ritzel *et al.*, 2020). The Y-Maze was composed by three identical arms arranged in Y shape (A, B, C). “A” arm was randomly defined as “start” arm, and the mouse was placed in the maze freely for 5 min. A camera was placed above the maze to observe the arm entries and an alternation was designated when the mouse entered three different arms consecutively. The percentage of alternation was calculated as follows: $\text{total alternations} \times 100 / (\text{total arm entries} - 2)$. If a mouse scored significantly $>50\%$ alternations

(the chance level for choosing the unfamiliar arm), this was indicative of spatial working memory.

Novel object recognition (NOR)

To assess non-spatial hippocampal-mediated memory, NOR was performed. The main aim of this test is to determine the capacity of mouse to identify a new object. Briefly, the day before test, at the beginning and the end of the day, mice were twice individually placed in a free moving open field of 35x35 cm for 5 min for habituation. Next day, mice were placed in an open field where two identical objects for 10 min (sample phase). After 2 h, object recognition was tested by substituting a novel object for a familiar training object (different color, shape, size, and texture). Mice were individually placed in the same open field for 10 min and the time spent with the familiar and novel object was measured by a camera located above the open field. Because mice inherently prefer to explore novel objects, a preference for the novel object indicates intact memory for the familiar object. Experiments were performed 32 and 60 days after SCI for bOECs transplanted groups and 56 days after SCI for MSCs transplanted ones.

Sucrose preference test

Some affective diseases, such as depression, are associated with anhedonia symptom. Sucrose preference test has allowed to evaluate the mouse's interest in seeking a sweet rewarding drink relative to plain water. Failure to demonstrate a bias toward the sweetened drink indicates depression-like behavior. On 29-31 and 57-59 days after SCI, sucrose preference test was performed. During 6 days before the test, mice were individually placed in cages with food ad libitum and two bottles of water (one with plain water and one with sweetened water addition of sucrose at 2g/L) for habituation. Every day, plain water bottle and saccharose water bottle were interchanged. During the test days, the bottles have not been interchanged and precision scales connected to computer were placed under the bottles. The weight of bottles and

therefore the water consumption was measured each 30 min during 48 h. The sucrose preference was calculated by divided consumption of sweetened water by total consumption of water (sweetened water plus plain water).

Tail suspension test

The tail-suspension test assesses depression-like behavior in mice and is based on the observation that mice develop an immobile posture when placed in an inescapable hemodynamic stress of being hung by their tail. Mice were suspended by the tail at a height of 30 cm using adhesive tape. The duration of immobility was recorded during 6 min test period. The immobility was defined by passive hanging and complete motionlessness. Experiment was performed at 35 and 63 days after SCI.

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm standard deviation (SD). All statistical analyses were conducted by using GraphPad Prism Program, version for windows (GraphPad Software; 8.0.1.244).

In figure comparing two groups, comparison of mean was performed using two-way Mann-Whitney test. In figure comparing three groups, comparison of medians was performed using two-way Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. Statistical analysis in each assay was detailed in figure legends. A p value of < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

SCI alters gene expression in olfactory bulbs tissue and in primary bOECs cultures

To investigate the effects of the lesion (SCI) on distant tissues which could be used for autograft transplant, we have assessed the effects induced by SCI, 7 days after the lesion, on OB tissue and primary OB cultures (bOECs) by immunohistological, RT-qPCR and flow cytometry experiments (Figure 2).

OB tissue RT-qPCR results show that SCI modulates gene expression linked to microglia/macrophages reactivity such as *arg1*, *cxc4*, *ifngr2* or *tnfrs1a*. It also alters genes expression linked to neuronal plasticity (e.g., *bdnf*, *cx3cl1* and *cx3cr1*) (Figure 2B).

To complete these gene expression experiments, a chronology of microglial cell reactivity in the OB has been performed using immunohistology (Figure 2C-E). To do so, quantifications of the total number of Iba1+ cells (Figure 2C) and CD86+ cells (Figure 2D) and the percentage of CD86+/Iba1+ cells (Figure 2E) have been assessed without SCI and at 3, 12, 24, 48 hours and 7 days after injury. Our results demonstrate that the total number of Iba1+ cells do not change overtime after SCI in comparison to non-injured condition (Figure 2C). At the opposite, the total number of CD86+ cells is enhanced at 2 and 7 days after SCI in comparison to non-injured animals (Figure 2D). Finally, our analyses reveal that the percentage of CD86+/Iba1+ cells is increased at 3h after SCI and decreased to the control (without SCI) level at 12h after SCI and is increased a second time 7 days after SCI in comparison to non-injured and to 12h after SCI conditions (Figure 2E).

OB tissue could not be used directly for cell transplantation. Indeed, primary OB or OECs culture transplantations have been intensively studied and have reported promising results. That is why, impact of SCI has been investigated on primary OB cultures (Figure 2F and G). First at all, composition of the primary OB cultures has been measured using flowcytometry. These analyses show that SCI modifies the ratio between OECs (p75 positive cells) and fibroblasts

(PDGFr β positive cells) when the cells are plated 14 days after SCI but not at 7 days after SCI (Figure 2F). Then, RT-qPCR experiments have been performed on OB cultures 7 days after SCI and compared to OB cultures obtained from non-injured animals (Figure 2G). The results demonstrate that SCI modulates the expression of genes implicated in extra cellular matrix (ECM) production and axonal plasticity processes such as *sema3f*, *neo1*, *ntn1* or *lgals1*. It also changes the expression of growth factor genes (e.g., *bdnf* or *vegfb*) and in particular genes involved in scar forming molecules as *ctgf*, *fgf1* or *tgfb2* or 3 (Figure 2G).

Initial injury alters bOECs neuroregenerative properties

To evaluate if the changes expressed at RNA level in bOECs primary cultures impact the neuroregenerative abilities of these cells after transplantation in SCI context, we have first evaluated functional recovery. To do so, locotronic analyses have been performed on injured mice (SCI without treatment – SCI group), transplanted mice (SCI with bOECs transplantation and OB obtained from non-injured animals – bOECs H group) and autografted mice (SCI with bOECs transplantation and OB obtained from injured animals – bOECs I group), 14, 28 and 56 days after SCI (Figure 3A-I). Additionally, fine motor movements have been investigated using catwalk 58 days after SCI (Figure 3J and K). As previously described, locotronic experiments reveal that bOECs transplantation (bOECs H group) decreases foot misplacements 14, 28 and 56 days after SCI (Figure 3A-I) (Delarue *et al.*, 2021). Indeed, the number of back leg errors (Figure 3A-C), the total error time (Figure 3D-F) and the time needed for crossing the corridor (Figure 3G-I) are decreased in this group in comparison to the SCI control group. Our analyses show also that when bOECs are obtained from injured mice (bOECs I) their transplantation fails to enhance the number of back legs errors (Figure 3A-C) 14, 28 and 56 days after SCI and enhance very weakly the other parameters. Indeed, at the exception to the total error time 14 days after SCI (Figure 3D) and the time needed for crossing the corridor 28 days after SCI (Figure 3H), locotronic analyses show that bOECs I group is comparable to SCI control one.

To confirm these results, catwalk experiments have been performed 58 days after SCI. The results obtained show that base of support (Figure 3J) is increased in bOECs I in comparison to bOECs H mice, we demonstrate also that stride length tends to be reduced in bOECs I group (Figure 3K).

Locotronic and catwalk analyses demonstrate that enhancement of both static and dynamic parameters are lost in bOECs I mice in comparison to bOECs H group. To correlate the results obtained regarding functional recovery, immunohistological analyses have been performed 14, 28 and 56 days after SCI (Figure 4). Spinal scar and demyelination have been assessed based on the quantification of the fibrotic and the glial scars and on quantification of demyelinated areas. As previously described, bOECs H transplantation modulates the lesion scar by decreasing the fibrotic scar (PDGFr β + area) and demyelination (MBP- area) after SCI and by increasing the glial scar (GFAP- area) 14 and 56 days after SCI, with the same tendency without statistical difference 28 days after SCI (Figure 4A-D, I-L and E-H respectively) (Delarue *et al.*, 2021). More interestingly, immunohistological results show that bOECs I transplantation does not modulate the fibrotic and the glial scars 14, 28 and 56 days after SCI (Figure 4B-D, F-H and J-L respectively). Demyelination process analysis highlights that bOECs I transplantation decreases the MBP negative area only at 56 days after SCI but fails to do so at 14 and 28 days after SCI (Figure 4L, D and H respectively).

Altogether, our results demonstrate that the initial traumatism induced before primary culture alters the ability of bOECs to enhance functional recovery and tissue repair after SCI and transplantation.

Initial injury does not modulate bOECs survival after transplantation

To demonstrate if initial injury modulates bOECs survival after transplantation, bioluminescence and Td-Tomato positive bOECs transplantation experiments have been performed up to 28 days after SCI (Figure S1). Bioluminescence experiments show that in both

transplanted groups (bOECs H and bOECs I) any surviving cells could be observed 21 days after SCI (Figure S1A and B). These experiments demonstrate also that there is no difference between the two groups 7 and 14 days after SCI (Figure S1A and B). To confirm these results, Td-Tomato positive OECs transplantations have been realized and 14, 21 and 28 days after SCI immunohistological analyses have been performed (Figure S1C and D). Td-Tomato positive intensity measurements show that there is no difference between the two groups 14, 21 and 28 days after SCI (Figure S1C and D).

Initial injury alters ECM modulation properties and synaptic formation induces by bOECs transplantation

It has been previously described that cellular transplantation including OECs transplantation can induce allodynia after SCI (Nakhjavan-Shahraki *et al.*, 2018). To investigate it, Hargreaves plantar test has been performed 14, 28 and 56 days after SCI (Figure 5A). Additionally, hindpaw pression of the hindlimbs has been assessed using Catwalk system 58 days after SCI (Figure 5B, C). As previously described, bOECs H transplantation decreases hindpaw withdrawal time 14 and 56 days after SCI in comparison to injured (SCI) mice (Figure 5A). These analyses reveal also that bOECs I transplanted animals presented a hindpaw withdrawal time comparable to SCI group, this time was also increased in comparison to the bOECs H group 14 and 56 days after SCI (Figure 5A). To confirm these results, hindpaw pression of the hindlimbs was measured 58 days after SCI. The measurements show that max hindpaw and mean hindpaw pressions were decreased in bOECs H mice in comparison to bOECs I ones (Figure 5B, C), which can indicate a pain-related behavior during locomotion in bOECs H mice.

Previous studies have shown that pain-related behavior can be linked to axonal regrowth and formation of new synapses (M'Dahoma *et al.*, 2014). To investigate these two parameters, BDA anterograde tract tracing experiments (Figure 5D-G) and colocalization analysis of BDA and VGlut1 staining (Figure 5 H-I) have been performed. As previously described, measurement of

the number of BDA positive axons presents into the lesion core demonstrate that bOECs transplantation induces a moderate axonal regrowth after SCI in comparison to control group (Figure 5E-G). Indeed, our results show that bOECs I animals present an increase in the number of BDA+ fibers into the lesion core 14 days after SCI whereas bOECs H induces it 28 days after SCI (Figure 5E and F). Fifty-eight days after SCI, these analyses do not show any difference between groups (Figure 5G).

Additionally, colocalization analysis of BDA and VGlut1 staining has been performed 14, 28 and 56 days after SCI (Figure 5I). This analysis reveals that bOECs H transplantation increases synaptogenesis at the rostral part of the spinal cord and at the lesion core 28 days after SCI in comparison to control group and to control and bOECs I groups respectively (Figure 5I). Fifty-six days after SCI, bOECs H transplantation enhances also synaptogenesis at the rostral part of the spinal cord and at the lesion core in comparison to control and bOECs I groups and to control group respectively (Figure 5I). At the opposite bOECs I transplantation did not show an enhancement of synaptogenesis, except 14 days after SCI where bOECs I transplantation increases it at the caudal part of the spinal cord in comparison to control group (Figure 5I).

Composition of ECM plays a crucial role in axonal regrowth or axonal inhibitory processes as well as synaptogenesis. We have previously showed that OB transplantation can modulate these parameters that is why, the presence of laminin into ECM composition has been investigated (Figure 5J-L). Laminin intensity measurement shows that 14 days after SCI, this parameter is increased in bOECs I group in comparison to control (Figure 5J). Our results reveal also that laminin intensity is increased in both transplanted groups (bOECs H and bOECs I) in comparison to control 28 days after SCI (Figure 5J). Since the size of laminin area is linked to the size of lesion core (PDGF β + area), we have measured the proportion of laminin+ area into PDGF β + area (Figure 5K). It appears, that the relative size of laminin+ area is increased in both transplanted groups in comparison to control 14 days after SCI and only in bOECs H group in

comparison to control and bOECs I groups 28 and 56 days after SCI (Figure 5K and L) tending to demonstrate that bOECs H transplantation induces a more supportive microenvironment for axonal regrowth.

Altogether, our results show that bOECs H transplantation modifies lesion scar ECM which increases axonal regrowth and synaptogenesis and that bOECs I transplantation plays a modest role on these parameters.

Transplantation of bOECs transplantation from injured animals fails to enhance neuronal survival

Neuronal survival has been assessed in the three groups 14, 28 and 56 days after SCI (Figure 6A-F). To do so, NeuN+ cells have been counted at rostral and caudal parts and at the lesion core of the spinal cord. As already described in the literature bOECs H transplantation increases neuronal survival (Khankan *et al.*, 2016). Indeed, our results demonstrate that 14 days after SCI, neuronal survival is increased in bOECs H animals in rostral part of the spinal cord in comparison to control group (Figure 6D). Twenty eight days after SCI, bOECs H transplantation increases the number of Neun+ cells both at rostral and caudal part of the spinal cord in comparison to control animals (Figure 6E). Finally, 56 days after SCI, the results show that is no difference between the groups (Figure 6F). These analyses allow to demonstrate that bOECs I transplantation fails to improve neuronal survival.

Then, we measured the number of NeuN+/WFA+ cells at rostral and caudal parts and at the lesion core of the spinal cord 14, 28 and 56 days after SCI. These analyses reveal that 14 days after SCI, the number of NeuN+/WFA+ cells is enhanced in bOECs H group at the lesion core in comparison to control one (Figure 6G) with no difference between groups 28 days after SCI (Figure 6H). Interestingly, 56 days after SCI, our results demonstrate that the number of NeuN+/WFA+ cells is increased in bOECs H group in comparison to control at the lesion core

whereas, the number of NeuN+/WFA+ cells is enhanced at the rostral and caudal parts of the spinal cord in bOECs I animals in comparison to control ones (Figure 6I).

Additionally, to the quantification of the number of NeuN+/WFA+ cells, the assessment of the WFA intensity has been also performed 14, 28 and 56 days after SCI at rostral and caudal parts and at the lesion core of the spinal cord (Figure 6 J-L). Fourteen days after SCI, bOECs transplantation enhances WFA intensity quantifications at rostral and caudal parts and also at the lesion core with a tendency for bOECs I group in comparison to control and with significant differences for bOECs H group (Figure 6J). At 28 days after SCI, WFA intensity quantification reveals that bOECs H transplantation increases this parameter at the lesion core in comparison to control group without difference between groups 56 days after SCI (Figure 6 K and L respectively). BOECs I transplantation does not show any difference with control group at these time points (Figure 6 K and L).

BOECs transplantation modules inflammatory microenvironment after SCI without major effects played by the initial injury on these properties

The immunomodulatory role plays by OECs after transplantation has been highlighted recently in several studies (Jiang, Guo, *et al.*, 2022). That is why we have investigated here the immunomodulatory properties of the transplantation of bOECs H and bOECs I at 14, 28 and 56 days after SCI (Figure 7). At first, the number of Iba1+ cells present at rostral and caudal parts of the spinal cord and at the lesion core has been measured. This analysis shows that there is no difference between groups (Figure 7A).

Macrophages and microglial cells can express anti or pro inflammatory profiles with the respective expression of CD206 and CD86 markers. The ratio of CD86+/Iba1+ and CD206+/Iba1+ cells have been assessed 14, 28 and 56 days after SCI at rostral and caudal parts of the spinal cord and at the lesion core (Figure 7B-I). Fourteen days after SCI, bOECs H transplantation decreases the ratio CD86+/Iba1+ cells at the rostral part of the spinal cord and

increases the ratio of CD206+/Iba1+ cells at the rostral and the caudal parts of the spinal cord in comparison to untreated (SCI) animals (Figure 7D and E). BOECs I transplantation tends to change the profile of microglia/macrophages in the same way at this time point without significant difference in comparison to control group (Figure 7D and E). Twenty-eight days after SCI, both bOECs transplanted groups modulate the microglia/macrophages profile (Figure 7F and G). Indeed, the ratio of CD86+/Iba1+ cells is reduced at the lesion core and at the caudal part of the spinal cord in both transplanted groups in comparison to the control animals and is also decreased at the rostral part of the spinal cord in bOECs H group (Figure 7F). The analysis shows too that the ratio of CD206+/Iba1+ cells is increased in both transplanted groups at the rostral and the caudal parts of the spinal cord in comparison to SCI group with a significant difference only between bOECs H and SCI groups (Figure 7G). Interestingly, 56 days after SCI, bOECs I transplantation increases the ratio of CD86+/Iba1+ cells at rostral, caudal part and at the lesion core of the spinal cord in comparison to bOECs H animals (Figure 7H). Moreover, the ratio of CD86+/Iba1+ cells is also increased at the lesion core between bOECs I and control groups. The analysis of the ratio of CD206+/Iba1+ does not show any difference between groups (Figure 7I).

To complete the analysis of the properties of OECs on modulation of inflammation, we have performed RT-qPCR analyses on BV2 cell cultures (microglial cell line) exposed to conditioned media obtained from bOECs H (BV2 + bOECs H) and bOECs I (BV2 + bOECs I) cultures (Figure 7J). The results obtained show that chemoattractant (*ccl5*) or inflammation activator genes (e.g., *csf1* or *cx3cr1*) are upregulated in BV2 + bOECs I in comparison to BV2 + bOECs H (Figure 7K). It appears also that pro-inflammatory genes are upregulated (e.g., *il1b*, *cxcr4*, *ifngr2*) in BV2 + bOECs I in comparison to BV2 + bOECs H and anti-inflammatory genes are downregulated (*il10ra*). The comparison between BV2 and BV2 + bOECs H show that activated stage (*p2ry12* and *p2rx4*) and pro-inflammatory (*ccl5* and *cx3cr1*) genes are downregulated and

pro-remyelinating (*ccr5*) gene are upregulated in BV2+ bOECs H (Figure 7L). Whereas pro-inflammatory genes (e.g., *ccl4* or *cxcr4*) are upregulated in BV2 + bOECs I in comparison to BV2 (Figure 7M).

Altogether, our results demonstrate that initial injury modulates bOECs I CM which in turn alter genes expression of BV2 cell lines *in vitro*. Interestingly, these effects found *in vitro* do not strongly modify the *in vivo* properties of bOECs after transplantation in SCI context.

BOECs transplantation enhances hippocampal neurogenesis and improves cognitive behavior after SCI

Recently, it has been described that SCI induces inflammation into the brain and leads to cognitive decline (Li *et al.*, 2020). We have demonstrated that bOECs (bOECs H group) can regulate the inflammatory process into the spinal cord parenchyma after transplantation (Figures 7). Based on these results, we have investigated the effects of bOECs transplantation after SCI on cognitive behavior, hippocampal neurogenesis and brain inflammation. To do so, NOR experiments have been performed 32 and 60 days after SCI (Figure 8A). As previously described, NOR results show that SCI induces a strong cognitive decline objectified by the decrease of frequency and duration of orientation of the head towards the new object in SCI in comparison to the control non injured group (dashed lines) 32 and 60 days after SCI (Figure 8B-E). Our results demonstrate also that bOECs H transplantation improves cognitive decline in comparison to SCI group (Figure 8B-E). Indeed, 60 days after SCI, frequency and duration of orientation of the head towards the new object are significantly enhanced in bOECs H group (Figures 8D and E). These effects are not found in bOECs I group (Figure 8D-E).

To correlate these behavioral results with neurogenesis, the number of DCX+ and NeuN+ cells have been measured respectively 14 and 64 days after SCI (Figure 8F-I). These analyses reveal that primary OB transplantation (bOECs H) increases the number of DCX+ cells 14 days after SCI into the hippocampus (Figure 8 F and G). It appears also, that primary OB (bOECs H)

transplantation increases the number of NeuN+ cells into the DG 64 days after SCI without any effect on the other regions of the hippocampus (Figure 8H and I). Then, the percentage of NeuN+/WFA+ cells has been also assessed 64 days after SCI and show no difference between groups (Figure 8H and J).

To correlate cognitive functions and hippocampal neurogenesis with inflammatory processes microglia/macrophages reactivity has been assessed into the hippocampus (DG, CA1, CA2 and CA3), 14, 28 and 64 days after SCI (Figure 8 K-N). It appears that the number of Iba1+ cells is decreased in bOECs (bOECs H) transplanted animals at 14 and 28 days after SCI in comparison to control group without difference at 56 days after SCI (Figure L, M and N respectively). The results show also that bOECs transplantation increased then total number of Iba1+ cells 28 days after SCI into CA3 and decreases it 56 days after SCI (Figure 8 M and N respectively).

To assess other cognitive functions such as anhedonia, spatial working memory, and depression-like behavior; sucrose preference, Y-maze, and tail suspension tests have been performed after SCI and/or transplantation (Figure S2). These experiments demonstrate that there is no difference between SCI, bOECs H and bOECs I groups for these 3 tests (Figure S2). Altogether, our results demonstrate that bOECs transplantation can increase neurogenesis into the hippocampus and restore non-spatial hippocampal-mediated memory decline induced by the lesion after SCI.

Initial injury alters also the therapeutic potential of transplanted non-neural cells.

In order to study the effects of injury on a distant non-neuronal tissue, we have investigated the effects of SCI on mesenchymal stem cells (MSCs) obtained from fat tissue in using RT-qPCR and flow cytometry (Figure S3A). RT-qPCR analyses of fat tissue show that SCI does not modulate strongly genes expression of growth factors, immunodulatory molecules or inflammatory molecules (Figure S3B). Flow cytometry analyses have been also performed to investigate the impact of SCI on MSCs markers expression. It appears that initial injury does

not change the expression of CD105, CD31 and CD34 markers (Figure S3C). Finally, to complete these analyses, RT-qPCR have been performed on MSCs cultures obtained from fat tissue with or without SCI. Our results demonstrate that SCI modulates gene expression profile of MSCs in culture (Figure S3D and E). Indeed, several ECM genes are deregulated in MSCs I in comparison to MSCs H cultures (e.g., *cola1*, *cpg5*, *cspg4*, *mmp9*, *timp1* and *2*) (Figure S3E). Additionally, expression of growth factor genes (e.g., *bdnf*, *gdnf*, *tgfb2* and *3*) and genes related to axonal plasticity process (e.g., *rgma*, *sema3a*) are deregulated between MSCs I and MSCs H cultures (Figure S3E).

To evaluate if the changes expressed at RNA level in MSCs cultures impact the neuroregenerative abilities of these cells after transplantation in SCI context, we have first evaluated functional recovery using locomotor experiments 56 days after SCI. Surprisingly, our results show that MSCs transplantation from both injured and non-injured animals do not exert effect on functional recovery 56 days after SCI (Figure S4A-C). To complete the investigation of the effects of MSCs transplantation, we have analyzed the different components (GFAP-, PDGF β ⁺ and MBP⁺ areas) of the lesion scar 56 days after SCI. It appears also that MSCs transplantation do not modulate the different populations which compose the scar at this time point (Figure S4D-F).

Then, sensitive functions, as well as axonal regrowth, synaptogenesis and ECM structure have been investigated using Hargreaves plantar test, BDA tract tracing experiments, BDA and VGlut2 costaining and laminin quantification analyses. As described for bOECs transplantation, MSCs transplantation from both groups decreases hindpaw withdrawal latency (Figure S4J). Interestingly, the results show also that MSCs transplantation enhances axonal regrowth in both groups with a significant difference between MSCs H and control groups and a tendency between MSCs I and control groups (Figure S4K). The analysis of synaptogenesis does not show any difference between groups 56 days after SCI (Figure S4L).

Laminin quantification analyses show that laminin intensity is increased in both transplanted groups whereas, the ratio between laminin+/PDGFr β + areas is increased only between MSCs H and control group without difference between MSCs I and control groups (Figure S4 M and N respectively). Finally, the number of Iba1+ cells and the percentage of CD86+/Iba1+ and CD206+/Iba1+ cells have been measured 56 days after SCI at rostral and caudal parts and at the lesion core of the spinal cord. These results show that MSCs H transplantation decreases the number of Iba1+ cells at the caudal part of the spinal cord and increases the percentage of CD206+/Iba1+ cells at the lesion core, without any effect on the percentage of CD86+/Iba1+ cells (Figure S4O-Q). At the opposite transplantation of MSCs I does not show difference with control group (Figure S4O-Q).

MSCs transplantation enhances hippocampal neurogenesis and improves cognitive behavior after SCI

The results obtained on hippocampal neurogenesis and cognitive behaviors after transplantation of bOECs, encourage us to evaluate the effects of MSCs transplantation on these parameters.

As described above, SCI alters cognitive behaviors (Figure 9A and B). Indeed, NOR experiments performed 56 days after SCI show that frequency and duration of orientation of the head towards the new object are decreased in this group in comparison to non-injured animals (dashed lines) (Figure 9A and B). More interestingly, our results demonstrate that these two parameters are improved after MSCs H transplantation in comparison to SCI group (Figure 9A and B) without enhancement after MSCs I transplantation.

On the same animals, neurogenesis has been indirectly assessed by counting the number of Neun+ cells into four distinct areas of the hippocampus (DG, CA3, CA2 and CA1) and compared between SCI and MSCs H groups 64 days after SCI. It appears that MSCs H transplantation enhances the number of Neun+ cells into DG, CA3 and CA2 hippocampal areas (Figure 9C and D). Then, the ratio of WFA+/Neun+ cells as well as the intensity of the WFA

staining have been measured. These analyses show that MSCs H transplantation enhances the ratio of WFA+/Neun+ cells into the CA3 and CA1 areas without effect on the intensity of WFA staining (Figure 9E and F respectively). Finally, measurement of the number of Iba1+ cells has been performed 64 days after SCI. The results show that MSCs H transplantation modulates inflammation in decreasing the number of Iba1+ cells into CA3 and CA2 areas and increasing it into CA1 area (Figure 9G).

DISCUSSION

Spinal cord injury and regeneration by bOECs transplantation

The main purpose of our study was to investigate the consequences of SCI on brain and peripheral tissues. In particular, on the impairment of the therapeutic capacities of cells which could be used in an autograft context. The cellular responses and tissue remodeling that occur after SCI are well described in spinal tissue but only few studies have investigated the cellular responses induced by the trauma in the whole body. SCI is characterized by neuronal, glial, microglial and peripheral immune cells activation. Immune cells induce the formation of an inflammatory reactive environment causing cell death which in turn is responsible of the diffusion of the neurological deficits and the functional losses but which also leads to the formation of the spinal scar and triggers regenerative mechanisms (Tran *et al.*, 2018). Axonal regrowth and restoration of functional network are challenged by the limited plasticity of the spinal cord due to a dense fibrotic scar and a environment rich in cytokines, myelin fragments, CSPGs, DAMPs and other inhibitory molecules (Barnabé-Heider *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2016). At the opposite, axonal regrowth and synaptic reestablishment need the presence and the secretion of anti-inflammatory cytokines, growth factors and permissive molecules supplied at least in part by ependymal cells (Gensel & Zhang, 2015; Anderson *et al.*, 2018). Neuronal survival and neuronal connection are also modulated by the PNN. Indeed, at early stage (14 days after SCI), this structure, surrounding the soma of neurons and their dendritic processes, provides protection against inflammation and apoptosis-induced molecules. Then, at later stage (56 days after SCI), it is gradually degraded, mediated by microglial cells, to allow new synaptic connections (Irvine & Kwok, 2018; Grycz *et al.*, 2022).

Inflammatory response does not occur only in the spinal cord. The days following injury, cytokines and chemokines are detectable in rodent and human serums (Anthony & Couch, 2014), and the consequences associated to the activation of peripheral immune cells are present in other organs such as spleen (Noble *et al.*, 2018), kidneys, lungs (Gris *et al.*, 2008), liver

(Anthony & Couch, 2014), adipose tissues (Farkas *et al.*, 2018) and brain (Felix *et al.*, 2012). Thus, SCI is associated with brain inflammation and cognitive deficits, particularly in the olfactory bulbs, cortex, thalamus and hippocampus. Activation of microglial cells in hippocampus is related to reduction of neurogenesis and neuronal density in DG and CA1 which are correlated with a decrease in cognitive performance as memory disorder (Wu *et al.*, 2014). Recent studies report that inflammation spreading is due to the presence of cytokines and immune cells into CSF after SCI (Capirossi *et al.*, 2020).

Therefore, we asked whether SCI could impair the known effects of cell therapy: bOECs transplantation. BOECs transplantation effects are well described in several species such as dogs, cats, rodents and non-human primates after SCI as well as in Humans. After SCI, bOECs transplantation enhances functional recovery by modulation of the spinal scar composition, both from a cellular and molecular point of view. The analyses of molecules secreted by bOECs show their abilities to produce *in vitro* and *in vivo*, growth factors, MEC modulating molecules and axonal regrowth facilitating molecules. When transplanted after SCI, bOECs participate to neuroprotection, limiting secondary injury and improving the preservation of axonal networks spared by primary damage. BOECs also improve axonal regeneration by enhancing the recruitment of ependymal cells to the lesion core and their differentiation into astrocytes which participate to the formation of an axonal growth permissive glial scar by reducing axonal regrowth inhibitory fibrotic scar. Moreover, *in vitro* analyses show that bOECs increase the differentiation of ependymal cells-derived neurospheres into neurons (own unpublished data). Through metalloproteinase secretion, bOECs degrade the axonal inhibitory MEC, particularly CSPG which are present into the spinal scar and stimulate production of axonal regrowth permissive molecules (Honoré *et al.*, 2012; Delarue *et al.*, 2021). They also modulate microglial/macrophages activation by direct communication, through the release of cytokines and chemokines and by indirect effects in sparing spinal cord tissue. They contribute to reduce

microglial/macrophages activation, allowing permissive tissue for the neuronal network regeneration (Zhang *et al.*, 2021). Altogether, combined effects of bOECs transplantation lead to improve spinal cord plasticity allowing axonal regrowth, myelination and stabilization of neuronal networks favoring functional recovery (Radtke *et al.*, 2004).

However, it was also reported that cellular transplantation can induce pain related behavior as allodynia (Nakhjavan-Shahraki *et al.*, 2018). It can be explained by the release of growth factors stimulating neuronal survival and by the enhancement of axonal regrowth. Moreover, it can be due to an overactivity of the preserved axons, induced by the cellular environment and possibly by increase plasticity (Macias *et al.*, 2006). Indeed, to recreate neuronal networks, PNN surrounding neurons must be modulated overtime to allow synaptic connection. It was recently reported that reduction of PNN contributes to neuronal overactivity which in turn induce pain (Tansley *et al.*, 2022).

Here, our results bring new information about mechanisms induced by bOECs transplantation after SCI. In effect, we show that bOECs transplantation promotes formation of axonal permissive spinal scar by enhancing laminin deposition (Figure 5J-L). Additionally, to its effects on spinal scar, bOECs transplantation enhances laminin deposition favoring axonal regrowth and the sprouting of axons into the lesion core (Figure 5E and F). Furthermore, our results demonstrate also that bOECs transplantation improves synaptic connection, objectified by VGlut/BDA co-staining, at chronic stage (56 days after spinal cord injury), in rostral part of the spinal cord and at the lesion core (Figure 5I). Interestingly, the results regarding synaptic formation are not correlated with a decrease of PNN density at later stage (Figure 6G-L). We can nevertheless note that PNN, at early stage, is preserved and enhanced after transplantation in comparison to injured mice without treatment (Figure 6J). We can hypothesize that, preservation of PNN protects neurons and increases their survival during the acute phase and the beginning of the chronic phase (28 days after spinal cord injury) (Figure 6D and E).

Altogether, bOECs abilities contribute to the regeneration of axonal networks and formation of new synapses, both improving functional motor recovery (Figure 3), but are also responsible of pain related thermal stimuli (Figure 5A). It is important to note, that the identification of an increase in the number of synapses does not indicate that the network is functional. Electrophysiological analyses would allow us to highlight the functionality of the synapse by investigating nerve connectivity between the neuron and its target.

Altogether, our results confirm the known effects of bOECs transplantation previously described in other studies, regarding expression of molecules modulating spinal scar and axonal regeneration. We described here too the main role played by OECs on microglia/macrophages reactivity and polarization. In effect, our results show for the first time that bOECs transplantation can modulate the ratio of proinflammatory (CD86+) and anti-inflammatory (CD206+) microglia/macrophages present into the lesion site. We have also deepened the knowledge about bOECs effects on modulation of the PNN, which can, at least in part, explain the increase of painful sensitivity observed in bOECs H group.

Therapeutic effects of bOECs transplantation are impaired by spinal cord injury in an autograft model

To determine whether SCI can modulate the therapeutic effects of cells in autologous transplantation paradigm, we have transplanted bOECs, obtained from spinal cord injured mice and collected seven days after the lesion, in other spinal cord injured mice. Our findings demonstrate for the first time that the initial traumatism decreases the therapeutic effects of bOECs. In fact, bOECs I (from injured mice) transplantation, shows no significant difference in term of functional recovery in comparison to SCI control (non -treated animals) and bOECs H (bOECs obtained from no injured mice) groups. At the opposite, it shows a trend with an intermediate effect and a high heterogeneity in functional performances (Figure 3A-I), as well as in hindpaw placements during locomotion (Figure 3J and K). This potential difference in

term of neuroregenerative properties was confirmed by the assessment of spinal scar composition. Indeed, transplantation of bOECs I do not change the spinal scar composition in comparison to untreated mice. While bOECs H transplantation overall reduces the size of the fibrotic scar and thus reduces the area without astrocytes, bOECs I transplantation fails to do the same (Figure 4B, C, F, G, J and L). Analyses of the demyelinated areas show also that bOECs H transplantation reduces MBP negative areas 14 and 56 days after SCI whereas bOECs I transplantation do not reduce it 14 and 28 days after SCI but could only decrease it 56 days after SCI (Figure 5D, H and L respectively).

Then, we hypothesized that spinal scar's modulation can be linked to differences between bOECs H and bOECs I survival after SCI and transplantation. Our results show that the survival of bOECs H and I after transplantation are identical (Figure S1). In effect, 4 weeks after SCI, based on two different approaches, we could not find any surviving cells, in both bOECs transplanted groups, into the spinal cord (Figure S1). These results are of primary importance because they show that the differences observed after bOECs H and bOECs I transplantation are not due to an effect on cell survival but are mainly due to intrinsic differences between the cells per se.

To confirm this hypothesis, we have investigated the effects of bOECs I transplantation on laminin deposition, axonal regrowth and synapse formation. Our results show that, overall bOECs I transplantation decreases laminin deposition in comparison to bOECs H transplantation (Figure 5J and K), has limited effects on axonal regeneration resulting in a decrease of vGlut1 synaptic formation without major influences on axonal sprouting (Figure 5E, G and I). Additionally, to these experiments, neuronal survival and PNN have been assessed after bOECs I transplantation. It appears that bOECs I transplantation does not enhance significantly neuronal survival after SCI in comparison to untreated animals whereas bOECs H transplantation improves it 14 and 28 days after SCI (Figure 6 A-F). More interestingly, WFA

analysis shows that 56 days after SCI, bOECs I transplantation enhances the ratio of WFA+/NeuN+ neurons (Figure 6I). As described above, it has been reported that PNN degradation is a necessary process after injury to induce neuronal plasticity and synaptic connection's establishment at chronic stage (Grycz *et al.*, 2022), this could be linked with the fact that bOECs I transplantation fails to enhance formation of new synapses 56 days after SCI (Figure 5I).

These results could be explained by differences regarding gene expression observed between bOECs H and bOECs I cultures in our RT-qPCR experiments (Figure 2G). In fact, bOEC I cultures express genes involved in scar forming molecules, such as *ctgf*, *fgf1* or *tgfb2* or *3*, which stimulate proliferation of stromal cells and type A pericytes and increase also ECM deposition by astrocytes, leading to an increase in the formation of the fibrotic scar. This analysis demonstrate also that other gene expressions are modulated in bOECs I primary cultures. In effect, a set of genes implicated in ECM modulation and axonal plasticity is upregulated as *sema3f*, *neo1*, *ntn1* or *lgals1* (Figure 2G) known to negatively influence axonal regrowth.

Altogether, these results tend to demonstrate that the gene expression changes observed in primary bOECs I culture, acts directly on spinal scar formation, cell survival and axonal regrowth and decreases the therapeutic effects of these cells.

As described above, important actors for spinal cord regeneration are the microglia/macrophage populations. Quantity and polarization of these cells have a strong influence on spinal tissue scarring and axonal regeneration (Zhou *et al.*, 2014). We found that *in vitro*, microglial cell cultures (BV2 cell line) are modulated by the molecules secreted by bOECs, and in particular by bOECs I cultures conditioned medium. In fact, BV2 cultured with concentrating bOECs I media, overexpress genes coding for cytokines, chemokines, trophic factors and cellular receptors. Among these modulated genes, most of them are implicated in microglial activation

(e.g., *csf1*, *cx3cr1*, *p2rx4*, *p2r12*) and in polarization towards pro-inflammatory phenotype (e.g., *ccl5*, *il1 β* , *cxcr4*, *ifngr2*), while genes expression from BV2 cultured with concentrating bOECs H media are closer to gene expression of BV2 control cultures (without conditioned medium) (Figure 7J and K). BV2 cultured with bOECs H media down regulate their expression of proinflammatory genes in comparison to BV 2 control whereas in the same time BV2 bOECs I upregulate their expression of proinflammatory genes in comparison to control (Figure 7 L and M). These results can be linked to the increase of *il1 β* and *tnf- α* genes expression observed in bOECs I primary culture in our RT-qPCR experiments (Figure 2G). At the opposite, *in vivo* analyses, show that there is no major difference in microglia/macrophage activation and polarization between bOECs H and bOECs I transplantation at the early stage and at the beginning of the chronic stage after SCI (Figure 7A-G). We can nevertheless note that only bOECs H group, in comparison to SCI mice, show a significant increase of the percentage of pro-regenerator/anti-inflammatory microglia/macrophages, identified by CD206, in rostral and caudal parts of the spinal cord at these stages. On the other hand, at chronic stage, time of the second microglia/macrophage wave, the percentage of pro-inflammatory microglia/macrophages is reduced after bOECs H transplantation in comparison to bOECs I transplantation (Figure 7H). These results can indicate that bOECs H form a less reactive extracellular environment at chronic stage, favoring axonal network regeneration by facilitating mechanisms implicated in PNN degradation and synaptic connection formation (Figure 5I and 6I).

Altogether, our results demonstrate for the first time the main effects played by initial injury on the therapeutic effects of cells which can be used for cellular transplantation after SCI. It highlights also one of the reasons which can explain the differences observed regarding spinal cord regeneration and functional recovery after cellular transplantation in mice and human. Indeed, the initial physical trauma does not only lead to localized disturbances at the site of the

injury (Anthony & Couch, 2014). The whole body, in response to circulating cytokines, chemokines and immune cells is in “inflammatory state”, causing intrinsic changes in cells used for autograft transplantation, responsible of their diminished therapeutic effects. The main actor of the spreading of the trauma, is the inflammatory response occurring after SCI. The use of anti-inflammatory drugs for reducing inflammation in the first hours, days and weeks after SCI to decrease cellular response and increase therapeutic effects of the autografted cells, can have adverse effects. In fact, it was demonstrated that immune response and particularly, microglial/macrophage responses are important for tissue regeneration after SCI. Use of anti-inflammatory drugs show that they worsen the size of spinal scar, reduce axonal regeneration and limit functional recovery (Bellver-Landete *et al.*, 2019; Brennan *et al.*, 2022). In our study, we choose to collect olfactory bulb 7 days after SCI, at early stage. One solution would be to collect cells several weeks or month after SCI when immune response is lower, but it is important to consider the chronology of the physiopathology. It has been described, at least in animal studies, that the most effective therapeutic window is at early stage after SCI. Indeed, the use of an efficient therapy at early stage, should allow to decrease axonal and more broadly tissue damages, limiting the exacerbation of the inflammatory response.

Therapeutic effects of bOECs transplantation after spinal cord injury on brain reactivity and disturbances of the cognitive functions

The second purpose of our study was to investigate the effects of cell transplantation, bOECs, used as a treatment after SCI on brain reactivity and cognitive functions. As described above, SCI induces microglia brain activation particularly in hippocampus (Wu *et al.*, 2014). The studies of anxiety, depression and cognitive performances of patients suffering SCI, show that it induces brain perturbations lasting for months after the injury. The importance of these perturbations is correlated with the intensity of SCI, conditioning the cognitive deficits after the traumatism. Patients with high cognitive deficits, induced by SCI, have the worst cognitive

recovery (Maldonado-Bouchard *et al.*, 2016; Craig *et al.*, 2017). These perturbations are related to microglia activation, causing a reduction of neuronal density which is linked to a decrease of neurogenesis and an increase of neuronal death. In rodents, some specific tests as NOR, Y-maze, tail-suspension, forced swim and sucrose preference, allow to investigate brain reactivity and cognitive performances (Wu *et al.*, 2014). Based on these different studies, we have realized cognitive tests after SCI with bOECs H and bOECs I transplantation or without treatment. Our findings show for the first time that cellular therapy applied at spinal level modulates the brain reactivity induces by SCI. Indeed, bOECs H transplantation enhances memory performance 60 days after SCI, objectified by NOR test whereas bOECs I transplantation fails to do the same (Figure 8D and E). However, bOECs H transplantation has no influence on other cognitive performances measured with Y-maze, tail-suspension and sucrose preference (Figure S2). To elucidate how bOECs H transplantation can enhance memory performance, we have realized histological analyses of hippocampus to quantify neurogenesis at early stage, as well as survival of mature neurons and PNN at chronic stage. Neurogenesis in DG is perturbed by SCI and is enhanced by bOECs H transplantation 14 days after SCI (Figure 8G). This augmentation of new neurons (DCX+ neurons) at early stage participates to increase neuronal density at chronic stage, in DG (NeuN+ neurons) (Figure 8I). Interestingly, we do not observe any difference in other hippocampus areas.

To investigate other mechanisms which can modulate cognitive functions, we have assessed the number of neurons surrounded by PNN. In a neurogenic niche such as hippocampus, decrease of PNN surrounding neurons could be linked to an increase of neuronal plasticity (Carstens *et al.*, 2016; Khoo *et al.*, 2019). Our results show that transplantation bOECs H does not influence the number of neurons surrounded by PNN (Figure 8J). Microglial cells participate to hippocampal homeostasis by modulating neurogenesis, synaptogenesis and neuronal death (Wu *et al.*, 2014). That is why, we have then, investigated microglial reactivity

into the hippocampus. Our results, show that bOECs H transplantation reduces microglial activation in CA1 area at early stage and at the beginning of the chronic stage (Figure 8L and M). On the other hand, at chronic stage, bOECs H transplantation has no effects on microglial reactivity in CA1 but reduces it in CA3 (Figure 8N).

CA1 area is the starting point for neuronal projections leaving the hippocampus, it is important for memory transmission in other brain areas. Thus, the disruption of CA1 area brings memory deficits, particularly for non-spatial learning as object recognition, studied with NOR test (Basu & Siegelbaum, 2015). CA3 area is involved in episodic memory, encoding spatial representation and hippocampal areas coordination (Cherubini & Miles, 2015). Moreover, CA3-CA1 synaptic connections control LTP generation in CA1 neurons. LTP generation in CA1 is correlated with learning and memory (Malenka & Bear, 2004).

Altogether, our results show that bOECs H transplantation in spinal cord after injury induces therapeutic effects on memory deficits caused by SCI. This effect is associated with improvement of neurogenesis at early stage based on the increase of the number of DCX+ neurons. Moreover, bOECs H transplantation enhances the number of mature neurons (NeuN+) at later stage. These results regarding mature neurons can be interpreted as an improvement of neuronal survival or can be also the reflect of neuronal integration of the newborn neurons (DCX+) observed 14 days after SCI. Finally, our results show also that bOECs H transplantation decreases microglial cells reactivity in CA1 at early stage then in CA3 at later stage.

This part of our study does not allow to describe precisely the mechanisms involved, but several hypotheses can be proposed. The involvement of inflammatory cytokines in the propagation to the brain seems to be a plausible explanation. Present in CSF and blood after SCI, cytokines, chemokines and ROS enhance permeability of the BBB favoring infiltration into the brain of activated immune cells. Indeed, on endothelial cells, composing BBB, there is the presence of

cytokine and chemokine transporters (Banks *et al.*, 1994; Osburg *et al.*, 2002). In addition, lymphocytes transiently enter the brain by different ways, including the non-windowed capillaries of the choroid plexus. As lymphocytes represent 50% of CSF immune cells, they can be activated by the presence of cytokines in the CSF and go to activate cerebral microglial cells (Ousman & Kubes, 2012). As we have demonstrated that bOECs transplantation after SCI reduces inflammation into the spinal cord, we can hypothesize that it decreases systemic inflammation, limiting the disruption of BBB and brain reactivity. This hypothesis is indirectly confirmed by the decrease of hippocampal microglial reactivity observed in bOECs transplanted animals. Even if most of the transplanted cells die during the first two weeks after their transplantation, we can hypothesize that during this period, bOECs influence the amount of cytokines and growth factors present into the brain, reducing neurogenesis disruption and neuronal damage leading to therapeutic effects on cognitive functions at later stage.

Initial injury also alters the potential of transplanted mesenchymal stem cells.

The last objective of our study was to investigate if the effects of SCI on the therapeutic properties of bOECs can be observed in other cell types potentially usable for cellular transplantation. MSCs from fat tissue have been chosen because these cells are not present into the nervous system and because they can be easily obtained both in rodents and Humans.

The first experiments conducted assessed the abilities of MSCs to modulate spinal scar and functional recovery after SCI. To do so, we have compared the therapeutic properties of MSCs I (from injured mice) to the one of MSCs H (from uninjured mice).

Surprisingly, our results demonstrate that neither MSCs H nor MSCs I play a major role on spinal scar and functional recovery. Indeed, our analyses show that both MSCs groups (MSCs H and I) are comparable to non-treated one regarding locomotor tests and cellular composition of spinal scar (Figure S3A-I). Analyses of sensitive functions, axonal regrowth and formation of new synapses reveal that both MSCs groups present a reduction of hindpaw withdrawal and

an increase of axonal regrowth in comparison to control group, with no effect on synaptogenesis (Figure S3J, K and L respectively). Finally, analysis of laminin deposition and microglia/macrophages reactivity and polarization have been conducted. Interestingly, these analyses reveal that MSCs H transplantation enhances the ratio of this permissive molecule into the lesion scar (Figure S3M and N), whereas MSCs I group is comparable to the SCI control one. We demonstrate also that MSCs H transplantation reduces the number of activated microglia/macrophages and enhances the ratio of CD206+ microglia/macrophages 56 days after SCI in comparison to control (Figure S3P-R) whereas MSCs I transplantation has no effect on these parameters.

Altogether, this part of the results shows that MSCs transplantation has limited effects after SCI on tissue repair and functional recovery. It demonstrates also that only MSCs H transplantation enhances laminin deposition and modulates microglia/macrophage populations in increasing the proportion of anti-inflammatory cells after SCI showing on these parameters an impairment of the properties of MSCs I.

The effects of MSCs H transplantation on microglia/macrophages encourage us to investigate the effects of these cells on cognitive functions and hippocampus reactivity.

As described above after bOECs H transplantation, NOR test and immunohistological experiments reveals that MSCs H can improve neuronal density in hippocampus and cognitive functions (Figure 9A-E). These results are of primary importance because they show that even without improvement of functional locomotor recovery, an improvement of cognitive functions can be observed. This indicates that the therapeutic effects on brain are independent of spinal cord regeneration and are probably related to circulating factors such as cytokines and growth factors released by transplanted cells. Moreover, as described after bOECs H transplantation our analyses of microglia/macrophages reveal that MSCs H modulate these cellular populations in hippocampus 56 days after SCI (Figure 9G).

Limitations of the study and Conclusion

Our experiments increase the knowledge regarding the effects of the transplantation of bOECs after SCI both in brain and in spinal cord, nevertheless, we demonstrate also that these cells are not integrated into injection sites. That is why, the main hypothesis of the effects observed after bOECs but also after MSCs transplantation is that the transplanted cells modulate spinal cord and tissues indirectly through secretion of growth factors or immunomodulatory molecules. To explore this hypothesis, it is necessary to analyze the proteome of blood and CSF both after SCI and transplantation. It could be important also to determine the phenotypes of microglial cells present into the hippocampus after SCI and transplantation. Moreover, we have not investigated the changes of the astrocyte populations in brain and spinal cord. Indeed, a better understanding of their role in the physiopathology would contribute to the comprehension of the therapeutic effects of bOECs and MSCs transplantations. Regarding spinal cord, our analysis provides data on the structure of the tissue and on the phenotype of the cells composing it. However, it would be necessary to push the analysis by focusing on the molecular interactions between cells induced by cytokines, ionic balance, growth factors or cell-cell interactions via ligand-receptor bindings.

To conclude, our results should be put in a clinical perspective. Indeed, autograft transplantation is envisaged as potential treatment to cure SCI. However, our results demonstrate for the first time that traumatic SCI impairs the neuroregenerative properties of cells used as therapy when obtained from injured animals. We can reasonably hypothesize that is the same in Human patients suffering SCI questioning, in this case, the feasibility and the therapeutic effects of such transplantations. Our study points out unexpected results regarding the potential effects of bOECs and MSCs transplantation. In effect, we show for this first time that when these cells are transplanted into the spinal cord, they can alleviate cognitive declines such as memory

deficit observed after SCI. We demonstrate also that the cognitive enhancement is not correlated to locomotor recovery.

References:

- Anderson, M.A., Burda, J.E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T.M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B.S., Deming, T.J., & Sofroniew, M.V. (2016) Astrocyte scar formation aids CNS axon regeneration. *Nature*, **532**, 195–200.
- Anderson, M.A., O'Shea, T.M., Burda, J.E., Ao, Y., Barlatey, 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., & Sofroniew, M.V. (2018) Required growth facilitators propel axon regeneration across complete spinal cord injury. *Nature*, **561**, 396–400.
- Anthony, D.C. & Couch, Y. (2014) The systemic response to CNS injury. *Exp. Neurol.*, **258**, 105–111.
- Assinck, P., Duncan, G.J., Hilton, B.J., Plemel, J.R., & Tetzlaff, W. (2017) Cell transplantation therapy for spinal cord injury. *Nat. Neurosci.*, **20**, 637–647.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., & Ehrensing, C.A. (1994) Blood-borne interleukin-1 alpha is transported across the endothelial blood-spinal cord barrier of mice. *J. Physiol.*, **479**, 257–264.
- Barnabé-Heider, F., Göritz, C., Sabelström, H., Takebayashi, H., Pfrieger, F.W., Meletis, K., & Frisén, J. (2010) Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell*, **7**, 470–482.
- Basu, J. & Siegelbaum, S.A. (2015) The Corticohippocampal Circuit, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **7**.
- Bellver-Landete, V., Bretheau, F., Mailhot, B., Vallières, N., Lessard, M., Janelle, M.-E., Vernoux, N., Tremblay, M.-È., Fuehrmann, T., Shoichet, M.S., & Lacroix, S. (2019) Microglia are an essential component of the neuroprotective scar that forms after spinal cord injury. *Nat. Commun.*, **10**.
- Benabid, A.L., Costecalde, T., Eliseyev, A., Charvet, G., Verney, A., Karakas, S., Foerster, M., Lambert, A., Morinière, B., Abroug, N., Schaeffer, M.-C., Moly, A., Sauter-Starace, F., Ratel, D., Moro, C., Torres-Martinez, N., Langar, L., Oddoux, M., Polosan, M., Pezzani, S., Auboiroux, V., Aksenova, T., Mestais, C., & Chabardes, S. (2019) An exoskeleton controlled by an epidural wireless brain-machine interface in a tetraplegic patient: a proof-of-concept demonstration. *Lancet Neurol.*, **18**, 1112–1122.
- Boido, M., Garbossa, D., Fontanella, M., Ducati, A., & Vercelli, A. (2014) Mesenchymal Stem Cell Transplantation Reduces Glial Cyst and Improves Functional Outcome After Spinal Cord Compression. *World Neurosurg.*, **81**, 183–190.
- Brennan, F.H., Li, Y., Wang, C., Ma, A., Guo, Q., Li, Y., Pukos, N., Campbell, W.A., Witcher, K.G., Guan, Z., Kigerl, K.A., Hall, J.C.E., Godbout, J.P., Fischer, A.J., McTigue, D.M., He, Z., Ma, Q., & Popovich, P.G. (2022) Microglia coordinate cellular interactions during spinal cord repair in mice. *Nat. Commun.*, **13**, 4096.
- Capirossi, R., Piunti, B., Fernández, M., Maietti, E., Rucci, P., Negrini, S., Giovannini, T., Kiekens, C., & Calzà, L. (2020) Early CSF Biomarkers and Late Functional Outcomes in Spinal Cord Injury. A Pilot Study. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 9037.
- Carstens, K.E., Phillips, M.L., Pozzo-Miller, L., Weinberg, R.J., & Dudek, S.M. (2016) Perineuronal Nets Suppress Plasticity of Excitatory Synapses on CA2 Pyramidal Neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, **36**, 6312–6320.
- Cherubini, E. & Miles, R. (2015) The CA3 region of the hippocampus: how is it? What is it for? How does it do it? *Front. Cell. Neurosci.*, **9**.
- Craig, A., Guest, R., Tran, Y., & Middleton, J. (2017) Cognitive Impairment and Mood States after Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma*, **34**, 1156–1163.

- Delarue, Q., Robac, A., Massardier, R., Marie, J.-P., & Guérout, N. (2021) Comparison of the effects of two therapeutic strategies based on olfactory ensheathing cell transplantation and repetitive magnetic stimulation after spinal cord injury in female mice. *J. Neurosci. Res.*, **99**, 1835–1849.
- Farkas, G.J., Gorgey, A.S., Dolbow, D.R., Berg, A.S., & Gater, D.R. (2018) The influence of level of spinal cord injury on adipose tissue and its relationship to inflammatory adipokines and cardiometabolic profiles. *J. Spinal Cord Med.*, **41**, 407–415.
- Felix, M.-S., Popa, N., Djelloul, M., Boucraut, J., Gauthier, P., Bauer, S., & Matarazzo, V.A. (2012) Alteration of Forebrain Neurogenesis after Cervical Spinal Cord Injury in the Adult Rat. *Front. Neurosci.*, **6**.
- Gensel, J.C. & Zhang, B. (2015) Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res.*, **1619**, 1–11.
- Golestani, A., Shobeiri, P., Sadeghi-Naini, M., Jazayeri, S.B., Maroufi, S.F., Ghodsi, Z., Ohadi, M.A.D., Mohammadi, E., Rahimi-Movaghar, V., & Ghodsi, S.M. (2022) Epidemiology of Traumatic Spinal Cord Injury in Developing Countries from 2009 to 2020: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology*, **56**, 219–239.
- Gómez, R.M., Sánchez, M.Y., Portela-Lomba, M., Ghotme, K., Barreto, G.E., Sierra, J., & Moreno-Flores, M.T. (2018) Cell therapy for spinal cord injury with olfactory ensheathing glia cells (OECs). *Glia*, **66**, 1267–1301.
- Gris, D., Hamilton, E., & Weaver, L. (2008) The systemic inflammatory response after spinal cord injury damages lungs and kidneys [WWW Document]. *Exp. Neurol.*. URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18384773/>
- Grycz, K., Głowacka, A., Ji, B., Krzywdzińska, K., Charzyńska, A., Czarkowska-Bauch, J., Gajewska-Woźniak, O., & Skup, M. (2022) Regulation of perineuronal net components in the synaptic bouton vicinity on lumbar α -motoneurons in the rat after spinalization and locomotor training: New insights from spatio-temporal changes in gene, protein expression and WFA labeling. *Exp. Neurol.*, **354**, 114098.
- Han, D., Wu, C., Xiong, Q., Zhou, L., & Tian, Y. (2015) Anti-inflammatory Mechanism of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Rat Model of Spinal Cord Injury. *Cell Biochem. Biophys.*, **71**, 1341–1347.
- Honoré, A., Le corre, S., Derambure, C., Normand, R., Duclos, C., Boyer, O., Marie, J.-P., & Guérout, N. (2012) Isolation, characterization, and genetic profiling of subpopulations of olfactory ensheathing cells from the olfactory bulb. *Glia*, **60**, 404–413.
- Irvine, S.F. & Kwok, J.C.F. (2018) Perineuronal Nets in Spinal Motoneurons: Chondroitin Sulphate Proteoglycan around Alpha Motoneurons. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 1172.
- Jiang, C., Wang, X., Jiang, Y., Chen, Z., Zhang, Y., Hao, D., & Yang, H. (2022) The Anti-inflammation Property of Olfactory Ensheathing Cells in Neural Regeneration After Spinal Cord Injury. *Mol. Neurobiol.*, **59**, 6447–6459.
- Jiang, Y., Guo, J., Tang, X., Wang, X., Hao, D., & Yang, H. (2022) The Immunological Roles of Olfactory Ensheathing Cells in the Treatment of Spinal Cord Injury. *Front. Immunol.*, **13**.
- Khankan, R.R., Griffis, K.G., Haggerty-Skeans, J.R., Zhong, H., Roy, R.R., Edgerton, V.R., & 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.
- Khoo, G.H., Lin, Y.-T., Tsai, T.-C., & Hsu, K.-S. (2019) Perineuronal Nets Restrict the Induction of Long-Term Depression in the Mouse Hippocampal CA1 Region. *Mol. Neurobiol.*, **56**, 6436–6450.
- Li, Y., Ritzel, R.M., Khan, N., Cao, T., He, J., Lei, Z., Matyas, J.J., Sabirzhanov, B., Liu, S., Li, H., Stoica, B.A., Loane, D.J., Faden, A.I., & Wu, J. (2020) Delayed microglial depletion after spinal

- cord injury reduces chronic inflammation and neurodegeneration in the brain and improves neurological recovery in male mice. *Theranostics*, **10**, 11376–11403.
- Macias, M.Y., Syring, M.B., Pizzi, M.A., Crowe, M.J., Alexanian, A.R., & Kurpad, S.N. (2006) Pain with no gain: allodynia following neural stem cell transplantation in spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, **201**, 335–348.
- Maldonado-Bouchard, S., Peters, K., Woller, S.A., Madahian, B., Faghihi, U., Patel, S., Bake, S., & Hook, M.A. (2016) Inflammation is increased with anxiety- and depression-like signs in a rat model of spinal cord injury. *Brain. Behav. Immun.*, **51**, 176–195.
- Malenka, R.C. & Bear, M.F. (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, **44**, 5–21.
- M'Dahoma, S., Bourgoïn, S., Kayser, V., Barthélémy, S., Chevarin, C., Chali, F., Orsal, D., & Hamon, M. (2014) Spinal Cord Transection-Induced Allodynia in Rats – Behavioral, Physiopathological and Pharmacological Characterization. *PLoS ONE*, **9**.
- Mortazavi, M.M., Verma, K., Harmon, O.A., Griessenauer, C.J., Adeeb, N., Theodore, N., & Tubbs, R.S. (2015) The microanatomy of spinal cord injury: a review. *Clin. Anat. N. Y. N.*, **28**, 27–36.
- Nakhjavan-Shahraki, B., Yousefifard, M., Rahimi-Movaghar, V., Baikpour, M., Nasirinezhad, F., Safari, S., Yaseri, M., Moghadas Jafari, A., Ghelichkhani, P., Tafakhori, A., & Hosseini, M. (2018) Transplantation of olfactory ensheathing cells on functional recovery and neuropathic pain after spinal cord injury; systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.*, **8**.
- Noble, B.T., Brennan, F.H., & Popovich, P.G. (2018) The spleen as a neuroimmune interface after spinal cord injury. *J. Neuroimmunol.*, **321**, 1–11.
- Osburg, B., Peiser, C., Dömling, D., Schomburg, L., Ko, Y.T., Voigt, K., & Bickel, U. (2002) Effect of endotoxin on expression of TNF receptors and transport of TNF-alpha at the blood-brain barrier of the rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **283**, E899-908.
- Ousman, S.S. & Kubes, P. (2012) Immune surveillance in the central nervous system. *Nat. Neurosci.*, **15**, 1096–1101.
- Park, H.-W., Lim, M.-J., Jung, H., Lee, S.-P., Paik, K.-S., & Chang, M.-S. (2010) Human mesenchymal stem cell-derived Schwann cell-like cells exhibit neurotrophic effects, via distinct growth factor production, in a model of spinal cord injury. *Glia*, **58**, 1118–1132.
- Radtke, C., Akiyama, Y., Brokaw, J., Lankford, K.L., Wewetzer, K., Fodor, W.L., & Kocsis, J.D. (2004) Remyelination of the nonhuman primate spinal cord by transplantation of H-transferase transgenic adult pig olfactory ensheathing cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **18**, 335–337.
- Ritzel, R.M., Li, Y., He, J., Khan, N., Doran, S.J., Faden, A.I., & Wu, J. (2020) Sustained neuronal and microglial alterations are associated with diverse neurobehavioral dysfunction long after experimental brain injury. *Neurobiol. Dis.*, **136**, 104713.
- Sabelström, H., Stenudd, M., Réu, P., Dias, D.O., Elfineh, M., Zdunek, S., Damberg, P., Göritz, C., & Frisé, J. (2013) Resident Neural Stem Cells Restrict Tissue Damage and Neuronal Loss After Spinal Cord Injury in Mice. *Science*, **342**, 637–640.
- Schneider, M.P., Sartori, A.M., Ineichen, B.V., Moors, S., Engmann, A.K., Hofer, A.-S., Weinmann, O., Kessler, T.M., & Schwab, M.E. (2019) Anti-Nogo-A Antibodies As a Potential Causal Therapy for Lower Urinary Tract Dysfunction after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.*, **39**, 4066–4076.
- Shechter, R. & Schwartz, M. (2013) CNS sterile injury: just another wound healing? *Trends Mol. Med.*, **19**, 135–143.
- Solstrand Dahlberg, L., Becerra, L., Borsook, D., & Linnman, C. (2018) Brain changes after spinal cord injury, a quantitative meta-analysis and review. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **90**, 272–293.

- Tansley, S., Gu, N., Guzmán, A.U., Cai, W., Wong, C., Lister, K.C., Muñoz-Pino, E., Yousefpour, N., Roome, R.B., Heal, J., Wu, N., Castonguay, A., Lean, G., Muir, E.M., Kania, A., Prager-Khoutorsky, M., Zhang, J., Gkogkas, C.G., Fawcett, J.W., Diatchenko, L., Ribeiro-da-Silva, A., De Koninck, Y., Mogil, J.S., & Khoutorsky, A. (2022) Microglia-mediated degradation of perineuronal nets promotes pain. *Science*, **377**, 80–86.
- Tran, A.P., Warren, P.M., & Silver, J. (2018) The Biology of Regeneration Failure and Success After Spinal Cord Injury. *Physiol. Rev.*, **98**, 881–917.
- Travlos, A., Anton, H.A., & Wing, P.C. (1994) Cerebrospinal fluid cell count following spinal cord injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, **75**, 293–296.
- Ursavas, S., Darici, H., & Karaoz, E. (2021) Olfactory ensheathing cells: Unique glial cells promising for treatments of spinal cord injury. *J. Neurosci. Res.*, **99**, 1579–1597.
- Wu, J., Stoica, B.A., Luo, T., Sabirzhanov, B., Zhao, Z., Guanciale, K., Nayar, S.K., Foss, C.A., Pomper, M.G., & Faden, A.I. (2014) Isolated spinal cord contusion in rats induces chronic brain neuroinflammation, neurodegeneration, and cognitive impairment. Involvement of cell cycle activation. *Cell Cycle Georget. Tex.*, **13**, 2446–2458.
- Zhang, L., Zhuang, X., Kotitalo, P., Keller, T., Krzyczmonik, A., Haaparanta-Solin, M., Solin, O., Forsback, S., Grönroos, T.J., Han, C., López-Picón, F.R., & Xia, H. (2021) Intravenous transplantation of olfactory ensheathing cells reduces neuroinflammation after spinal cord injury via interleukin-1 receptor antagonist. *Theranostics*, **11**, 1147–1161.
- Zhou, X., He, X., & Ren, Y. (2014) Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. *Neural Regen. Res.*, **9**, 1787–1795.

Figure legends:

Figure 1: Schematic representation of the four main experimental groups used in our study. **A.** No SCI group, non-injured animals used to define the base lines in functional and histological experiments. **B.** SCI group, injured animals without treatment. **C.** SCI-bOECs H, SCI was performed on these animals and primary bOECs transplantation was performed right after SCI. OB used for preparing primary bOECs was obtained from non-injured animals. **D.** SCI-bOECs I, SCI was performed on these animals and primary bOECs transplantation was performed right after SCI. OB used for preparing primary bOECs was obtained from previously SCI-injured animals. SCI was performed on other mice 7 days before to perform primary OB cultures.

Figure 2: SCI alters gene expression in olfactory bulbs and in primary bOECs cultures. **A.** Representative pictures of sagittal section of the OB, representative of the granular cell layer. Microglial cells reactivity was analyzed with expression of Iba1 and CD86 markers. Arrows show Iba1+/CD86+ microglial cells. Scale bare: A1=250µm, A2=100µm and A3=20µm. **B.** Histogram of mRNA expression of OB without SCI and 7 days after SCI of anti-inflammatory, neuron/microglia communication, trophic factors and pro-inflammatory genes. Dashed lines correspond to mRNA expression from OB without SCI. **C-E.** Chronology of microglial cell reactivity in the OB. Expression of Iba1 (**C**) and CD86 (**D**) cell markers as well as the proportion of Iba1+/CD86+ cells (**E**) were measured without SCI and 3, 12, 24, 48 hours and 7 days after SCI. **F.** Quantification of the percentage of p75+ OECs and PDGFRβ+ fibroblasts in bOECs cultures without SCI, 7 days and 14 days after SCI by cytometry analysis. **G.** Histogram of mRNA expression of bOECs H and bOECs I of growth factors, cytokines, ECM and signalization and axonal plasticity genes. Dashed lines correspond to mRNA expression from bOECs H cultures.

Quantifications are expressed as average \pm SD. N=5 (**B-E**), 3 (**F**) and 8 (**G**) animals per group. Statistical evaluations were based on Mann-Whitney (**B, F** and **G**) and Kruskal-Wallis (**C-E**) tests. * = $P < 0.05$ and ** = $P < 0.01$.

Figure 3: Initial injury alters functional recovery induced by OECs transplantation. **A-I.** Functional recovery was analyzed using locomotor test 14, 28 and 56 days after SCI. Dashed lines correspond to the baseline parameters obtained during locomotor test habituation (7 days before SCI). **A-C.** Quantification of the number of back legs errors. **D-F.** Quantification of the total back legs errors time. **G-I.** Quantification of the total crossing time. **J and K.** Catwalk gait analysis was performed 58 days after SCI. Purple and black dashed lines correspond respectively to the baseline parameters obtained during catwalk gait test habituation (7 days before SCI) and to the parameters obtained by SCI group 58 days after SCI. **J.** Measurement of the base of support. **K.** Measurement of the stride length.

Quantifications are expressed as average \pm SD. N=8-10 (**A, B, D, E, G and H**), 5-10 (**C, F and I**) and 5 (**J and K**) animals per group. Statistical evaluations were based on Kruskal-Wallis (**A-I**) and Mann-Whitney (**J and K**) tests. Quantifications are expressed as average \pm SD. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$ and *** = $P < 0.001$.

Figure 4: Initial injury alters tissue repair properties induced by OECs transplantation. Histological analyses of the spinal scar were performed 14, 28 and 56 days after SCI. **A, E and I.** Representative pictures of sagittal spinal cord sections of SCI, SCI-bOECs H and SCI-bOECs I groups 14 (**A**), 28 (**E**) and 56 (**I**) days after SCI. Sections were stained with (**A, E and I**) GFAP, PDGFR β and MBP. **B, F and I.** Fibrosis area (PDGFR β +) and quantification of PDGFR β + area 14, 28 and 56 days after SCI. **C, G and K.** Astrocytic negative area (GFAP-) and quantification of GFAP- area 14, 28 and 56 days after SCI. **D, H and L.** Demyelinated/unmyelinated area (MBP-) and quantification of MBP- area 14, 28 and 56 days after SCI. **A, E and I.** Dashed lines correspond to the injury site. Scale bar = 200 μ m. Quantifications are expressed as average \pm Min/Max. N=8-10 (**B, C, D, F, G and H**), 5-10 (**J-L**) animals per group. Statistical evaluations were based on Kruskal-Wallis tests. Quantifications are expressed as average \pm SD. * = $P < 0.05$ and ** = $P < 0.01$.

Figure 5: BOECs transplantation induces axonal regrowth and synaptogenesis and is associated with pain-related behavior. **A.** Sensitive functional recovery was analyzed 14, 28 and 56 days after SCI, using Hargreaves test. Dashed lines correspond to the baseline parameters obtained during Hargreaves test habituation (7 days before SCI). **B** and **C.** Catwalk gait analysis was performed. Quantification of hindpaw pression measurements, max (**B**) and mean (**C**) hindpaw pression measurements at 58 days after SCI. Purple and black dashed lines corresponds respectively to the baseline parameters obtained during catwalk gait test habituation (7 days before SCI) and to the parameters obtained by SCI group 58 days after SCI. Additionally, (**D-L**) 14, 28 and 56 days after SCI, histological analyses have been performed. **D** and **E.** Representative pictures of sagittal spinal cord sections of SCI-boECs I groups. The square sections correspond to the rostral (R), lesion core (LC) and caudal (C) areas, defined for the quantification of BDA/vGlut1 axon sprouts. The rectangular sections correspond to the areas defined for the quantification of axonal sprouting as a function of distance from the lesion core. Arrows show axon sprout (**D**) and co-localized BDA/vGlut1 axon (**H**). Sections were stained with (**D**) BDA and PDGFR β and with (**H**) BDA and vGlut1. Scale bar = 500 (**D**) and 100 (**H**) μ m. **E-G.** Number of axon sprouts as a function of distance from the lesion core were counted 14, 28 and 56 days after SCI. **I.** Axons sprout co-localized with synaptic stain vGlut1 were counted 14, 28 and 56 days after SCI. **J-L.** Finally, the analysis of laminin expression as a support for axonal growth was performed. Quantification of laminin intensity (**J**) and laminin+ area/ PDGFR β + area ratio (**K**) 14, 28 and 56 days after SCI. **L.** Representative pictures of sagittal spinal cord sections of SCI-boECs I group 14 days after SCI, representing the laminin area and the PDGFR β area corresponding. Scale bar = 500 μ m

Quantifications are expressed as average \pm SD (**A, B, C, E, F, G,** and **I**) and average \pm Min/Max (**J** and **K**). N=6-10 (**A, J** and **K**) and 5 (**B, C, E, F, G,** and **I**) animals per group. Statistical

evaluations were based on Kruskal-Wallis (**A, F, G, H, I, J and K**) and Mann-Whitney (**B and C**) tests. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$ and *** = $P < 0.001$.

Figure 6: BOECs transplantation increases neuron survival and modules perineural net structure. Histological analyses of the neuronal density and stability. A-C. Representative pictures of sagittal spinal cord sections of SCI (A), SCI-bOECs H (B) and SCI-bOECs I (C) groups 14 days after SCI. Section were stained with NeuN and WFA. The square sections correspond to the rostral 1 and 2 (R1 and R2), lesion core (LC) and caudal 1 and 2 (C1 and C2) areas, defined for the quantification of NeuN neurons and WFA perineural net. Arrows show co-localized NeuN and WFA staining. Scale bar = 250 μ m (sagittal spinal cord sections) and 100 μ m (R2, R1, LC, C1 and C2 analyzed squares). **D-F.** Quantification of the neuronal density 14 (D), 28 (E) and 56 (F) days after SCI. **G-I.** Analyze of the perineural net. **G-I.** Quantification of the number of NeuN+ neuronal cells surrounded by WFA 14 (G), 28 (H) and 56 (I) days after SCI. **J-L.** Measurement of WFA intensity 14 (J), 28 (K) and 56 (L) days after SCI. Dashed lines correspond to the baseline parameters obtained with No SCI group. Quantifications are expressed as average \pm SD. N=5-8 (D, G and J), 5-10 (E, H and K) and 5 (F, I and L) animals per group. Statistical evaluations were based on Kruskal-Wallis tests. * = $P < 0.05$ and ** = $P < 0.01$.

Figure 7: BOECs change microglia/macrophage cells polarization. **A-I.** Histological analyses of microglia/macrophage cell density and polarization. **A.** Number of Iba1 positive microglia/macrophage cells was measured 14, 28 and 56 days after SCI. **B and C.** Representative pictures of sagittal spinal cord sections of SCI, SCI-bOECs H and SCI-bOECs I groups 14 days after SCI. The square sections correspond to the rostral (R), lesion core (LC) and caudal (C) areas, defined for the quantification of Iba1+/CD86+ and Iba1+/CD206+ cells. Arrows show Iba1+/CD206+ microglial cells (**B**) and Iba1+/CD86+ microglial cells (**C**). Sections were stained with (**B**) Iba1 and CD86 and (**C**) Iba1 and CD206. Scale bar = 250µm (sagittal spinal cord sections) and 100µm (R, LC and C analyzed squares). Polarization of microglia/macrophage cells was analyzed by the expression of pro-inflammatory marker CD86 (**D, F and H**) and anti-inflammatory marker CD206 (**E, G and I**). Polarization was analyzed 14 (**D and E**), 28 (**F and G**) and 56 (**H and I**) days after SCI. Dashed lines correspond to the baseline parameters obtained with No SCI group. **J-M.** Induction *in vitro* of BV2 cells polarization by bOECs conditioned media (CM). **J.** Experimental design, healthy or injured bOECs were plated (day 0). Four weeks after plating, bOECs H and bOECs I conditioned media were obtained et concentrated (day 28). BV2 cells were plated (day 29) and the next day (day 30), bOECs H or bOECs I concentrated CM were added to the BV2 cell cultures. Two days after (day 32), BV2 cells were removed from the plates and analyzed by RT-qPCR (**K**). **K-M.** Histogram of mRNA expression of BV2 cells control and BV2 cells with bOECs H CM or bOECs I CM of cytokines, chemokines, trophic factors and receptors genes. Dashed lines correspond to mRNA expression from BV2 cultures. Quantifications are expressed as average \pm SD (**D-M**) and average \pm Min/Max (**A**). N=5-10 (**A**), 8-10 (**D-G**) and 5-10 (**H and I**) animals per group. N=5 BV2 cell cultures (**K, L and M**) per group. Statistical evaluations were based on Kruskal-Wallis (**A, D, E, F, G, H and I**) and Mann-Whitney (**K, L and M**) tests. * and $\gamma = P < 0.05$; ** = $P < 0.01$ and *** = $P < 0.001$.

Figure 8: BOECs transplantation improves cognitive behavior after SCI. **A-E.** Novel object recognition experiments have been realized 32 and 60 days after SCI. **A.** Schematic description of novel object recognition experiments. **B** and **D.** Frequency of orientation of the head towards the new object 32 and 60 days after SCI. **C** and **E.** Duration of orientation of the head towards the new object 32 and 60 days after SCI. **F** and **G.** Quantification of immature neuron (DCX+) in DG 14 days after SCI. **F.** Representative pictures of sagittal DG sections of SCI and SCI-boECs H 14 days after SCI. Sections were stained with DCX. Scale bar = 100 μ m. **G.** Quantification of DCX+ neuron density in DG 14 days after SCI. **H-J.** Quantification of mature neurons (NeuN+) density and perineural net structure in DG, CA3, CA2 and CA1 64 days after SCI. **H.** Representative pictures of hippocampal sagittal sections of SCI-boECs H group. Sections were stained with NeuN. Arrows show NeuN+ neuronal cells surrounded by WFA. Scale bar = 100 μ m. Measurement of NeuN+ neuronal cells density (**I**) and percentage of NeuN+ neurons surrounded by WFA (**J**) in hippocampus. **K-N.** Microglia/macrophage cells reactivity in hippocampus 14, 28 and 64 days after SCI. **K.** Representative pictures of hippocampal sagittal sections of SCI, SCI-boECs H and SCI-boECs I groups. Sections were stained with Iba1. Scale bar = 100 μ m. **L, M** and **N.** Quantification of microglia/macrophage cells density in hippocampus 14, 28 and 64 days after SCI. Dashed lines correspond to the baseline parameters obtained with No SCI group. Quantifications are expressed as average \pm SD (**B, C, D, E** and **J**) and average \pm Min/Max (**G, I, L, M** and **N**). N=5 (**B-E**) and 8-10 (**G, I, J, L, M** and **N**) animals per group. Statistical evaluations were based on Kruskal-Wallis (**B-E**) and Mann-Whitney (**G, I, J, L, M** and **N**) tests. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$ and *** = $P < 0.001$.

Figure 9: MSCs transplantation improves cognitive behavior after SCI. **A** and **B**. Novel object recognition experiments have been realized 56 days after SCI. Frequency of orientation of the head towards the new object (**A**) and duration of orientation of the head towards the new object (**B**). **C-F**. Quantification of NeuN⁺ neuron density and perineural net structure in DG, CA3, CA2 and CA1 64 days after SCI. **C**. Representative pictures of hippocampal sagittal sections of SCI and SCI-MSCs H groups. Arrows show NeuN⁺ neuronal cells surrounded by WFA. Scale bar = 100 μ m. Measurement of NeuN⁺ neuronal cells density (**D**), percentage of NeuN⁺ neuron surrounded by WFA (**E**) and WFA intensity (**F**) in hippocampus. **G**. Microglia/macrophage cells reactivity in hippocampus 64 days after SCI. **G**. Quantification of microglia/macrophage cells density in hippocampus 64 days after SCI. Quantifications are expressed as average \pm SD (**A**, **B**, **E** and **F**) and average \pm Min/Max (**D** and **G**). N=6-9 (**A** and **B**) and 8-10 (**D-G**) animals per group. Statistical evaluations were based on Kruskal-Wallis (**A** and **B**) and Mann-Whitney (**D-G**) tests. * = $P < 0.05$.

Supplementary Figure Legends

Figure S1: Initial injury does not modulate OECs survival after transplantation. **A.** Quantification of luciferase+ signals 7, 14 and 21 days after SCI. **B.** Representative images of luciferase+ SCI-bOECs H and SCI-bOECs I transplanted in WT mice 7 and 21 days after SCI and transplantation **C.** Representative pictures of sagittal spinal cord sections of SCI, SCI-bOECs H and SCI-bOECs I groups 14, 21 and 28 days after SCI. Dashed lines correspond to the injury site. Sections was stained with tdTomato. Scale bar = 250 μ m **D.** Quantification of mean fluorescence intensity of the tdTomato expression, 14, 21 and 28 days after SCI. Quantifications are expressed as average \pm SD. N=3 (**A**) and 5 (**D**) animals per group. Statistical evaluations were based on Kruskal-Wallis tests.

Figures S2: BOECs transplantation after SCI does not modulate anhedonia, spatial working memory and depression-like behavior. **A.** Experimental design, SCI were performed on mice (day 0). At day 0, SCI injured animals were transplanted with primary bOECs H and bOECs I cultures. Then, **(B)** 29-31 and 57-59 days after SCI, sucrose preference have been realized. Tail suspension was performed 35 and 63 days after SCI (**C** and **D**). Finally, 63 and 64 days after SCI, Y-maze tests have been realized (**E** and **F**). **B.** Sucrose preference test (SP). The SP is calculated by divide consumption of sweetened water by total consumption of water (plain water + sweetened water). **C** and **D.** Y-Maze test. Number of arm entries (**C**) and percentage of spontaneous alternations (**D**). **E.** and **F.** Tail suspension test. Immobility time (**E**) and energy consumption (**F**). Purple dashed lines correspond respectively to the baseline parameters obtained during tests habituation (7 days before SCI).

Quantifications are expressed as average \pm SD. N=3-5 animals per group. Statistical evaluations were based on Kruskal-Wallis tests.

Figure S3: SCI alters gene expression in MSCs cultures. **A.-D.** Schematic representation of the four main experimental groups used for MSCs study. **A.** No SCI group, non-injured animals used to define the base lines in functional and histological experiments. **B.** SCI group, injured animals without treatment. **C.** SCI-MSCs H, SCI was performed on these animals and MSCs transplantation was performed right after SCI. Fat tissue used for preparing MSCs cultures was obtained from non-injured animals. **D.** SCI-MSCs I, SCI was performed on these animals and MSCs transplantation was performed right after SCI. Fat tissue used for preparing MSCs cultures was obtained from previously SCI-injured animals. SCI was performed on other mice 7 days before to perform MSCs cultures. **E.** Histogram of mRNA expression of fat tissue without SCI and fat tissue 7 days after SCI of growth factors, cytokines, chemokines and receptors genes. Dashed lines correspond to mRNA expression from fat tissue without SCI. **F.** Quantification of the percentage of CD105+ MSCs and CD31+ and CD34+ endothelial cells in MSCs cultures without SCI and 7 days after SCI by cytometry analysis. **G.** Histogram of mRNA expression of MSCs H and MSCs I of ECM and signalization, growth factors, and axonal plasticity genes. Dashed lines correspond to mRNA expression from MSCs H cultures. Quantifications are expressed as average \pm SD. N=5 animals per group. Statistical evaluations were based on Kruskal-Wallis tests. * = $P < 0.05$.

Figure S4: MSCs transplantation modules the MEC of the spinal scar without inducing functional recovery. **A-C.** Functional recovery was analyzed using locotronic test 56 days after SCI. Dashed lines correspond to the baseline parameters obtained during locotronic test habituation (7 days before SCI). **A.** Quantification of the number of back legs errors. **B.** Quantification of the total back legs errors time. **C.** Quantification of the total crossing time. Purple dashed lines correspond respectively to the baseline parameters obtained during locotronic tests habituation (7 days before SCI). **D-I.** Histological analyses of the spinal scar were performed 56 days after SCI. **D.** Quantification of PDGFR β + fibrosis area 56 days after SCI. **E.** Quantification of astrocytic negative GFAP- area 56 days after SCI. **F.** Quantification of demyelinated/unmyelinated MBP- area 56 days after SCI. **G-I.** Representative pictures of sagittal spinal cord sections of SCI, SCI-bOECs H and SCI-bOECs I groups 56 days after SCI. Sections were stained with PDGFR β (**G**), GFAP (**H**) and MBP (**I**). Dashed lines correspond to the injury site. Scale bar = 200 μ m. **J.** Sensitive functional recovery was analyzed 56 days after SCI, using Hargreaves test. Dashed lines correspond to the baseline parameters obtained during Hargreaves test habituation (7 days before SCI). **K.** Number of axons sprouts as a function of distance from the lesion core were counted 56 days after SCI. **L.** Axon sprouts co-localized with synaptic stain vGlut1 were counted 56 days after SCI. **M-N** Analysis of laminin expression as a support for axonal growth was performed. Quantification of laminin intensity (**M**) and laminin+ area/ PDGFR β + area ratio (**N**) 56 days after SCI. **O-R** Microglia/macrophage cells reactivity 56 days after SCI. Microglia/macrophage Iba1+ cells density (**P**). Ratio of Iba1+/CD86+ (**Q**) and Iba1+/CD206+ (**R**). Quantifications are expressed as average \pm SD (**A**, **B**, **C**, **J**, **K**, **L**, **Q** and **R**) and average \pm Min/Max (**D**, **E**, **F**, **M**, **N** and **O**). N=8-12 (**A**, **B**, **C**, **D**, **E**, **F**, **G**, **H**, **I**, **J**, **M**, **N**, **O**, **Q** and **R**) and 3-4 (**K** and **L**) animals per group. Statistical evaluations were based on Kruskal-Wallis tests. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$.

Table 1: Table of genes for immunity and inflammatory molecules analyzed by RT-qPCR.

This table lists the genes abbreviation, full name, function and NCBI gene ID of 49 immunity and inflammatory molecules for which gene expression levels were analyzed in this study.

Table 2: Table of genes for axonal growth inhibitory and axonal growth permissive molecules analyzed by RT-qPCR. This table lists the genes abbreviation, full name, function and NCBI gene ID of 84 axon-growth-modulating molecules for which gene expression levels were analyzed in this study (Anderson *et al.*, 2016).

Figure 1:

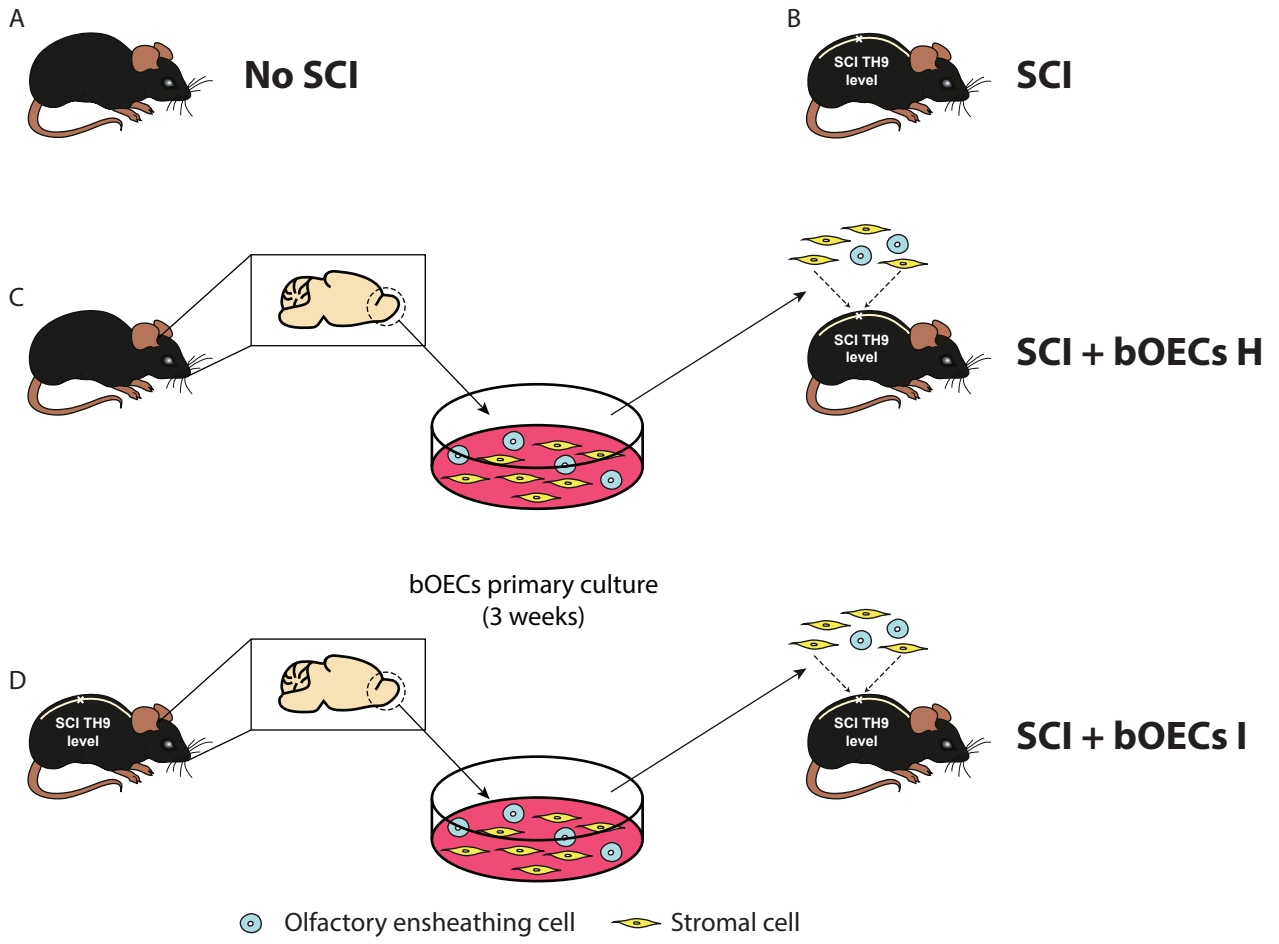
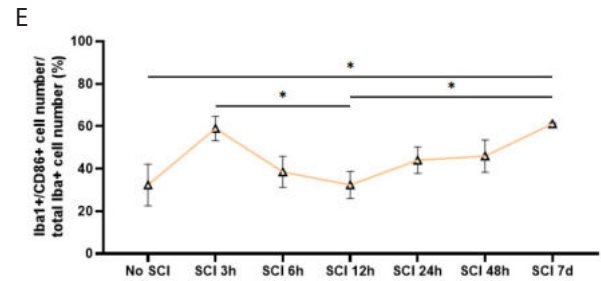
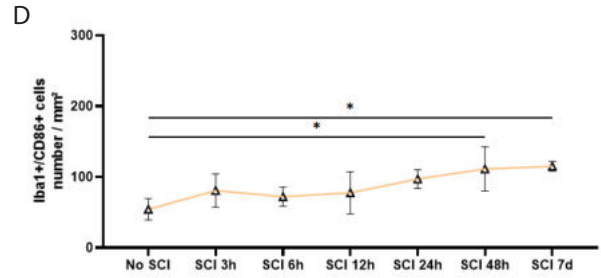
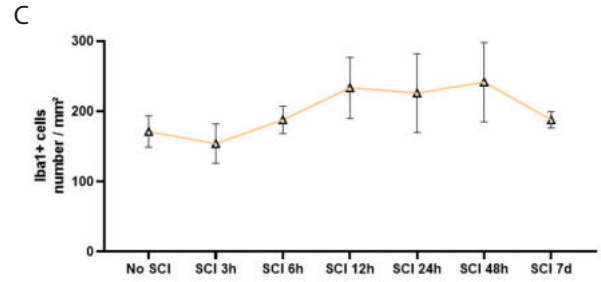
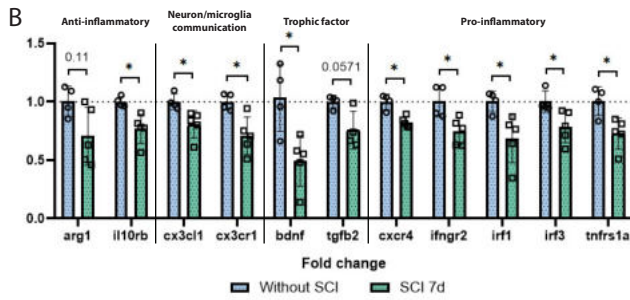
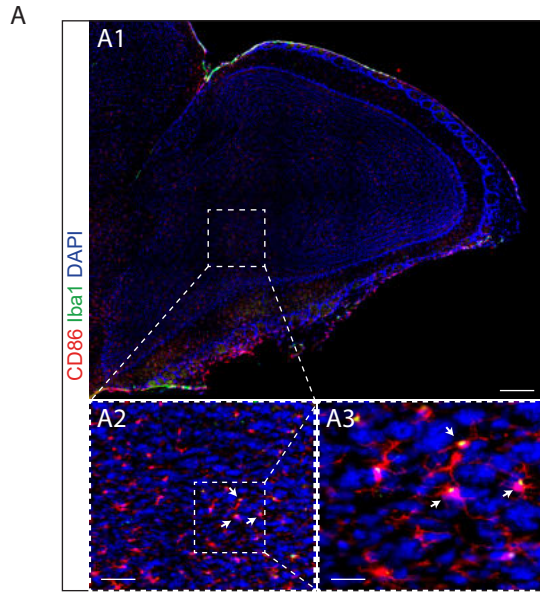


Figure 2:

In vivo



In vitro

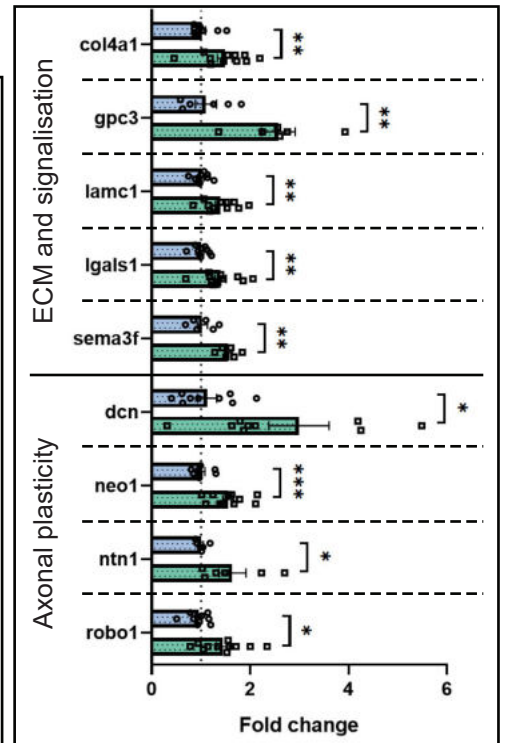
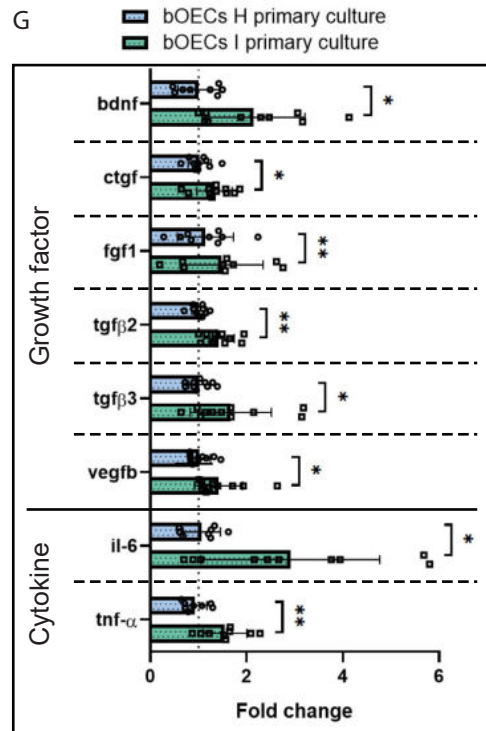
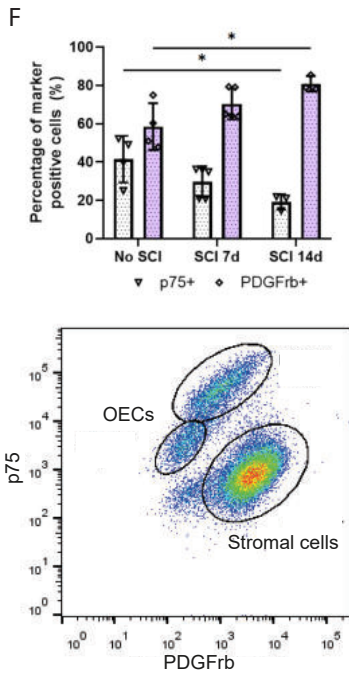


Figure 3:

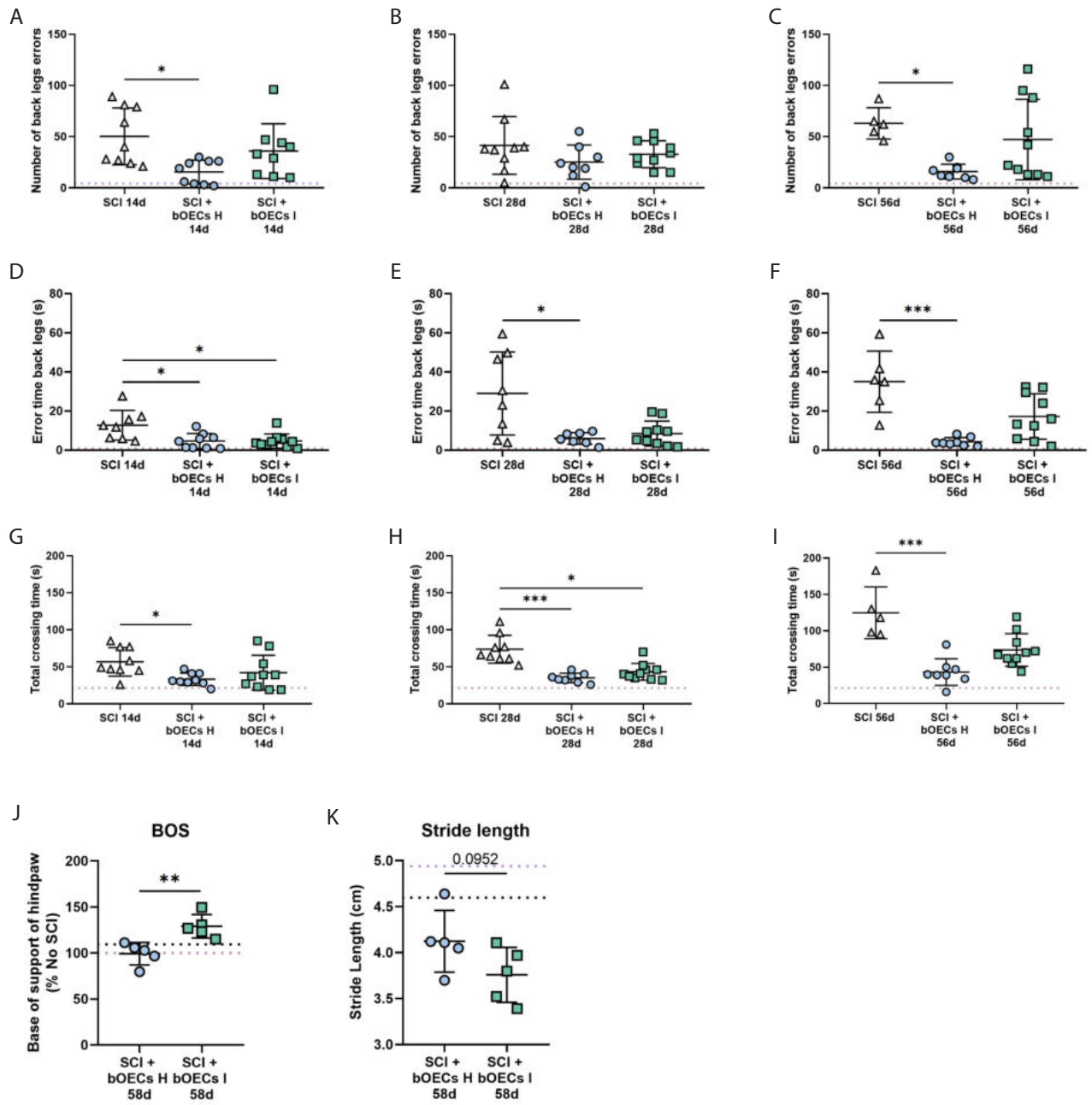


Figure 4:

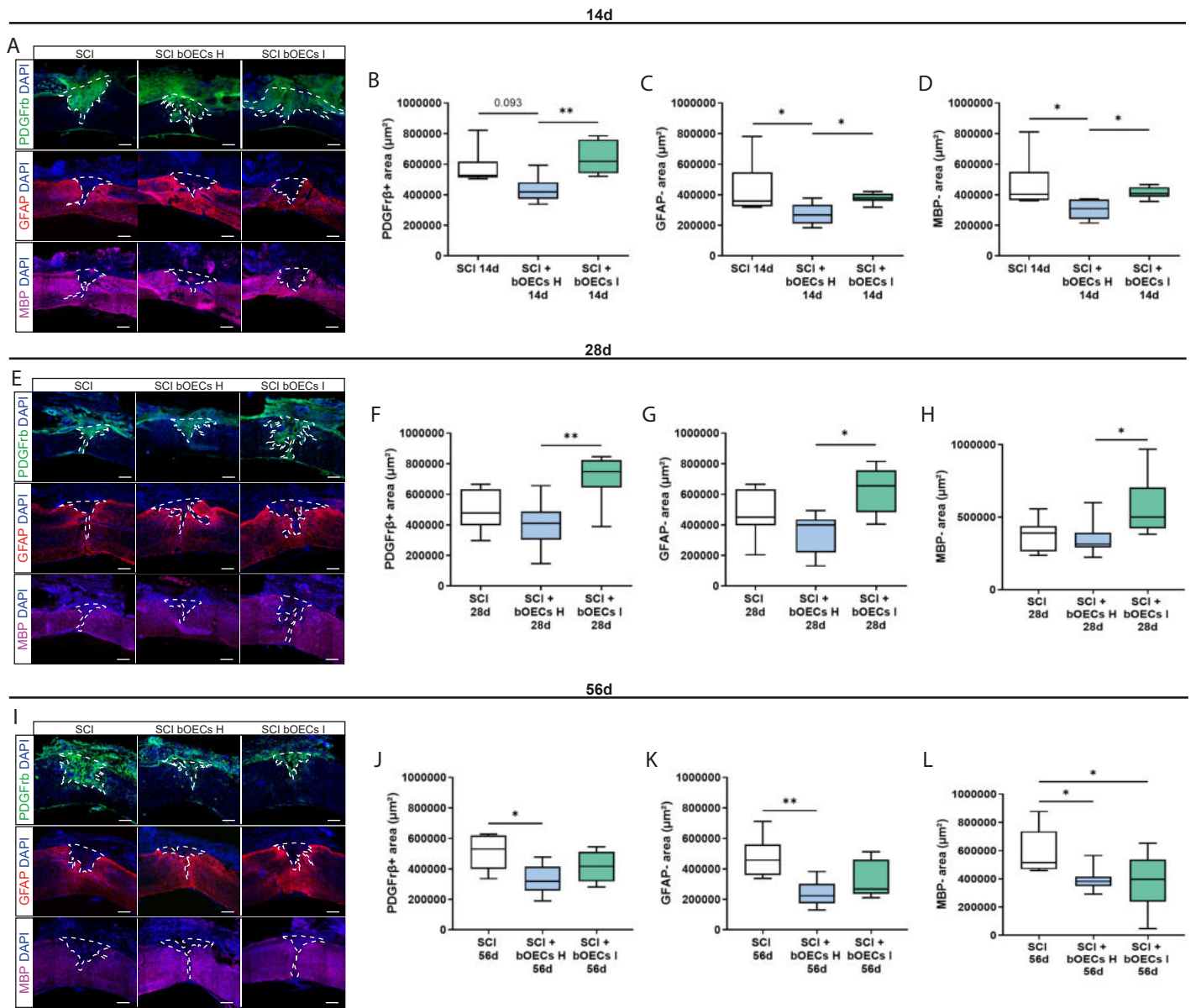


Figure 5:

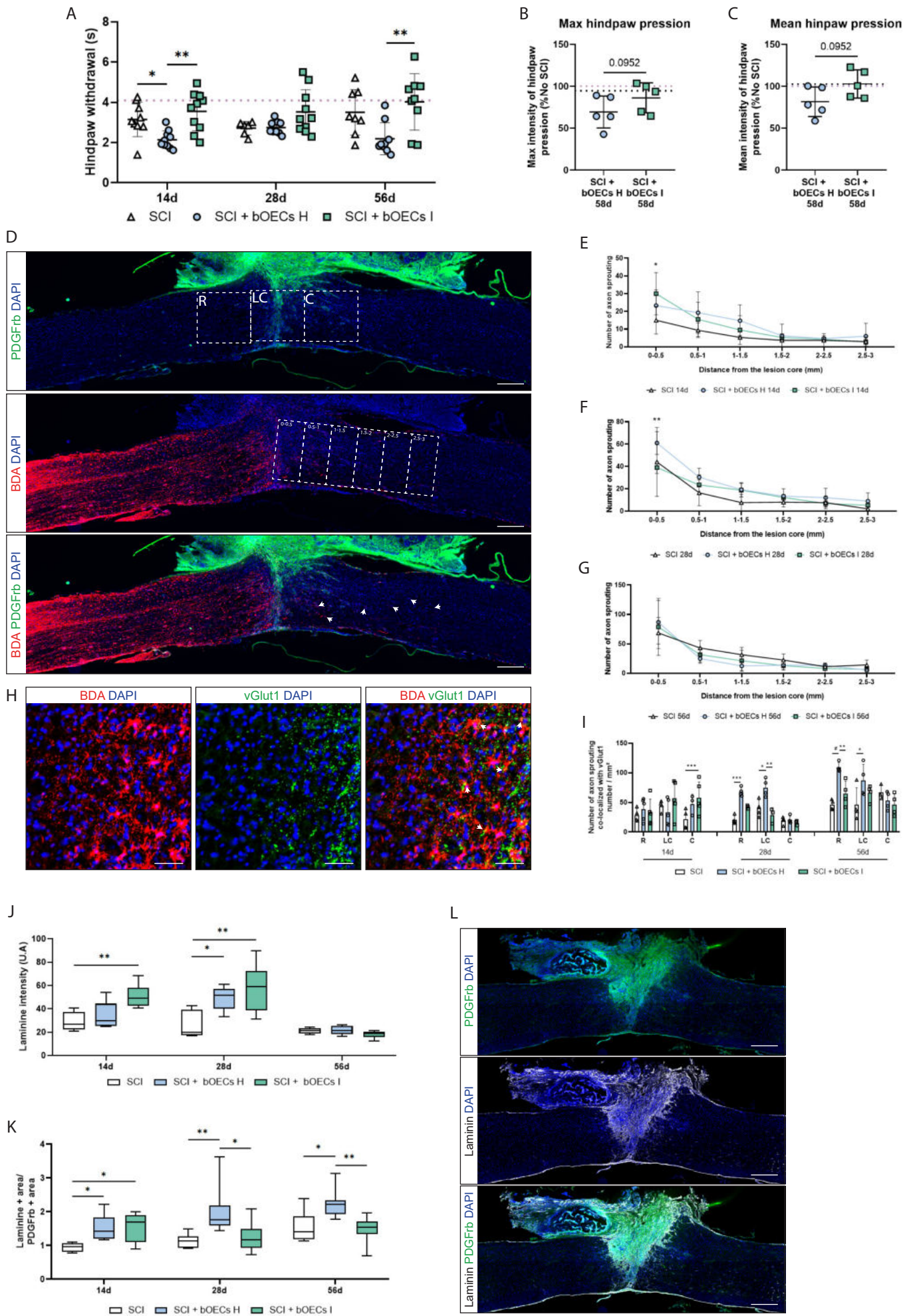


Figure 6:

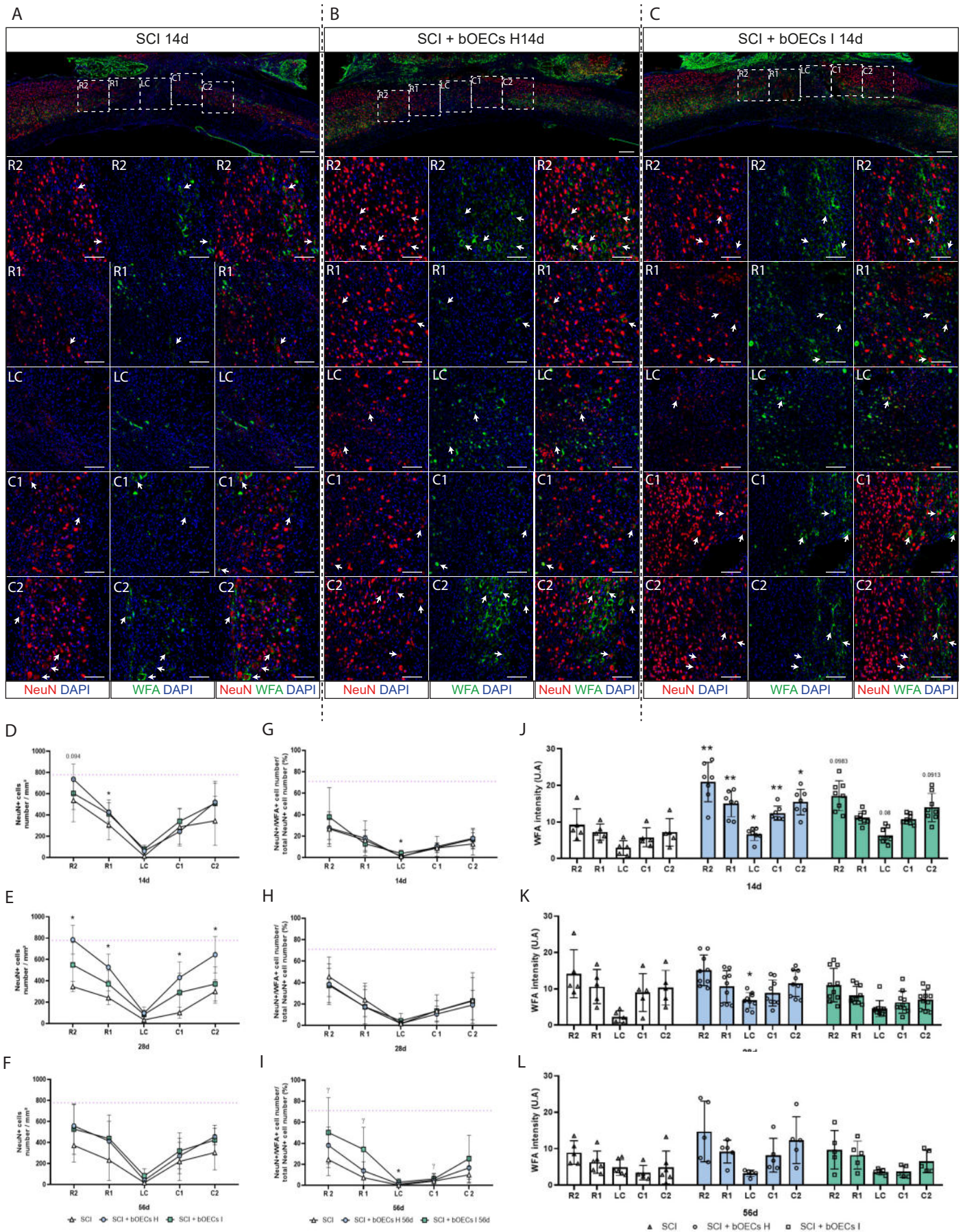


Figure 7:

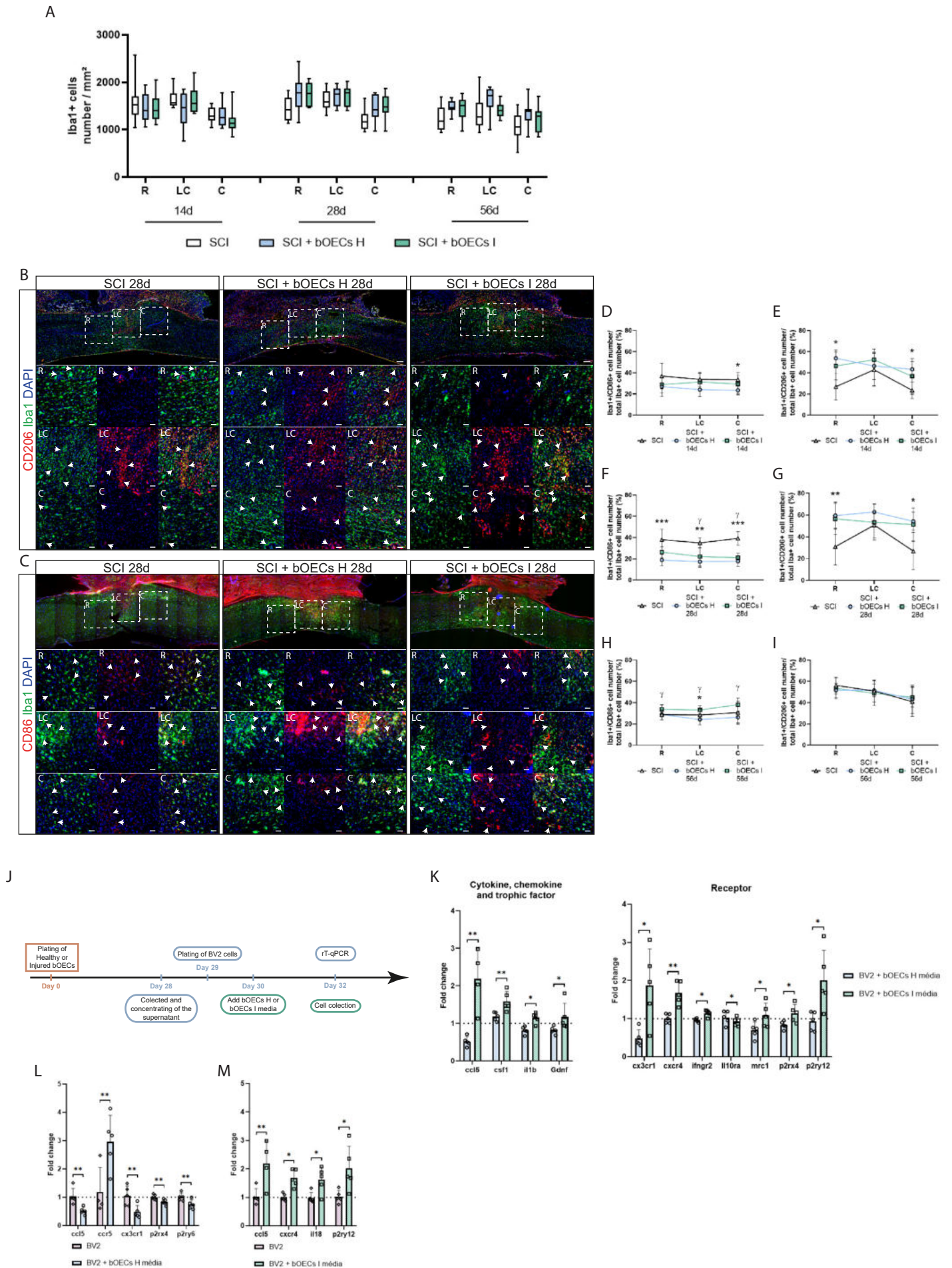


Figure 8:

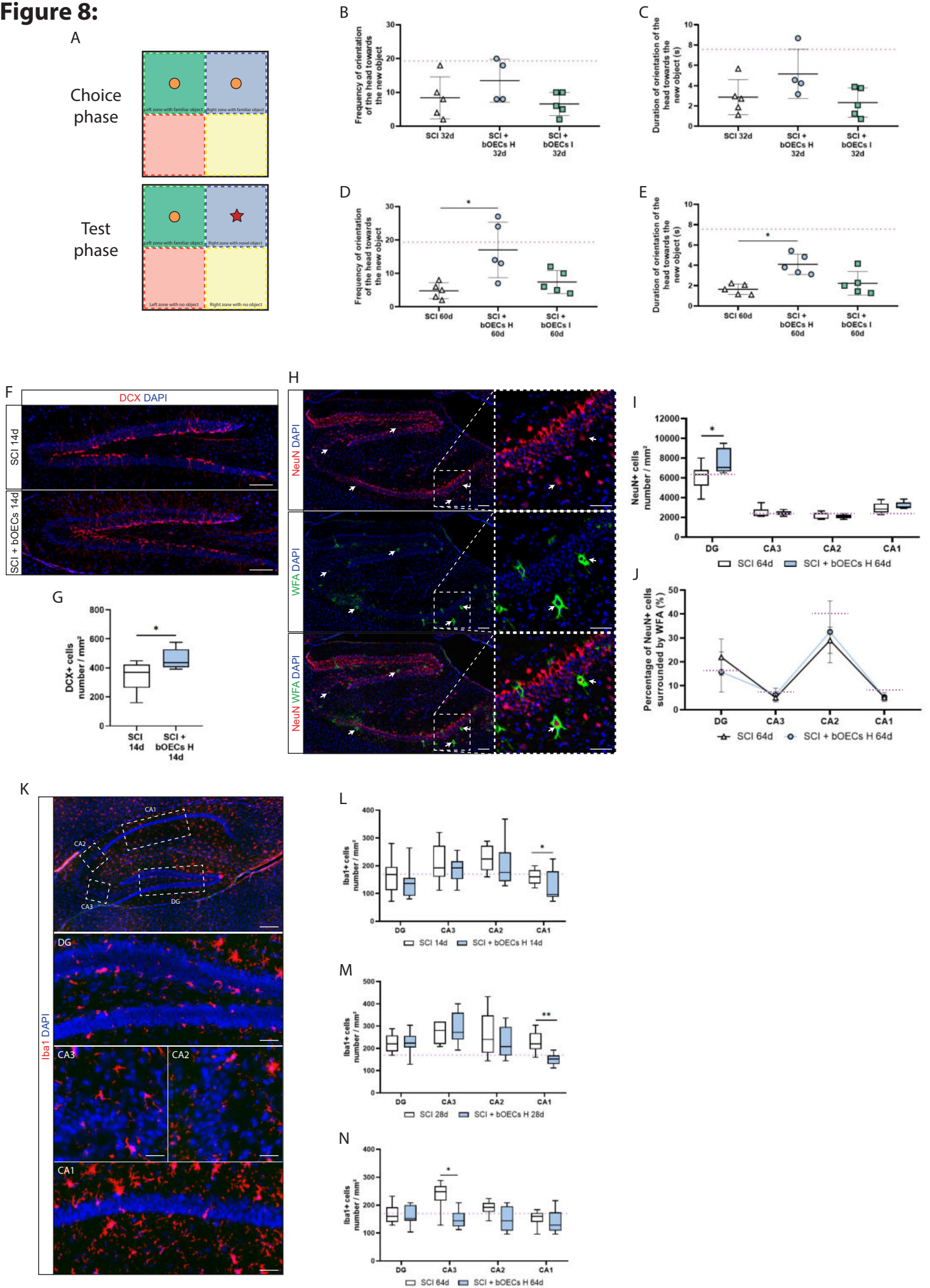
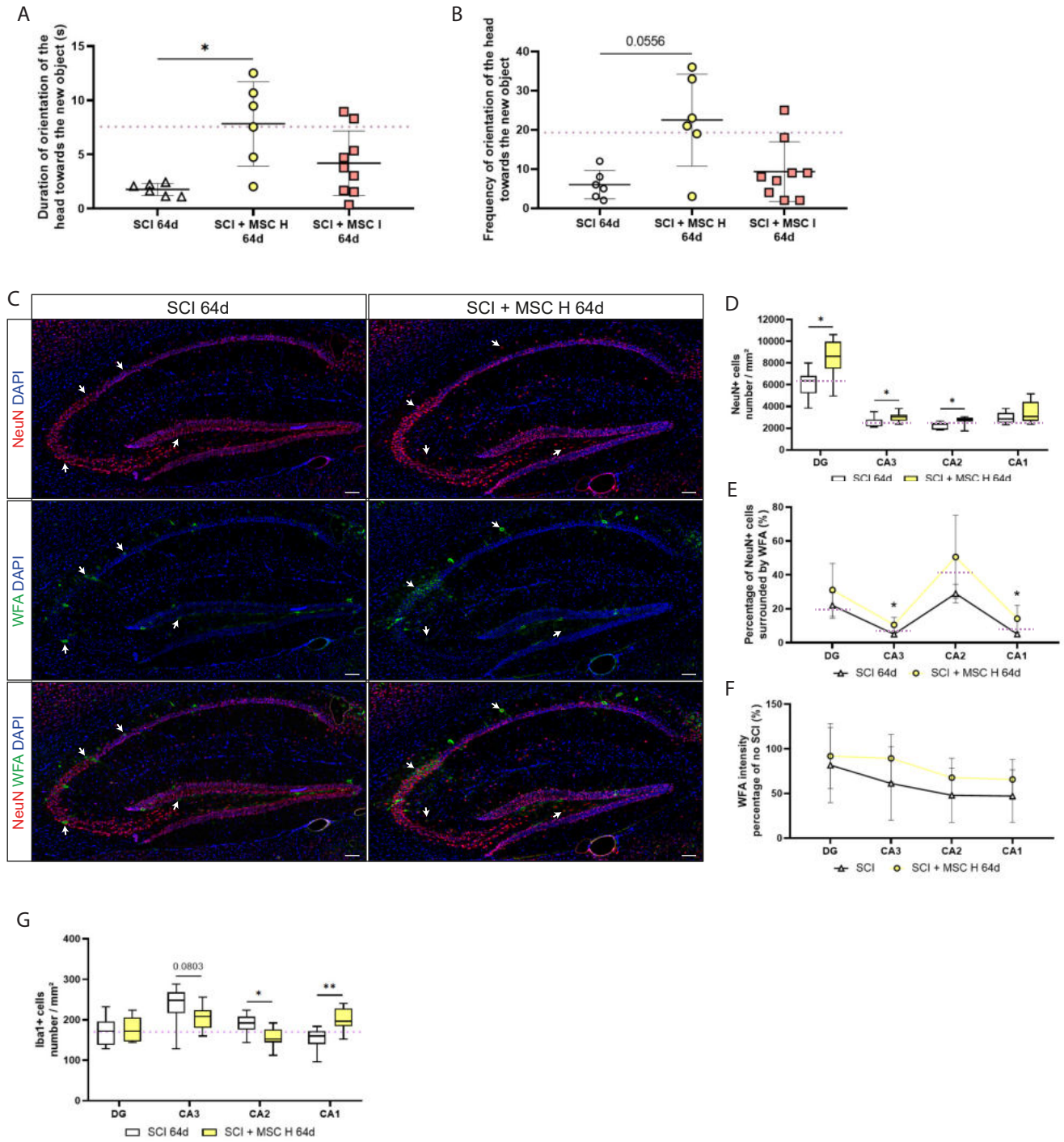
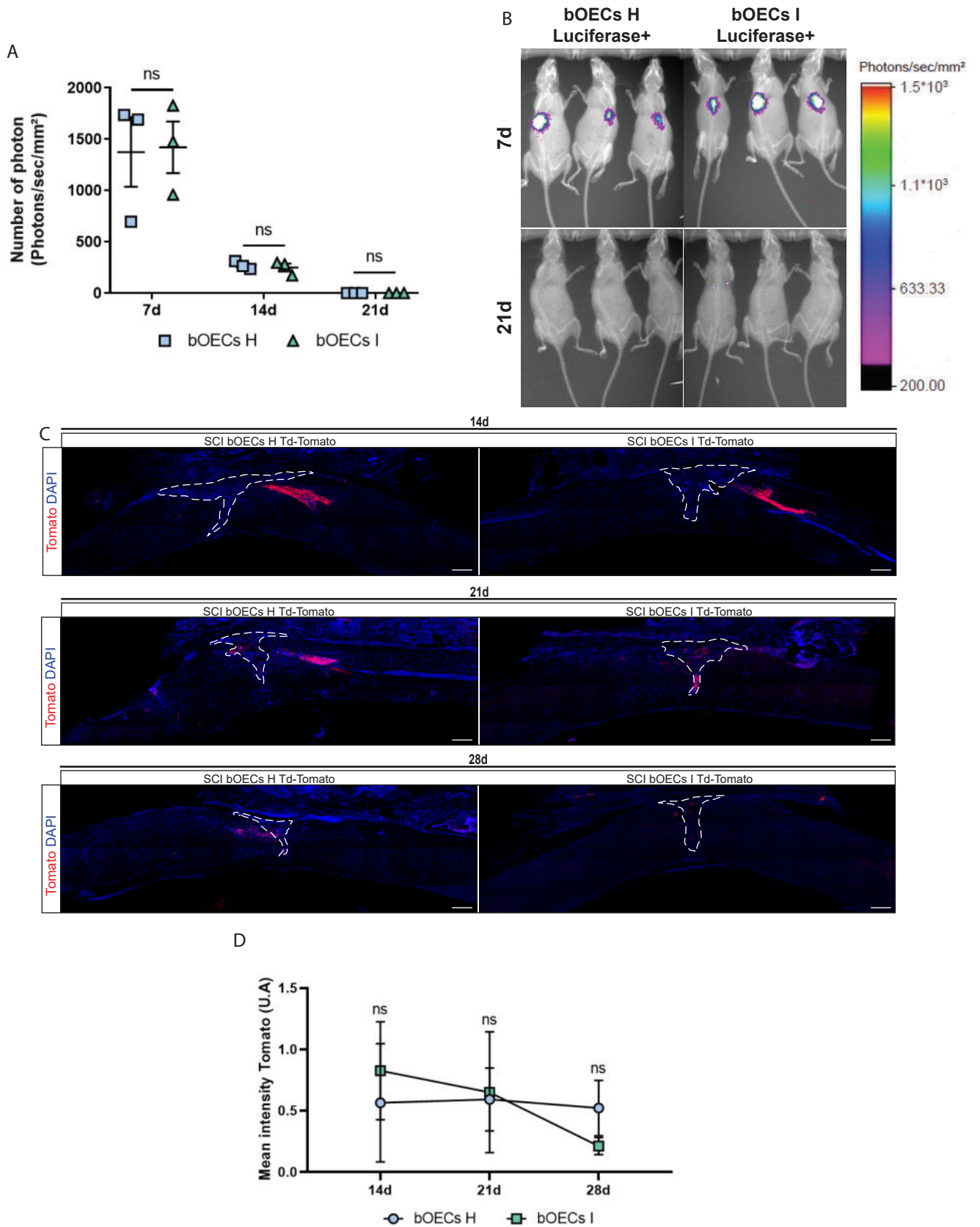


Figure 9:

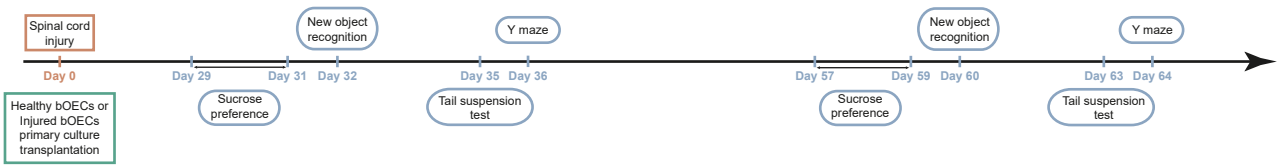


Supplementary 1:

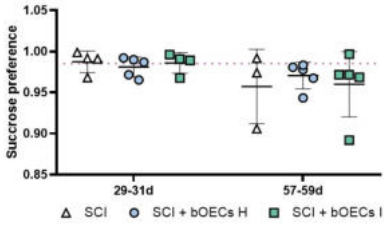


Supplementary 2:

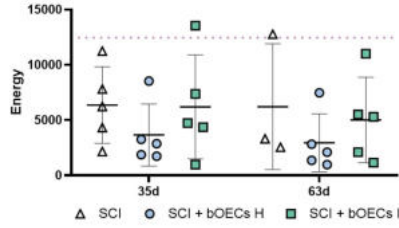
A



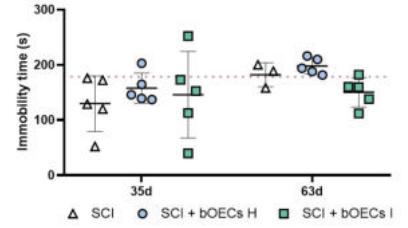
B



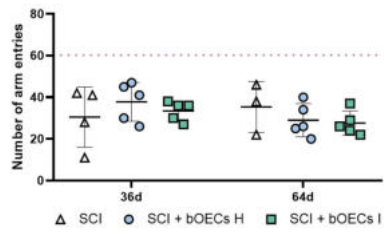
C



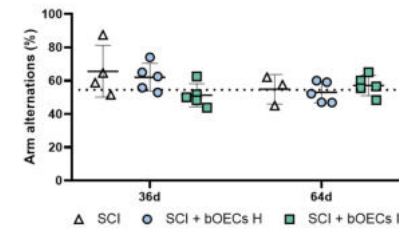
D



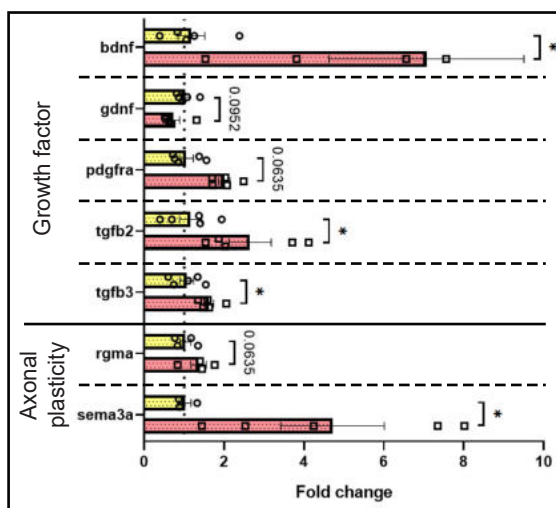
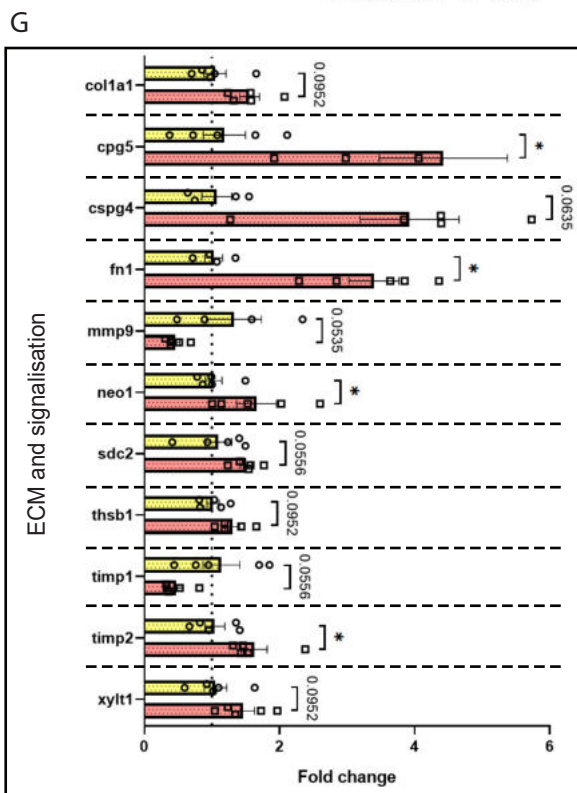
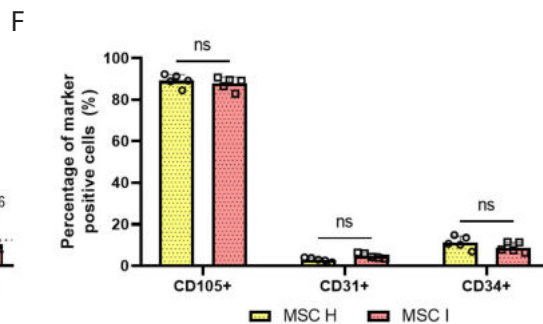
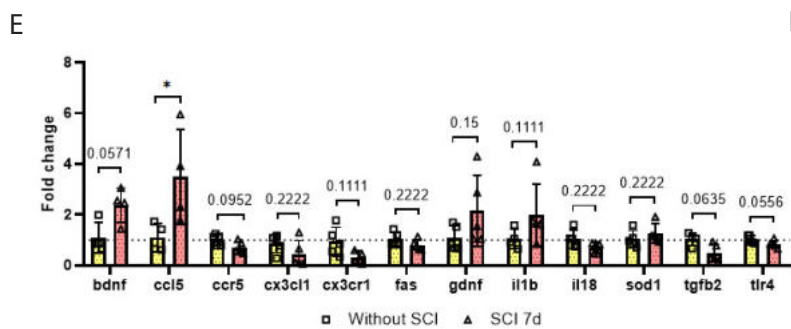
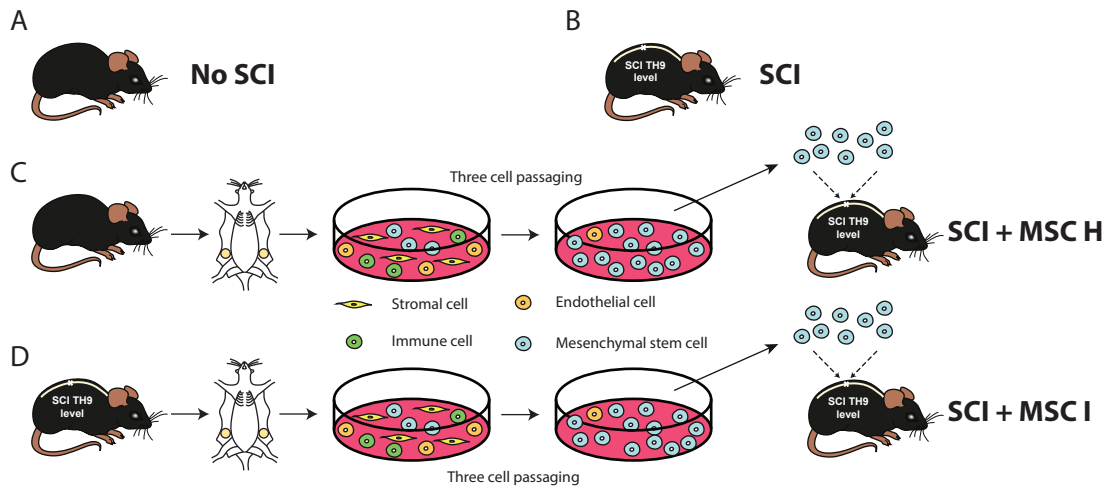
E



F



Supplementary 3:



Supplementary 4:

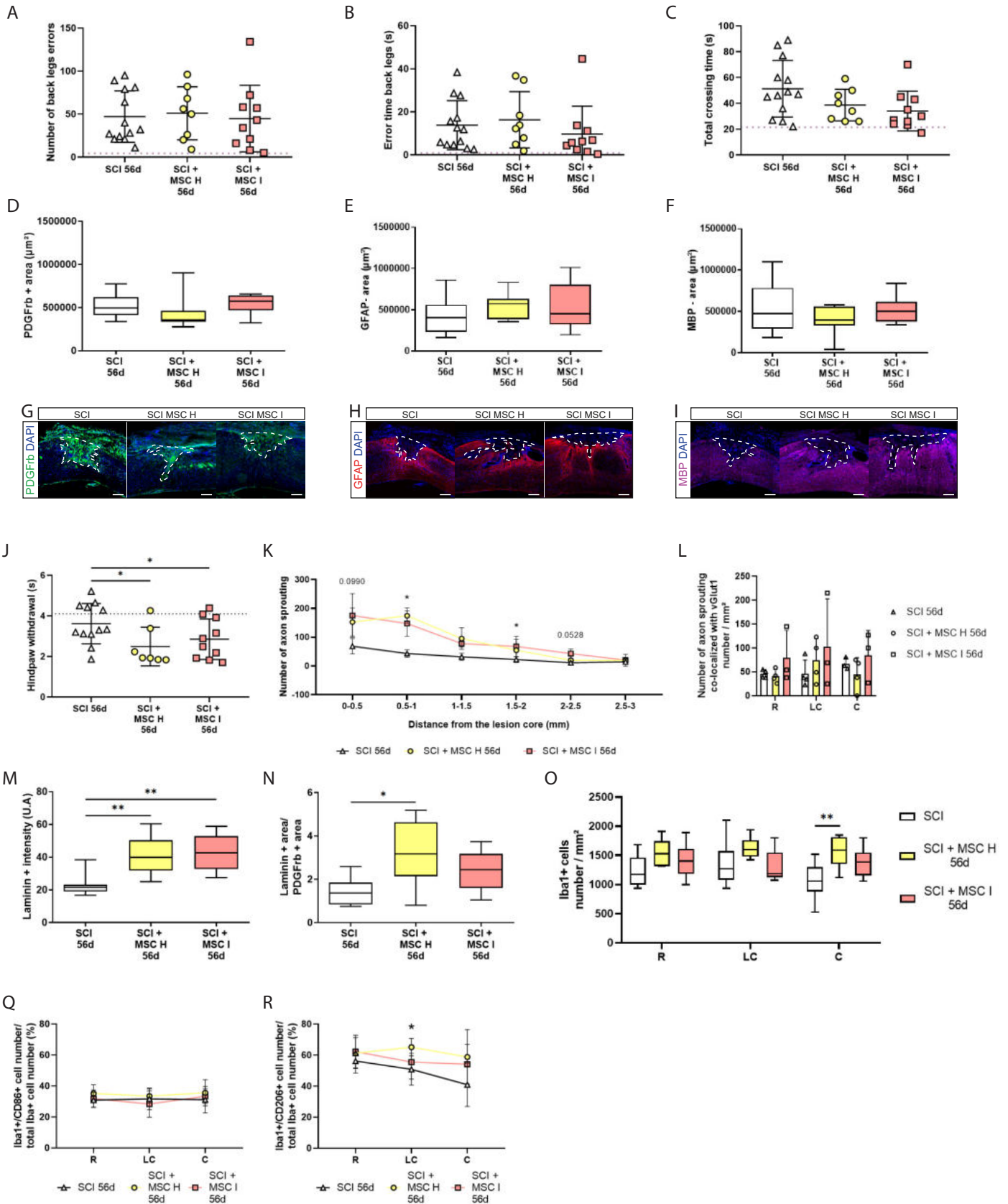


Table 1:

Gene abbreviation	Molecule name	Fonction	NCBI gene ID
<i>Actb</i>	Actin, beta	Housekeeping gene	11461
<i>Arg1</i>	Arginase 1	Metabolic enzyme	11846
<i>B2m</i>	Beta- 2 microglobulin	Housekeeping gene	12010
<i>Bdnf</i>	Brain derived neurotrophic factor	Growth Factor	12064
<i>Ccl5</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 5	Chemokine	20304
<i>Ccr2</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 2	Receptor	12772
<i>Ccr5</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 5	Receptor	12774
<i>Csf1</i>	Colony stimulating factor 1 (macrophage)	Growth Factor	12977
<i>Cx3cl1</i>	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	Chemokine	20312
<i>Cx3cr1</i>	Chemokine (C-X3-C) receptor 1	Chemokine	13051
<i>Cxcl12</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	Chemokine	20315
<i>Cxcr3</i>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3	Receptor	12766
<i>Cxcr4</i>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	Receptor	12767
<i>Fas</i>	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	Receptor	14102
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Housekeeping gene	14433
<i>Gdnf</i>	Glial cell line derived neurotrophic factor	Growth Factor	14573
<i>Ifng</i>	Interferon gamma	Cytokine	15978
<i>Ifngr1</i>	Interferon gamma receptor 1	Receptor	15979
<i>Ifngr2</i>	Interferon gamma receptor 2	Receptor	15980
<i>Igf1</i>	Insulin-like growth factor 1	Growth Factor	16000
<i>Il10ra</i>	Interleukin 10 receptor, alpha	Receptor	16154
<i>Il10rb</i>	Interleukin 10 receptor, beta	Receptor	16155
<i>Il18</i>	Interleukin 18	Cytokine	16173
<i>Il1a</i>	Interleukin 1 alpha	Cytokine	16175
<i>Il1b</i>	Interleukin 1 beta	Cytokine	16176
<i>Il6ra</i>	Interleukin 6 receptor, alpha	Receptor	16194
<i>Irf1</i>	Interferon regulatory factor 1	Transcriptional Regulator	16362
<i>Irf3</i>	Interferon regulatory factor 3	Transcriptional Regulator	54131
<i>Irf9</i>	Interferon regulatory factor 9	Transcriptional Regulator	16391
<i>Mrc1</i>	Mannose receptor, C type 1	Receptor	17533
<i>Myd88</i>	Myeloid differentiation primary response	Transcriptional Regulator	17874
<i>Nfkb1</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	Transcriptional Regulator	18033
<i>Nos2</i>	Nitric oxide synthase 2, inducible	Metabolic enzyme	18126
<i>P2rx4</i>	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel 4	Receptor	18438
<i>P2rx7</i>	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel 7	Receptor	18439
<i>P2ry12</i>	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 12	Receptor	70839
<i>P2ry6</i>	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 6	Receptor	233571
<i>Sod1</i>	Superoxide dismutase 1, soluble	Transcriptional Regulator	20655
<i>Tgfb1</i>	Transforming growth factor, beta 1	Cytokine	21803
<i>Tgfb2</i>	Transforming growth factor, beta 2	Cytokine	21808
<i>Tgfb1</i>	Transforming growth factor, beta receptor I	Receptor	21812
<i>Tlr4</i>	Toll-like receptor 4	Receptor	21898
<i>Tlr9</i>	Toll-like receptor 9	Receptor	81897
<i>Tnf</i>	Tumor necrosis factor	Cytokine	21926
<i>Tnfrsf1a</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	Receptor	21937
<i>Tnfrsf1b</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	Receptor	21938
<i>Trem2</i>	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2	Receptor	83433
<i>Vegfa</i>	Vascular endothelial growth factor A	Growth Factor	22339
<i>Vegfb</i>	Vascular endothelial growth factor B	Growth Factor	22340

Table 2:

Gene abbreviation	Molecule name	Fonction	NCBI gene ID
<i>Acan</i>	Aggrecan	ECM & Adhesion	11595
<i>Actb</i>	Actin beta	Housekeeping genes	11461
<i>Adam10</i>	ADAM metalloproteinase domain 10	ECM & Adhesion	11487
<i>Bcan</i>	Brevican	ECM & Adhesion	12032
<i>Bdnf</i>	Brain derived neurotrophic factor	Growth Factor	12064
<i>B2m</i>	Beta-2-microglobulin	Housekeeping gene	12010
<i>Ccl2</i>	C-C Motif Chemokine Ligand 2	Immunomodulatory	20296
<i>Cntf</i>	Ciliary Neurotrophic Factor	Axonal and synaptic plasticity	12803
<i>Col1a1</i>	Collagen type I alpha 1 chain	ECM & Adhesion	12842
<i>Col3a1</i>	Collagen type III alpha 1 chain	ECM & Adhesion	12825
<i>Col4a1</i>	Collagen type IV alpha 1 chain	ECM & Adhesion	12826
<i>Cspg4</i>	Chondroitin sulfate proteoglycan NG2	ECM & Adhesion	121021
<i>Cspg5</i>	Neuroglycan C	ECM & Adhesion	29873
<i>Ctgf</i>	Connective tissue growth factor	Growth Factor	14219
<i>Dcc</i>	DCC netrin 1 receptor	Axonal and synaptic plasticity	13176
<i>Dcn</i>	Decorin	ECM & Adhesion	13179
<i>Efnb3</i>	Ephrin B3	Axonal and synaptic plasticity	13643
<i>Eg-vegf</i>	Prokineticin 1	Growth Factor	246691
<i>Epha4</i>	EPH receptor A4	Axonal and synaptic plasticity	13838
<i>Ephb2</i>	EPH receptor B2	ECM & Adhesion	13844
<i>Flt1</i>	Fms related tyrosine kinase 1	Growth Factor	14254
<i>Flt4</i>	Fms related tyrosine kinase 4	Growth Factor	14257
<i>Fn1</i>	Fibronectin 1	ECM & Adhesion	14268
<i>Fgf1</i>	Fibroblast growth factor 1	Growth Factor	14164
<i>Fgf2</i>	Fibroblast growth factor 2	Growth Factor	14173
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Housekeeping gene	14433
<i>Gdnf</i>	Glial derived neurotrophic factor	Growth Factor	14573
<i>Gpc1</i>	Glypican 1	ECM & Adhesion	14733
<i>Gpc3</i>	Glypican 3	ECM & Adhesion	14734
<i>Gpc5</i>	Glypican 5	ECM & Adhesion	103978
<i>Gusb</i>	Glucuronidase beta	Housekeeping gene	110006
<i>Hsp90ab1</i>	Heat shock protein 90 alpha class B member 1	Housekeeping gene	15516
<i>Ifng</i>	Interferon gamma	Immunomodulatory	15978
<i>Igf1</i>	Insulin like growth factor 1	Growth Factor	16000
<i>Il1b</i>	Interleukine 1 beta	Immunomodulatory	16176
<i>Il6</i>	Interleukine 6	Immunomodulatory	16193
<i>Kdr</i>	Kinase insert domain receptor	Growth Factor	16542
<i>Lamc1</i>	Laminin C 1	ECM & Adhesion	226519
<i>Lglas1</i>	Galectin 1	ECM & Adhesion	16852
<i>Matn2</i>	Matrilin 2	ECM & Adhesion	17181
<i>Mcam</i>	Melanoma cell adhesion molecule	ECM & Adhesion	84004
<i>Mmp2</i>	Matrix metalloproteinase 2	ECM & Adhesion	17390
<i>Mmp9</i>	Matrix metalloproteinase 9	ECM & Adhesion	17395
<i>Met</i>	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	Growth Factor	17295
<i>Ncam1</i>	Neural cell adhesion molecule 1	ECM & Adhesion	17967
<i>Ncan</i>	Neurocan	ECM & Adhesion	13004
<i>Neo1</i>	Neogenin 1	ECM & Adhesion	18007
<i>Ntf3</i>	Neurotrophin 3	Growth Factor	18205
<i>Nrp1</i>	Neuropilin 1	Axonal and synaptic plasticity	18186
<i>Ntn1</i>	Netrin 1	Axonal and synaptic plasticity	18208
<i>Pdgfa</i>	Platelet derived growth factor subunit a	Growth Factor	18590
<i>Pgf</i>	Pacental growth factor	Growth Factor	18654
<i>Plxna1</i>	Plexin A1	Axonal and synaptic plasticity	18844
<i>Plxnb1</i>	Plexin B1	Axonal and synaptic plasticity	235611
<i>Rgma</i>	Repulsive guidance molecule BMP co-receptor A	Axonal and synaptic plasticity	244058
<i>Rgmb</i>	Repulsive guidance molecule BMP co-receptor B	Axonal and synaptic plasticity	68799
<i>Robo1</i>	Roundabout guidance receptor 1	Axonal and synaptic plasticity	19876
<i>Robo2</i>	Roundabout guidance receptor 2	Axonal and synaptic plasticity	268902
<i>Sdc1</i>	Syndecan 1	ECM & Adhesion	20969
<i>Sdc2</i>	Syndecan 2	ECM & Adhesion	15529
<i>Sdc3</i>	Syndecan 3	ECM & Adhesion	20970
<i>Sdc4</i>	Syndecan 4	ECM & Adhesion	20971
<i>Sema3a</i>	Semaphorin 3A	Axonal and synaptic plasticity	20346
<i>Sema3f</i>	Semaphorin 3F	Axonal and synaptic plasticity	20350
<i>Serpinf1</i>	Serpin family F member 1	ECM & Adhesion	20317
<i>Slit1</i>	Slit guidance ligand 1	Axonal and synaptic plasticity	20562
<i>Slitrk1</i>	SLIT and NTRK like family member 1	Axonal and synaptic plasticity	76965
<i>Tek</i>	TEK receptor tyrosine kinase	Growth Factor	21687
<i>Tgfa</i>	Transforming growth factor alpha	Growth Factor	21802
<i>Tgfb1</i>	Transforming growth factor beta 1	Growth Factor	21803
<i>Tgfb2</i>	Transforming growth factor beta 2	Growth Factor	21808
<i>Tgfb3</i>	Transforming growth factor beta 3	Growth Factor	21809
<i>Thbs1</i>	Thrombospondin 1	ECM & Adhesion	21825
<i>Thbs2</i>	Thrombospondin 2	ECM & Adhesion	21826
<i>Timp1</i>	Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases 1	ECM & Adhesion	21857
<i>Timp2</i>	Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases 2	ECM & Adhesion	21858
<i>Tnc</i>	Tenascin C	Axonal and synaptic plasticity	21923
<i>Tnf</i>	Tumoral necrosis factor	Immunomodulatory	21926
<i>Tnr</i>	Tenascin R	Axonal and synaptic plasticity	21960
<i>Vcan</i>	Versican	ECM & Adhesion	13003
<i>Vegfa</i>	Vascular endothelial growth factor A	Growth Factor	22339
<i>Vegfb</i>	Vascular endothelial growth factor B	Growth Factor	22340
<i>Ve-cad</i>	Vascular endothelial cadherin	ECM & Adhesion	12562
<i>Xylt1</i>	Xylosyltransferase 1	ECM & Adhesion	233781

Article III

Repetitive Trans Spinal Magnetic Stimulation Improves Functional Recovery and Tissue Repair in Contusive and Penetrating Spinal Cord Injury Models in Rats

Robac A*, Neveu P*, Hugede A, Garrido E, Nicol L, Delarue Q, Guérout N.

Biomedicine. 2021 dec 3. DOI: 10.3390/biomedicines9121827.

*: equal contribution

Introduction article III

L'une des grandes différences entre les modèles de LMTs chez la souris et le rat, est la formation de cavités imperméables à la croissance axonale chez le rat. Les cavités sont initialement des cicatrices fibrotiques formées lors de la phase aiguë de la physiopathologie, se « décellularisant » progressivement, laissant place à une cavité dépourvue de cellules et entourée d'une cicatrice fibrotique. On observe la formation de cavités après une LMT chez l'Homme, c'est pour cela que cette étude a eu comme objectif de déterminer si la rTSMS apportait le même effet bénéfique observé chez la souris, dans un modèle dont la physiopathologie est plus proche de celle observée chez l'Homme. De plus, elle s'est aussi intéressée à étudier les effets de la rTSMS dans un modèle de lésion médullaire par contusion, représentant l'une des étiologies cliniques les plus importantes des cas de LMTs.

Dans cette étude, un modèle de LMT par transection en utilisant une aiguille rompant la moelle spinale et un modèle de LMT par contusion réalisé à l'aide d'un impacteur compressant la moelle spinale, ont été utilisés. Chacun des groupes ainsi que leur groupe contrôle, n'ayant subi seulement qu'une transection ou une contusion, ont réalisé des tests sensori-moteurs 15 et 60 jours après la lésion. La régénération médullaire a été étudiée en s'intéressant à la cicatrice médullaire et aux cavités, à la survie neuronale, à la myélinisation des axones et à l'activation des cellules microgliales/macrophages. L'analyse des cavités par immunohistochimie a été complétée par l'utilisation de l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Cette technique a permis la quantification de la taille et de l'évolution des cavités 7, 21 et 42 jours après la lésion.

Ce travail a fait l'objet d'une publication en 2021, « *Repetitive Trans Spinal Magnetic Stimulation Improves Functional Recovery and Tissue Repair in Contusive and Penetrating Spinal Cord Injury Models in Rats* », dans le journal *Biomedicine* dans laquelle je suis co-auteur.



Article

Repetitive Trans Spinal Magnetic Stimulation Improves Functional Recovery and Tissue Repair in Contusive and Penetrating Spinal Cord Injury Models in Rats

Amandine Robac^{1,†}, Pauline Neveu^{1,†} , Alizée Hugede¹, Elisabeth Garrido^{1,2}, Lionel Nicol³ , Quentin Delarue¹ and Nicolas Guérout^{1,*}

- ¹ EA3830 GRHV, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Normandy University, UNIROUEN, 76000 Rouen, France; amandine.robac1@univ-rouen.fr (A.R.); pauline.neveu2@gmail.com (P.N.); hugede.alizee@gmail.com (A.H.); elisabethgarrido66@gmail.com (E.G.); quentin.delarue@univ-rouen.fr (Q.D.)
- ² Department of Neurosurgery, Rouen University Hospital, 1 Rue de Germont, 76000 Rouen, France
- ³ Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Normandy University, UNIROUEN, Inserm U1096, 76000 Rouen, France; lionel.nicol@univ-rouen.fr
- * Correspondence: nicolas.guerout@univ-rouen.fr; Tel.: +33-6-22-71-72-17
- † Contributed equally to this work.



Citation: Robac, A.; Neveu, P.; Hugede, A.; Garrido, E.; Nicol, L.; Delarue, Q.; Guérout, N. Repetitive Trans Spinal Magnetic Stimulation Improves Functional Recovery and Tissue Repair in Contusive and Penetrating Spinal Cord Injury Models in Rats. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1827. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121827>

Academic Editor: Petr Krupa

Received: 9 November 2021

Accepted: 1 December 2021

Published: 3 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Spinal cord injury (SCI) is an incurable condition in which the brain is disconnected partially or completely from the periphery. Mainly, SCIs are traumatic and are due to traffic, domestic or sport accidents. To date, SCIs are incurable and, most of the time, leave the patients with a permanent loss of sensitive and motor functions. Therefore, for several decades, researchers have tried to develop treatments to cure SCI. Among them, recently, our lab has demonstrated that, in mice, repetitive trans-spinal magnetic stimulation (rTSMS) can, after SCI, modulate the lesion scar and can induce functional locomotor recovery non-invasively. These results are promising; however, before we can translate them to humans, it is important to reproduce them in a more clinically relevant model. Indeed, SCIs do not lead to the same cellular events in mice and humans. In particular, SCIs in humans induce the formation of cystic cavities. That is why we propose here to validate the effects of rTSMS in a rat animal model in which SCI leads to the formation of cystic cavities after penetrating and contusive SCI. To do so, several techniques, including immunohistochemical, behavioral and MRI, were performed. Our results demonstrate that rTSMS, in both SCI models, modulates the lesion scar by decreasing the formation of cystic cavities and by improving axonal survival. Moreover, rTSMS, in both models, enhances functional locomotor recovery. Altogether, our study describes that rTSMS exerts positive effects after SCI in rats. This study is a further step towards the use of this treatment in humans.

Keywords: rehabilitation; spinal cord injury; glial scar; magnetic stimulation; cystic cavities and functional recovery

1. Introduction

Spinal cord injury (SCI) is a debilitating condition which can lead to a permanent loss of motor and sensitive functions. To date, there is no curative treatment which can be proposed to injured patients. That is why fundamental and preclinical studies have been conducted over the last several decades to find innovative therapies [1]. Research studies have followed different paths; the first one tried to modulate the inhibitory microenvironment present after SCI, and the second one harnessed to replace the lost cells, such as neurons or oligodendrocytes [2]. These two strategies are based on the knowledge acquired about the cellular and molecular events that take place after SCI. Indeed, at the cellular level, SCI induces a massive inflammation with the infiltration of circulating immune cells, such as macrophages, and induction of microglia reactivity [3]. At the same time, the initial

traumatic injury leads to neuronal and oligodendroglial death [2,4]. Altogether, these cellular events lead to the formation of a spinal scar composed of a fibrotic core that is present in the lesion epicenter and of an astroglial scar located at the border of the lesion [5–7]. This spinal scar exerts complementary and opposite effects. In fact, it segregates the inflammatory cells to avoid the expansion of the lesion, but it also inhibits axonal regrowth. In effect, the spinal scar secretes a wide range of extracellular matrix molecules, including chondroitin sulfate proteoglycan, a class of molecules known as one of the major inhibitory components of the lesion scar [8]. To alleviate this inhibitory microenvironment, we and other research groups have assessed the effects of different therapies, such as cellular transplantation, biomaterials' graft or more recently repetitive magnetic stimulation [9–13]. To do so, rodent models have been massively used, mainly mice and rats. However, it is important to note that the cellular events and also the composition of the spinal scar that take place after SCIs are distinct between mice and rats but also with humans. In effect, in rats and humans, the fibrotic core present at the lesion epicenter of the spinal scar in mice is replaced progressively by cystic cavities within weeks to months after SCI [14]. That is why it can be of primary importance, before we translate an innovative therapy to clinical practice in humans, to validate it in mice and also in rats. In a clinically related perspective, it is also important to mimic the lesion which occurs in humans. Indeed, in humans, SCIs are mainly due to contusive injury, whereas, in preclinical models, SCIs are often penetrating, because this model is reproducible and does not require specific apparatuses [15].

Recently, our research group reported that repetitive trans-spinal magnetic stimulation (rTSMS) can be used as a non-invasive treatment after SCI. Our study demonstrates that rTSMS modulates the spinal scar and enhances axonal regrowth and locomotor recoveries [9,16,17]. These experiments were conducted in a mouse model, and SCI was performed by complete transection. That is why we propose to validate this promising therapy in a rat model. Our work was conducted in both penetrating and contusive SCI in a large cohort of 104 rats.

2. Materials and Methods

2.1. Animal Care and Use Statement

The protocols were designed to minimize pain or discomfort to the 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; 18 December 1986), French Decree no. 97/748 of 19 October 1987 (Journal Officiel de la République Française; 20 October 1987), and the recommendations of the Cenomexa ethics committee (#23767).

Experiments were performed on adult Sprague Dawley female rats (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) at eight–ten weeks of age (average weight 260–280 g).

Female rats were housed (two rats/cage) in secure conventional rodent facilities on a 12-h light/dark cycle, with constant access to food and water.

Our two procedures were composed of two main experimental groups:

SCI control group: animals received SCI.

SCI + STM group: animals received SCI and rTSMS treatment during 15 days.

For the two procedures, histological analyses were performed at 15 and 60 days after SCI. Functional analyses, including plantar and locotronic tests, were performed at 15, 30 and 60 days after SCI.

For the second procedure only (contusive SCI), MRI experiments were performed at 7, 21 and 42 days after SCI.

A total of 104 rats were included in the entire study (Procedure 1 and Procedure 2).

A general overview of these experiments is presented in Figure 1.

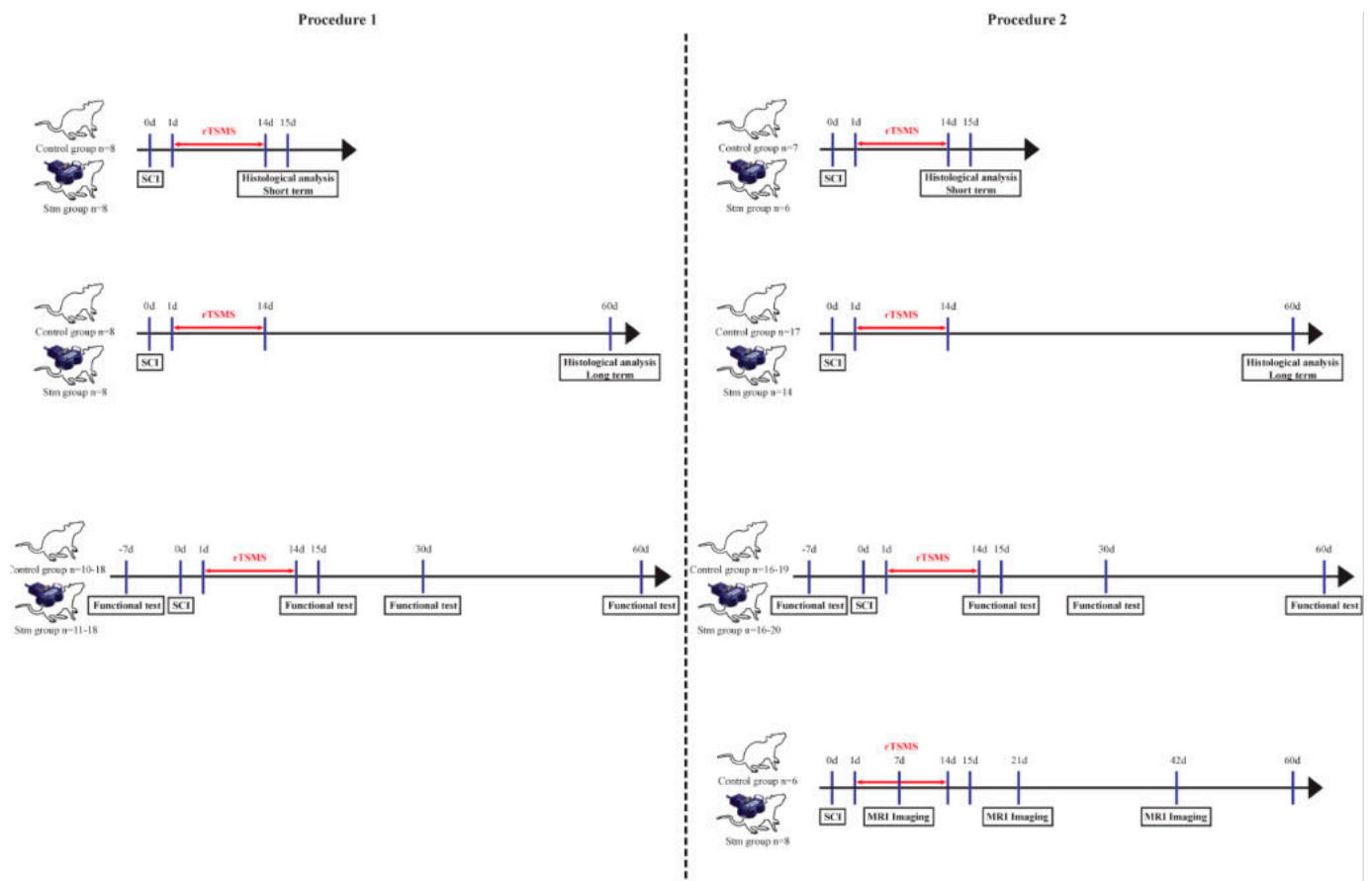


Figure 1. Experimental paradigms illustrating the timelines of the major experimental manipulations.

2.2. Experimental Design

2.2.1. Procedure 1

Surgical Procedure

In order to assess the effects of the rTSMS treatment and to compare them to those described in mice, first we performed penetrating SCI by using a 25-gauge needle in rats, as described previously [9,16].

For Procedure 56, rats were used (Figure 1):

- Two groups of 8 rats for the immunohistological experiments 15 days after SCI;
- Two groups of 20 rats for functional tests and for immunohistological experiments 60 days after SCI.

2.2.2. Procedure 2

Surgical Procedure

In humans, SCIs are mainly caused by contusive injuries; thus in a second experiment, we investigated the effects of rTSMS in a contusion model in rats. A moderate/severe lesion model was chosen due to the fact that 60% of the lesions in humans are incomplete [14].

The surgery was performed as described above, except for the lesion step.

Indeed, after laminectomy, the dura mater was removed, and contusion injury was applied by using a force-controlled spinal cord impactor (IH-0400 Impactor, Precision Systems and Instrumentation LLC, Brimstone, VA, USA). SCIs were performed by applying a force set to 175 kdyn. For Procedure 56, rats were used, as described above for Procedure 1 (Figure 1).

2.3. rTSMS Treatment

We applied rTSMS treatment as previously described by Chalfouh et al. [9].

2.4. Functional Test

2.4.1. Locomotor Test: Foot Misplacement Apparatus

Experiments were performed as described previously by Chalfouh et al. (Intellibio, Nancy, France) [9].

2.4.2. Hargreaves Apparatus

A Hargreaves plantar test was performed as described previously by Zhang et al. [18]. Baseline parameters were obtained with an additional group of non-injured animals.

2.5. MRI Imaging

In vivo imaging experiments were performed to follow on the same rats the evolution of the spinal cord structure over time, after SCI. Analysis of the spinal cord structure was achieved by the MRI BioSpec Advanced II (Bruker, Ettlingen, Mannheim, Germany), with a magnetic field of 4.7 Teslas, and monitored with ParaVision software.

The rats were anesthetized by intraperitoneal injections (Thiopental, 1 g/20 mL, Panpharma). To perform the MRI recordings, the rats were placed in supine position. The vertebra T9 was put down on the marker of the antenna in order to have the area of interest in the field of view of the MRI. Two cardiac electrodes were placed on the rats to follow their cardiac constants. A comprehensive analysis, including T2*-weighted gradient echo in axial and sagittal sections, was carried out with the parameters presented in the Table 1.

Table 1. Summary table of the acquisition parameters of MRI sequences used to characterize and identify spinal cord structure on rats after SCI and/or rTSMS treatment.

	TR (ms)	TE (ms)	Thickness (μm)	FOV (cm)	Matrix (pixel)	Acquisition Time
T2 *-weighted axial section	2000	6.5	500	4	256	15 min 56 s
		20.4				
		34.3				
		48.1				
		62.1				
		75.9				
		89.1				
		103.7				
T2 *-weighted sagittal section	2000	6.5	500	4	320	16 min
		117.5				
		131.4				

The sequences were performed on axial sections is a multi-slice gradient that allowed us to provide a T2* map for tissues characterization.

The sequences of images were then analyzed by using the following software programs:

- ParaVision software (Paravision 5.1, Bruker Biospin MRI, Ettlingen, Germany) to determine the surface quantification of hyposignal and hypersignal, but also identify tissues structure on sagittal images;
- Osirix software (OsiriX 11, Pixmeo SARL, Geneva, Switzerland), to determine the volume of spinal cord section and realize a 3D representation on axial images.

2.6. Tissue Preparation and Sectioning

Tissue preparation and cryosectioning were performed as previously described [9,16].

2.7. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed as described previously [9,16]. The following primary antibodies were used: rabbit anti-platelet-derived growth factor β (PDGFR β , Abcam, Cambridge, UK, 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) and mouse anti-neurofilament 200 kD (NF200, Millipore, Burlington, MA, USA, MAB5256).

2.8. Image Acquisition Analysis

Representative images were acquired as described previously.

2.9. Quantification of Immunohistochemically Stained Areas

On sagittal sections, the GFAP-negative (GFAP-), PDGFR β -positive (PDGFR β +), NF200-negative (NF200-) and DAPI-negative (DAPI-) areas were measured at the epicenter of the lesion and section rostral and caudal to the injury site; thus, a minimum of 3 sections (60 μ m) per animal were measured. For Iba1 staining, an analysis of the area in which Iba1-positive amyloid cells were present was performed. Analysis of Iba1 intensity measurement was performed on rectangle of 6 μ m \times 2 μ m. Iba1 intensities were collected after threshold standardization.

2.10. Statistical Analysis

Data are presented as means \pm standard deviation (SD). Comparisons of means were performed by using two-tailed Mann–Whitney tests for all the experiments. In all tests, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Procedure 1

The main aim of the first procedure was to investigate the effects of rTSMS after a complete transection of the spinal cord in rats. We focused this study on functional recovery and tissue repair (Figure 1).

3.1.1. rTSMS Treatment Induces Locomotor Recovery after a Complete Transection of the Spinal Cord in Rats

Based on locotronic and Hargreaves tests, motor and sensitive recoveries were assessed respectively.

Hargreaves test results demonstrate that there is no difference between groups at 15, 30 and 60 days after SCI (Supplementary Materials Figure S1).

Locotronic results demonstrate that, 15 days after SCI, rTSMS treatment did not enhance locomotor abilities (Figure 2A–C); indeed, there is no significant difference between SCI and Stm groups at this time point (Figure 2A–C). In contrast, 30 and 60 days after SCI, rTSMS-treated animals showed a significant improvement of the locomotion (Figure 2D–I). In fact, the Stm group presents a reduction in the number of back-legs errors (Figure 2D,G), the total back-leg errors' time (Figure 2E,H) and total crossing time (Figure 2F,I) 30 and 60 days after SCI.

3.1.2. rTSMS Treatment Enhances Tissue Repair after a Complete Transection of the Spinal Cord in Rats

In order to investigate the effects of rTSMS on tissue repair, immunohistological experiments were performed 15 and 60 days after SCI (Figures 3 and 4, respectively).

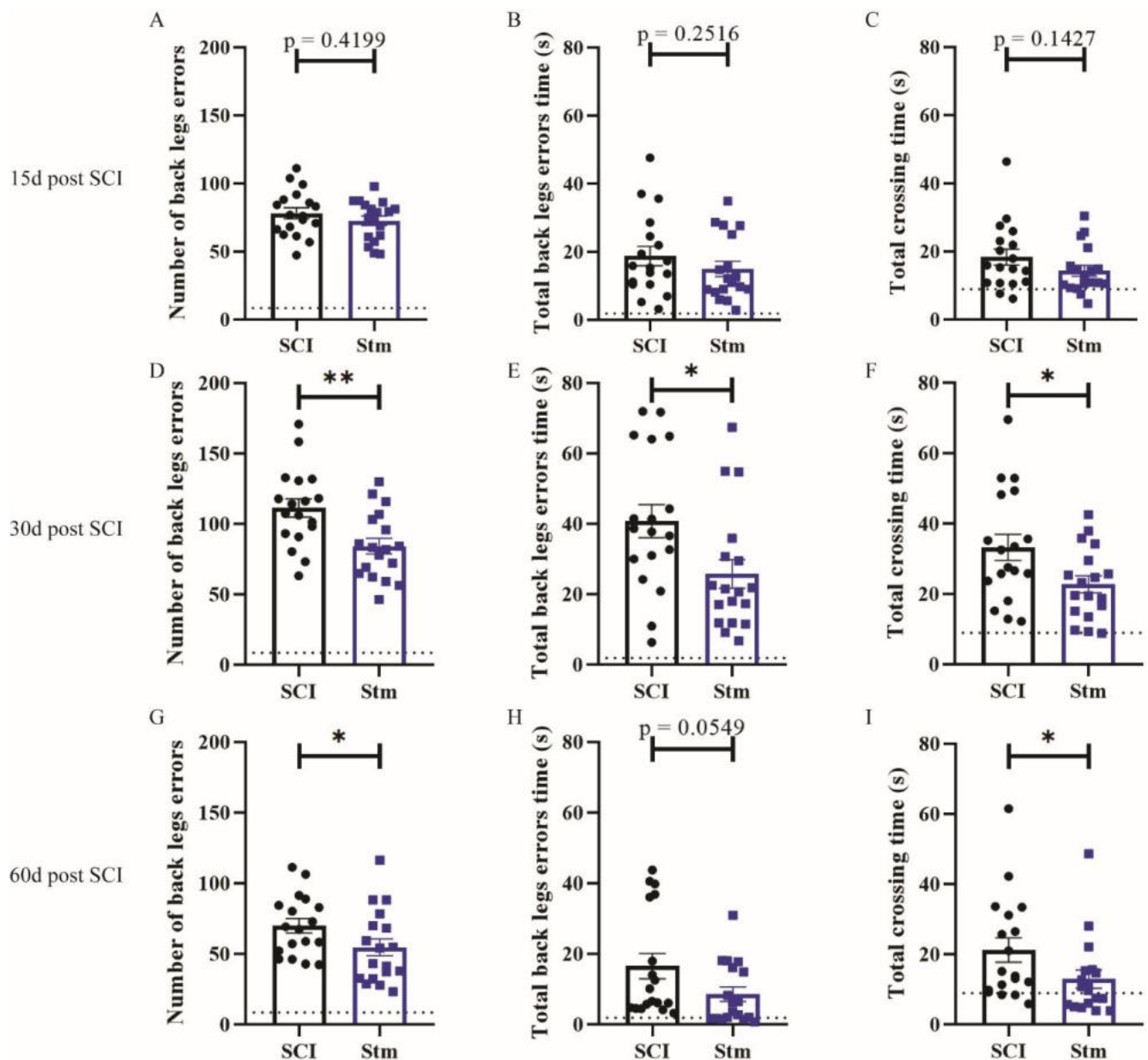


Figure 2. rTSMS treatment induces locomotor recovery after a complete transection of the spinal cord in rats. Quantification of locomotor evaluation at (A–C) 15 days, (D–F) 30 days and (G–I) 60 days after SCI. Parameters are (A,D,G) number of back-legs errors, (B,E,H) total back-legs errors' time and (C,F,I) total crossing time. Quantifications are expressed as average \pm SD; $n = 18$ animals per group. Dashed lines correspond to the baseline parameters obtained during locomotor habituation (7 days before SCI). Quantifications are expressed as average \pm SD. Statistical evaluations are based on the Mann–Whitney test (* = $p < 0.05$ and ** = $p < 0.01$).

Glial and fibrotic components of the scar were studied (Figure 3A–H). It appears that, 15 days after SCI, rTSMS treatment reduces the fibrotic component of the scar (Figure 3H) but has no major effect at this time point on the glial component of the scar (Figure 3G). In contrast, 60 days after SCI, our results reveal that rTSMS modulates the spinal scar by decreasing the GFAP-negative (GFAP-) area (Figure 4G). At this time point, rTSMS does not exert a major effect on the fibrotic component of the scar (Figure 4H).

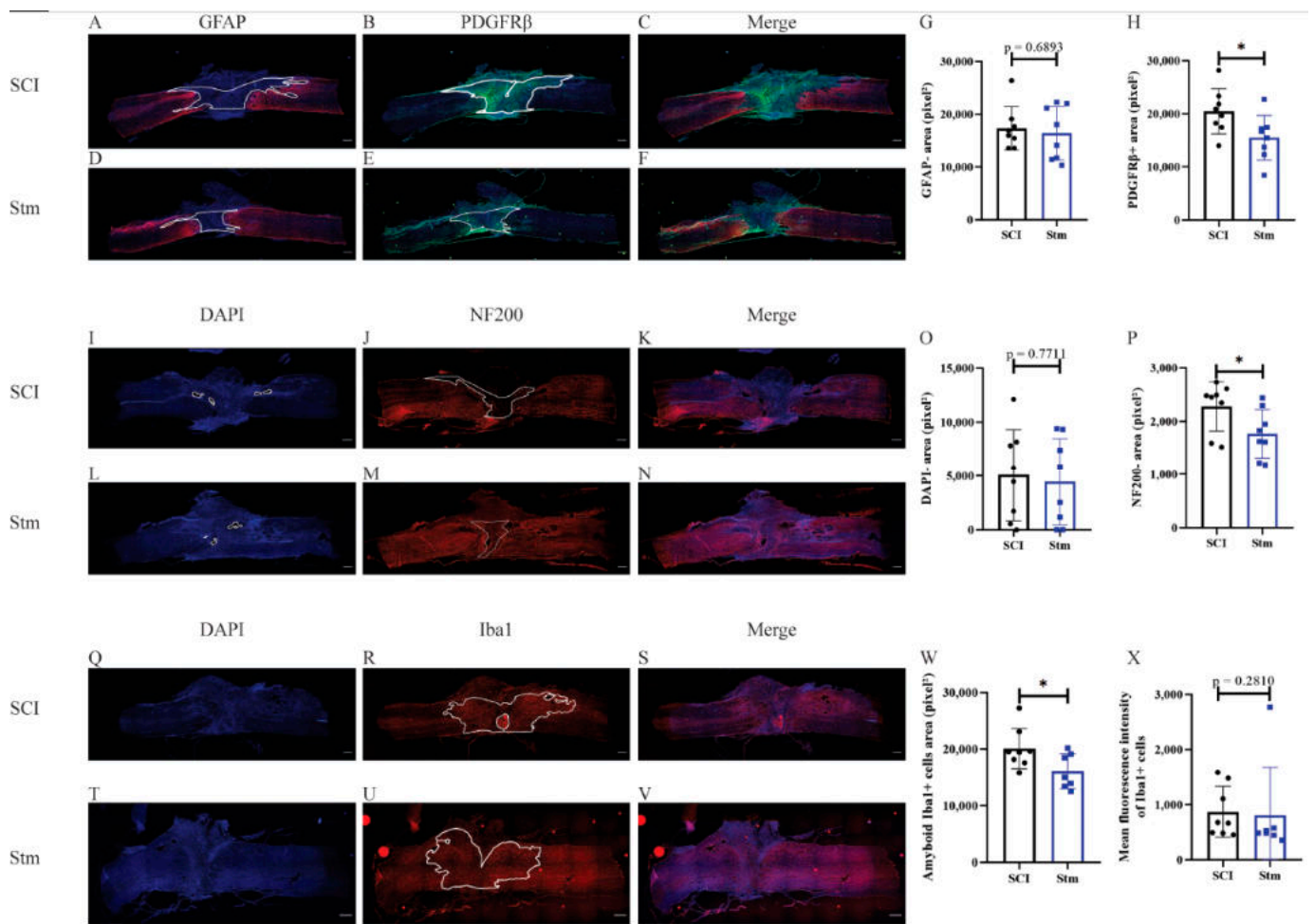


Figure 3. rTSMS treatment enhances tissue repair after a complete transection of the spinal cord 15 days after SCI in rats. At day 15, immunohistological analyses were performed. (A–F,I–N,Q–V) Representative pictures of sagittal spinal cord sections of (A–C,I–K,Q–S) SCI and (D–F,L–N,T–V) Stm (rTSMS treated) animals. Sections were stained with (A,D) GFAP, (B,E) PDGFR β , (I,L,Q,T) DAPI, (J,M) NF200 and (R,U) Iba1. (G) Quantification of astrocytic-negative area (GFAP-). (H) Quantification of fibrosis-positive area (PDGFR β +). (O) Quantification of DAPI-negative area (DAPI-). (P) Quantification of NF200-negative area (NF200-). (W) Quantification of Iba1-amyloid-positive cells' area (Iba1+) and (X) quantification of Iba1+ mean fluorescence intensity. Scale bars are 200 μ m; $n = 8$ animals per group. Quantifications are expressed as average \pm SD. Statistical evaluations are based on the Mann–Whitney test (* = $p < 0.05$).

In rats, one of the main issue after SCI is the presence of cystic cavities which take place into the epicenter of the lesion. To measure this process, the DAPI-negative (DAPI-) area was assessed at 15 and 60 days after SCI. Fifteen days after SCI, there is no difference between the two groups of animals (Figure 3I,L,O), whereas, at 60 days, rTSMS tends to decrease the size of the cavities ($p = 0.1135$) (Figure 4I,L,O).

After SCI, neuronal death and axonal degeneration impair functional recovery, that is why 15 and 60 days after SCI, axonal quantification was investigated via NF200 staining. Our results show that at both time points; 15 days (Figure 3J,M,P) and 60 days after SCI (Figure 4J,M,P) rTSMS treatment decreases the NF200-negative (NF200-) area.

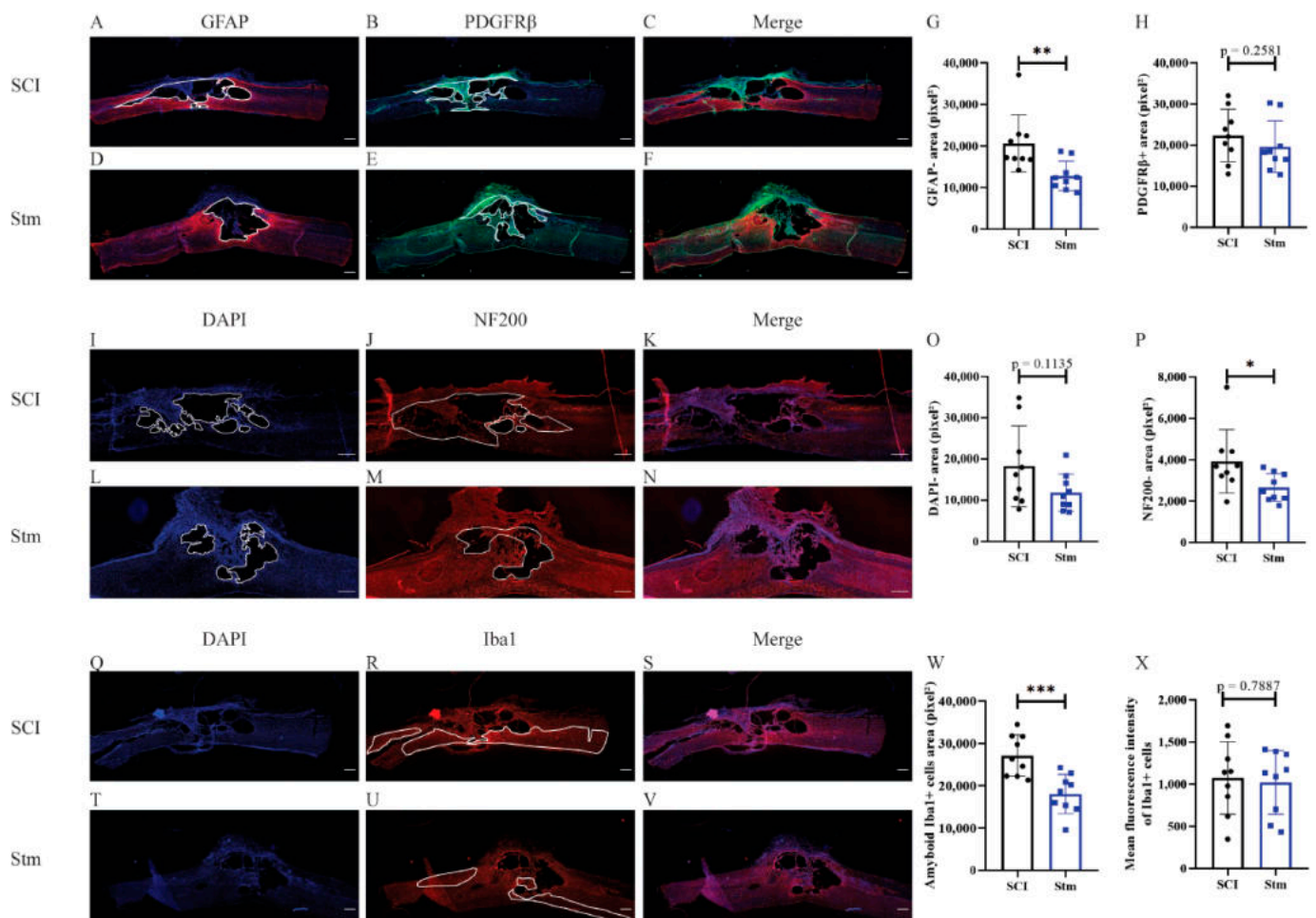


Figure 4. rTSMs treatment enhances tissue repair after a complete transection of the spinal cord 60 days after SCI in rats. At day 60, immunohistological analyses were performed. (A–F,I–N,Q–T,U,V) Representative pictures of sagittal spinal cord sections of (A–C,I–K,Q–S) SCI and (D–F,L–N,T–V) Stm (rTSMs treated) animals. Sections were stained with (A and D) GFAP, (B and E) PDGFR β , (I,L,Q,T) DAPI, (J,M) NF200 and (R,U) Iba1. (G) Quantification of astrocytic-negative area (GFAP-). (H) Quantification of fibrosis-positive area (PDGFR β +). (O) Quantification of DAPI-negative area (DAPI-). (P) Quantification of NF200-negative area (NF200-). (W) Quantification of Iba1 amyloid-positive cells' area (Iba1+) and (X) quantification of Iba1+ mean fluorescence intensity. Scale bars are 200 μ m; $n = 8$ animals per group. Quantifications are expressed as average \pm SD. Statistical evaluations are based on the Mann–Whitney test (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ and *** = $p < 0.001$).

Finally, inflammatory processes were investigated 15 and 60 days after SCI. Indeed, inflammation and reactivity of the immune cells, mainly microglia and macrophages, are key factors regulating tissue healing. Thus, reactivity of microglia/macrophages was assessed by using Iba1 staining. These measurements reveal that, 15 days (Figure 3R,U,W) and 60 days (Figure 4R,U,W) after SCI, rTSMs treatment decreases the amount of amyloid-Iba1-positive cells into the injured spinal cord parenchyma. Iba1's intensity was also assessed and did not show any difference between groups 15 and 60 days after SCI (Figures 3X and 4X).

3.2. Procedure 2

The main aim of this second procedure was to investigate the effects of rTSMs after a moderate/severe contusion of the spinal cord in rats. In addition to functional recovery and tissue repair, MRI analyses were performed (Figure 1).

3.2.1. rTSMS Treatment Induces Functional Recovery after Contusive SCI in Rats

First, sensitive recovery was investigated. To do so, hindpaw withdrawal thermal latency was measured by using Hargreaves plantar test 15, 30 and 60 days after SCI (Figure 5). These experiments show that, at 15, 30 and 60 days after SCI rTSMS, the treated animals presented a reduction of the hindpaw withdrawal thermal latency in comparison to untreated (SCI) animals (Figure 5A–C).

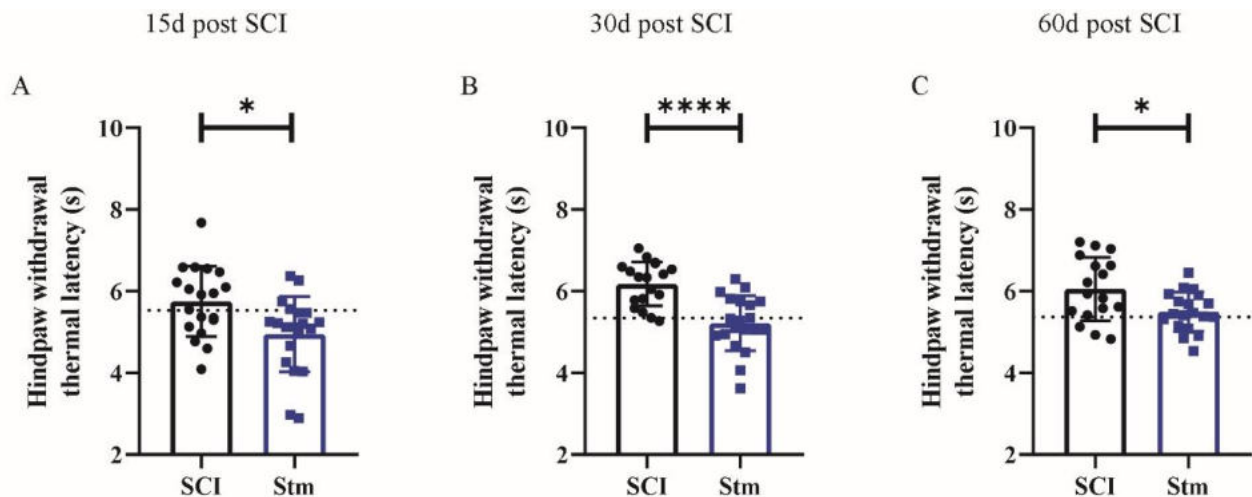


Figure 5. rTSMS treatment modulate sensitive recovery after SCI in rats. Quantification of hindpaw withdrawal thermal latency at (A) 15 days, (B) 30 days and (C) 60 days after SCI. Quantifications are expressed as average \pm SD; $n = 19$ animals per SCI group and $n = 20$ animals per STM group at 15 days, $n = 18$ animals per SCI group and $n = 20$ animals per STM group at 30 days and $n = 17$ animals per SCI group and $n = 19$ animals per Stm group 60 days after SCI. Dashed lines correspond to the baseline parameters obtained with non-injured animals. Statistical evaluations were based on the Mann–Whitney test (* = $p < 0.05$ and **** = $p < 0.0001$).

Then, based on locotronic test, functional recoveries were assessed. Our results demonstrate that, 15 and 30 days after SCI, rTSMS treatment did not enhance locomotor abilities (Figure 6A–F); indeed, there is no significant difference between SCI and Stm groups at these time points (Figure 6A–F). More interestingly, 60 days after SCI, rTSMS-treated animals showed a significant improvement in locomotion (Figure 6G–I). Indeed, the Stm group presented a reduction in the number of back-legs errors (Figure 6G), total back-legs errors' time (Figure 6H) and total crossing time (Figure 6I) 60 days after SCI.

3.2.2. MRI Analyses Show That rTSMS Treatment Decreases Cystic Cavities and Increases Spinal Cord Spared Tissue

MRI experiments were performed at 7 (Figure 7A–F), 21 (Figure 7G–L) and 42 (Figure 7M–R) days after SCI in order to follow on the same rats the evolution of the injury site overtime after SCI and rTSMS treatment. Hyposignal measurement was representative of the fibrotic/necrotic tissue present into the parenchyma, whereas the hypersignal indicates the presence of inflammation at early time points (7 and 21 days, Figure 7A–L) and cystic cavities at a later time point (42 days, Figure 7M–R). Measurement of both hypo- and hypersignal was also performed, and it reflects the overall area of the injured tissue (Figure 7E,K,Q). Based on this overall area measurement, a ratio of lesioned tissue among the entire spinal cord parenchyma was calculated (Figure 7F,L,R).

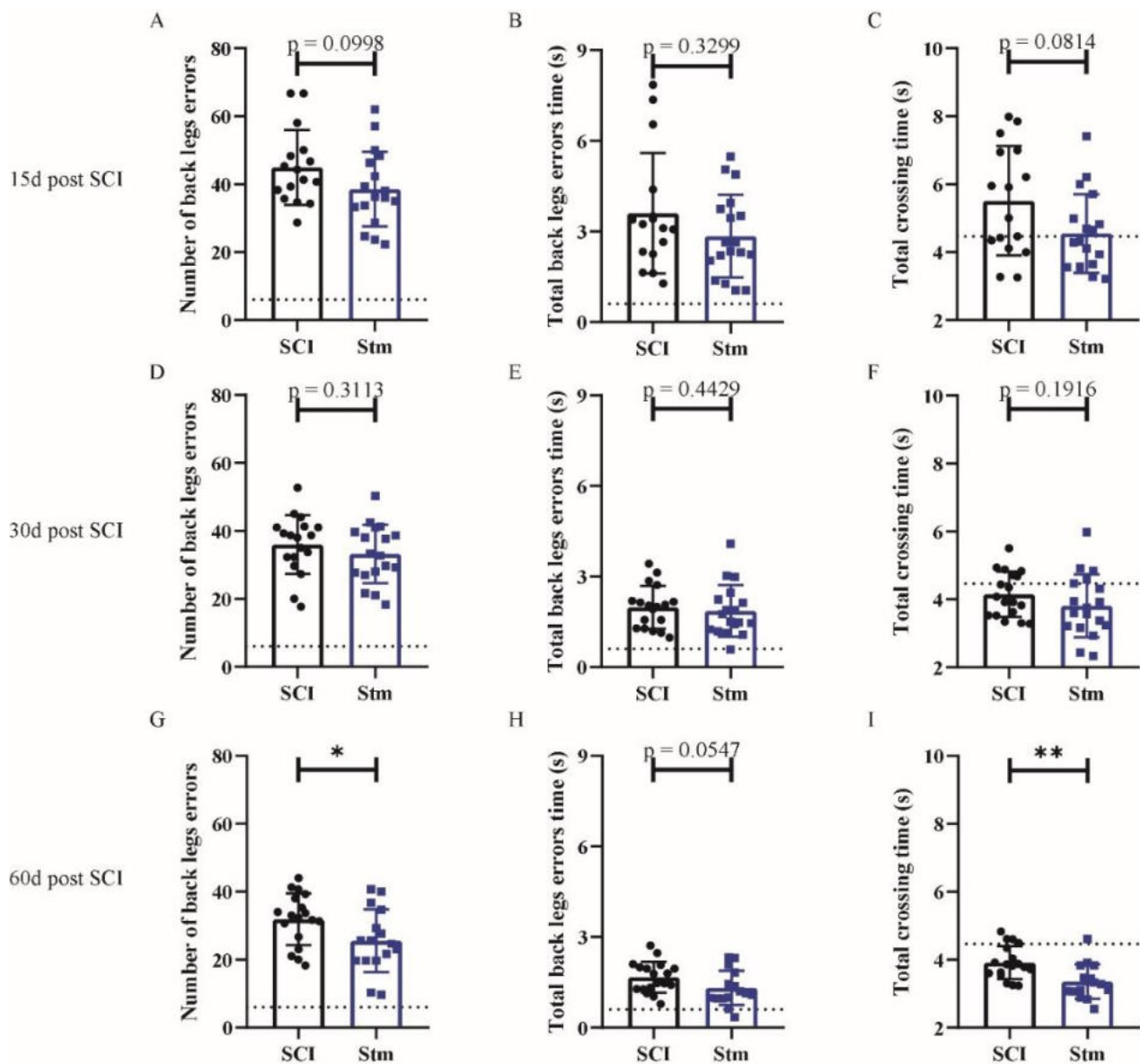


Figure 6. rTMS treatment induces locomotor recovery after contusive SCI in rats. Quantification of locotronic evaluation at (A–C) 15 days, (D–F) 30 days and (G–I) 60 days after SCI. Parameters are (A,D,G) number of back-leg errors, (B,E,H) total back-leg errors' time and (C,F,I) total crossing time. Quantifications are expressed as average \pm SD; $n = 16$ animals per SCI group and $n = 18$ animals per Stm group at 15 days, $n = 18$ animals per SCI group and $n = 18$ animals per Stm group at 30 days and $n = 18$ animals per SCI group and $n = 16$ animals per Stm group 60 days after SCI. Dashed lines correspond to the baseline parameters obtained during locotronic habituation (7 days before SCI). Quantifications are expressed as average \pm SD. Statistical evaluations are based on the Mann–Whitney test (* = $p < 0.05$ and ** = $p < 0.01$).

The MRI analyses reveal that, 7 and 21 days after SCI, there is no difference between groups (Figure 7A–L). In contrast, 42 days after SCI, rTMS-treated animals presented a reduction of the hypersignal area (Figure 7M,N,P), the overall area of the injured tissue (Figure 7Q) and the ratio of lesioned tissue (Figure 7R).

3.2.3. rTMS Treatment Enhances Tissue Repair after Contusive SCI in Rats 60 Days after SCI

In order to investigate the effects of rTMS on tissue repair, immunohistological experiments were performed 15 and 60 days after SCI (Figures 8 and 9, respectively).

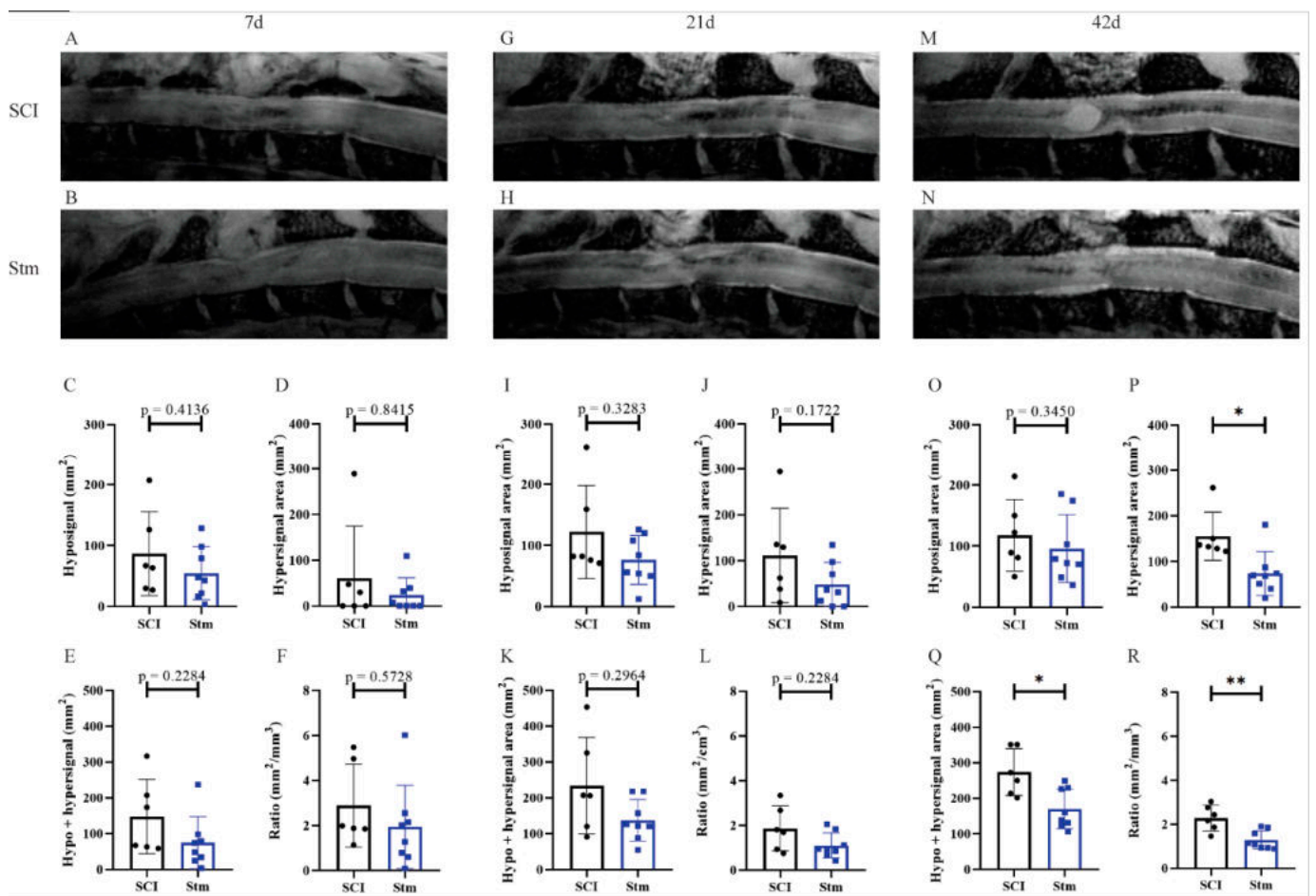


Figure 7. MRI analyses show that rTSMS treatment decreases cystic cavities and increases spinal cord spared tissue. At (A–F) 7, (G–L) 21 and (M–R) 42 days, MRI experiments were performed. Representative images of sagittal spinal cord sections recorded with MRI of (A,G,M) SCI and (B,H,N) Stm (rTSMS treated) animals. Quantification of hyposignal area (C) 7, (I) 14 and (O) 42 days after SCI. Quantification of hypersignal area (D) 7, (J) 14 and (P) 42 days after SCI. Quantification of hypo + hypersignal area (E) 7, (K) 14 and (Q) 42 days after SCI. Quantification of ratio lesioned tissue (F) 7, (L) 14 and (R) 42 days after SCI; $n = 6$ animals per control group and $n = 8$ per Stm group. Quantifications are expressed as average \pm SD. Statistical evaluations are based on the Mann–Whitney test (* = $p < 0.05$ and ** = $p < 0.01$).

In this model, in the same way as the MRI results, immunohistological analyses demonstrate that, 15 days after SCI, there is no difference between treated (Stm) and untreated (SCI) animals (Figure 8).

At the opposite, 60 days after SCI, the analysis of the glial and fibrotic components of the scar shows that rTSMS treatment decreases the GFAP-negative area without decreasing the PDGFR β -positive area (Figure 9A–H). In the same way, at this time point, rTSMS treatment decreases cystic cavities (DAPI-negative area) and axonal degeneration (NF200-negative area) (Figure 9I,L,O and J,M and P, respectively). Moreover, rTSMS treated group presents an increase of the amount of amyloid-Iba1-positive cells (Figure 9R,U,W). Iba1 intensity was also assessed and did not show any difference between groups 60 days after SCI (Figure 9X).

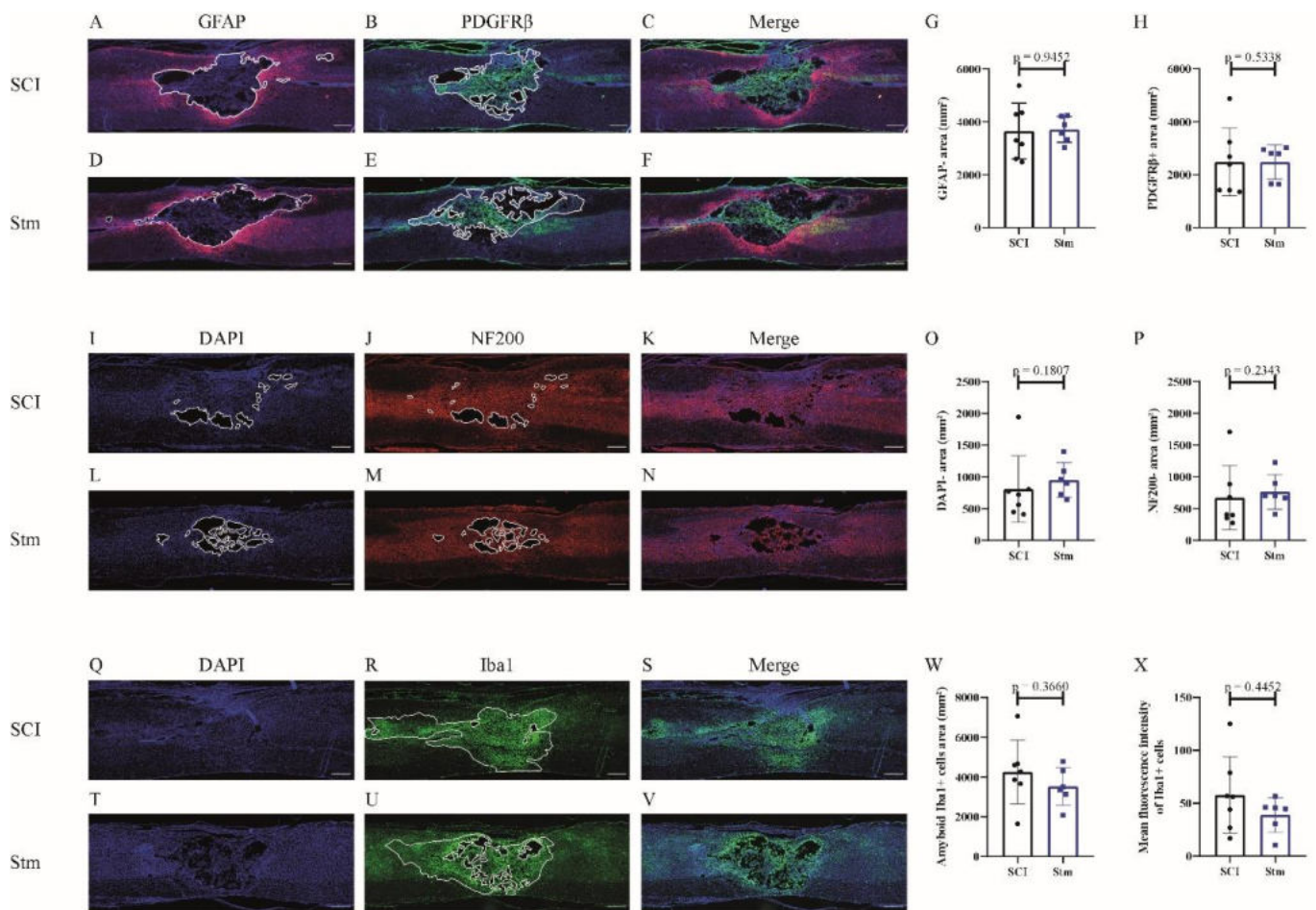


Figure 8. rTSMS treatment does not have effect on tissue repair after contusive SCI in rats 15 days after SCI. At day 15, immunohistological analyses were performed. (A–V) Representative pictures of sagittal spinal cord sections of (A–C,I–K,Q–S) SCI and (D–F,L–N,T–V) Stm (rTSMS treated) animals. Sections were stained with (A,D) GFAP, (B,E) PDGFR β , (I,L,Q,T) DAPI, (J,M) NF200 and (R and U) Iba1. (G) Quantification of astrocytic-negative area (GFAP-). (H) Quantification of fibrosis-positive area (PDGFR β +). (O) Quantification of DAPI-negative area (DAPI-). (P) Quantification of NF200-negative area (NF200-). (W) Quantification of Iba1-amyloid-positive cells' area (Iba1+) and (X) quantification of Iba1+ mean fluorescence intensity. Scale bars are 200 μ m; $n = 7$ animals per SCI group and $n = 6$ animals per Stm group. Quantifications are expressed as average \pm SD. Statistical evaluations are based on the Mann–Whitney test.

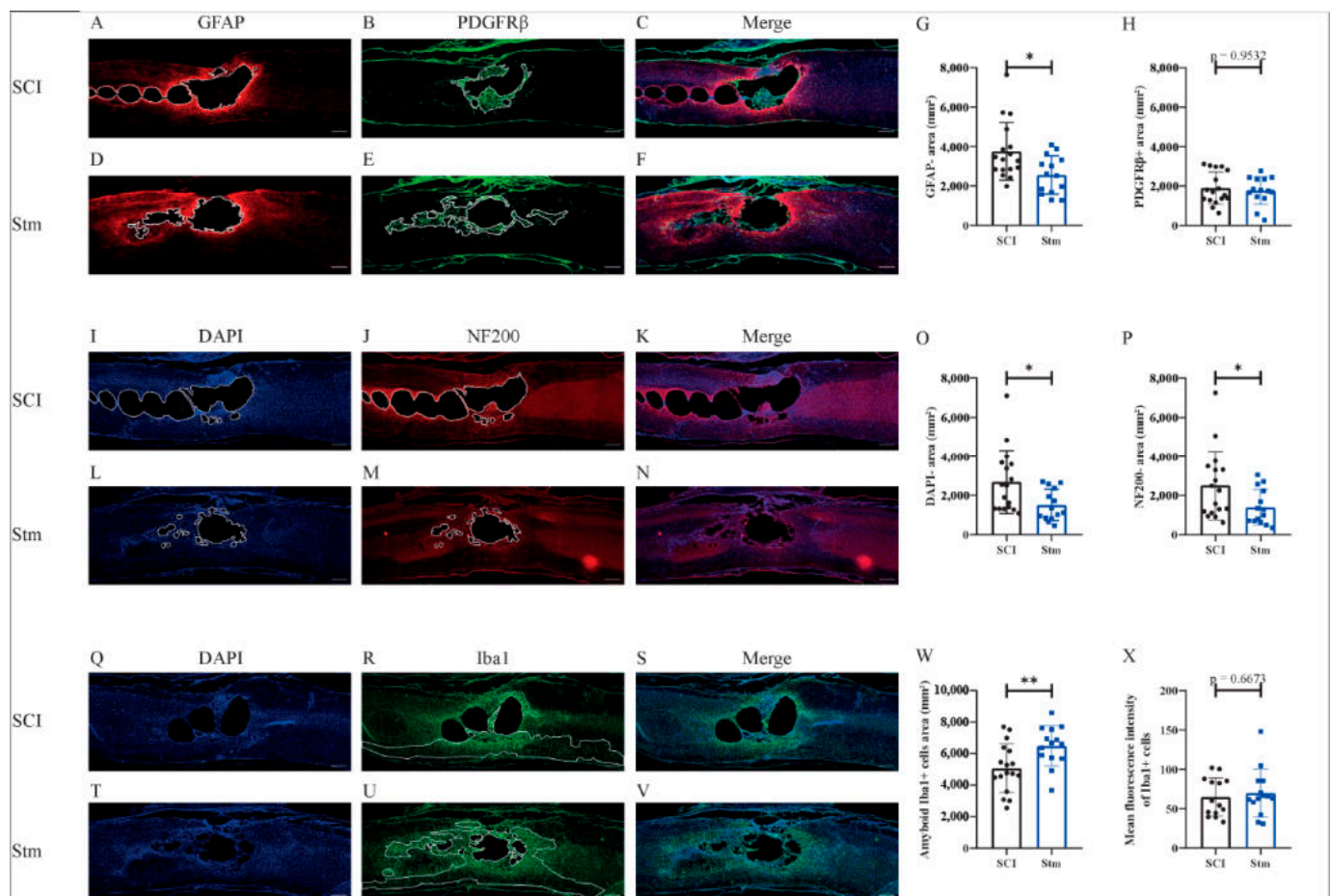


Figure 9. rTSMS treatment enhances tissue repair after contusive SCI in rats 60 days after SCI. At day 60, immunohistological analyses were performed. (A–F,I–N,Q–V) Representative pictures of sagittal spinal cord sections of (A–C,I–K,Q–S) SCI and (D–F,L–N,T–V) Stm (rTSMS treated) animals. Sections were stained with (A,D) GFAP, (B,E) PDGFR β , (I,L,Q,T) DAPI, (J,M) NF200 and (R,U) Iba1. (G) Quantification of astrocytic-negative area (GFAP-). (H) Quantification of fibrosis-positive area (PDGFR β +). (O) Quantification of DAPI-negative area (DAPI-). (P) Quantification of NF200-negative area (NF200-). (W) Quantification of Iba1-amyloid-positive cells' area (Iba1+) and (X) quantification of Iba1+ mean fluorescence intensity. Scale bars are 200 μ m; $n = 17$ animals per SCI group and $n = 14$ per Stm group. Quantifications are expressed as average \pm SD. Statistical evaluations are based on the Mann–Whitney test (* = $p < 0.05$ and ** = $p < 0.01$).

4. Discussion

The main aim of our study was to investigate the effects of rTSMS in penetrating and contusive SCI models in rats (Figure 1). Indeed, the effects of rTSMS were measured first in a penetrating injury model in which the spinal cord was transected with a needle. This model was chosen because it was used initially in our princeps studies in mice [9,16]. As described in mice, in this model, rTSMS treatment enhances functional recovery and modulates the lesion scar in rats. In effect, 15 days after SCI, treated rats present a reduction of the fibrotic scar and an increase of the axonal survival (reduction of NF200-negative area) (Figure 3). These effects on tissue repair are correlated with functional recovery at later time points: 30 and 60 days after SCI (Figure 2). Finally, 60 days after SCI, treated animals present an improvement of the repair of the spinal cord by the decrease of the size of the cavities and the increase of the glial scar (Figure 4).

In a second time, we assessed the effects of rTSMS in a more clinically relevant model. Indeed, a vast majority of the SCIs in humans are contusive and not penetrating [19]. For this procedure, a moderate/severe contusive SCI model was chosen because, in humans, 60% of the SCIs are not complete [19]. This model induces a severe histological injury

characterized by large cystic cavities and moderate locomotor deficits. This procedure completed the first one in which the animals present, in addition to a severe histological injury, a complete paraplegia. To do so, standardized contusive SCI was performed by using a force-controlled spinal cord impactor. In this model, it appears that rTSMS also improves functional recovery and tissue repair. More interestingly, our results indicate that, in this model, rTSMS treatment has a major effect at later time point. In fact, rTSMS-treated animals present a significant functional recovery only 60 days after SCI (Figure 6). In the same way, histological analyses reveal that, 15 days after SCI, there was no difference between the two groups of rats, whereas, 60 days after SCI, treated animals showed a reduction of the size of the cavities and an increase of the glial scar and the neuronal survival (Figures 8 and 9). In addition to these analyses, MRI experiments were also performed 7, 21 and 42 days after SCI (Figure 7). These experiments confirm our histological results. In effect, 7 and 21 days after SCI, there was no difference between the two groups of rats. In contrast, 42 days after SCI, MRI results show that rTSMS-treated animals present a reduction of the hypersignal (corresponding to the cavities), the hypersignal and hyposignal (corresponding to the lesioned tissue) and the ratio of lesioned tissue among the entire spinal cord parenchyma (Figure 7).

Ultimately, in our study, we tried to evaluate the sensitive recovery after SCI. Indeed, the plantar test was performed in both groups of animals and in both procedures, 15, 30 and 60 days after SCI (Figure 1). Based on that test, hindpaw withdrawal thermal latency was recorded. In Procedure 1 (penetrating SCI), plantar test results did not show any difference between groups (Supplementary Materials Figure S1). In contrast, in Procedure 2 (contusive SCI), it appears that rTSMS treated animals present a reduction of hindpaw withdrawal thermal latency recordings for all time points in comparison to untreated animals (Figure 5). More interestingly, a closer analysis of these results allows us to see that, at 15 days after SCI, hindpaw withdrawal thermal latency recordings of the rTSMS-treated animals are shorter in comparison to non-injured animals (dashed line, Figure 5A). At the opposite, at later time points, 30 and 60 days after SCI, hindpaw withdrawal thermal latency recordings of the rTSMS-treated animals are comparable to the ones of non-injured animals (dashed lines, Figure 5B,C). These results can illustrate the fact that, at an early time-point (15 days), rTSMS treatment induces allodynia, due to the shorter latency than non-injured animals, whereas, at later time points (30 and 60 days after SCI), rTSMS enhances axonal survival and re-establishes an efficient voluntary sensitive-motor loops close to those of the uninjured rats. Allodynia is a commonly described side-effect of several therapies after SCI, such as cellular transplantation. In effect, cellular transplantation plays its presumed effects mainly by replacing lost cells or by secreting trophic factors which increase axonal survival or axonal regrowth. These benefits can, in turn, exert detrimental side-effects, such as neuropathic pain or allodynia [20,21]. We can hypothesize that, at an early time point after contusive SCI, rTSMS enhances allodynia at least in the case of thermoalgebraic stimulations due to enhancement of axonal survival, and that, at later time points, this axonal survival induces neuronal plasticity in reorganizing functional sensitive-motor loops networks. The reduction of hindpaw withdrawal thermal latency recordings in comparison to uninjured animals is also observed after penetrating SCI in both groups for all time points studied (Supplementary Materials Figure S1).

Our two procedures also allow us to characterize the evolution of the lesion scar over time. Indeed, immunohistological results demonstrate that, in both cases, at 15 days after SCI, the scar is composed of a diffuse (after contusive SCI) or a dense (after penetrating SCI) fibrotic core. At this time point, there are only rare cystic cavities. In contrast, 60 days after SCI, in both cases, there is no or very few fibrotic scars; however, the spinal cord presents very large cystic cavities. These results are especially interesting because the lesion scar in rats 15 days after SCI is comparable to the one presents in mice [22,23]. At 60 days after SCI, the two scars are very different due to the fact that the fibrosis present in rats degenerates to the detriment of the cystic cavities, and this is not the case in mouse models. It appears that further studies will be necessary to understand the mechanisms

responsible for this distinct lesion scar evolution over time. In a broader perspective, it was recently shown that this fibrotic scar is present in different central-nervous-system lesions in mice, such as traumatic brain or spinal cord injuries, as well as after demyelinating or ischemic lesion models [24]. It could also be interesting to demonstrate if this fibrotic scar is present throughout species after CNS lesions.

Recent studies have underlined the major role played by microglia/macrophages after SCI [25,26]. That is why we have investigated the effects of rTSMS treatment on these cellular populations. To do so, Iba1-staining experiments were performed. In particular, Iba1 intensity was measured, and, in both procedures and both time points investigated, it appears that there is no difference between groups. To complete this analysis, we quantified the amyloid-Iba1-positive cells' areas present in the lesion epicenter. These analyses show that, in penetrating SCI (Procedure 1), rTSMS treatment decreases the amount of amyloid-Iba1-positive cell areas at both time points. In contrast, in contusive SCI (Procedure 2), the analyses show that rTSMS treatment increases the amount of the amyloid-Iba1-positive cells' areas at 60 days after SCI. The amyloid shape quantification is usually employed to characterize the activation of microglia and macrophages [27]. Altogether, our results underline the fact that rTSMS treatment modulates microglia/macrophages activation and inflammatory response. However, the opposite results on Iba1-positive cells in our two procedures do not allow us to conclude about the specific effects of rTSMS on these cellular populations. Recent studies have demonstrated that circulating macrophages are mostly present in the lesion core, whereas microglia are present at the border of it [25]. It has also been shown that macrophages, instead of microglia, are mainly implicated in secondary axonal dieback [28]. Nevertheless, we can hypothesize that the inflammatory processes are different in our two procedures. Indeed, in Procedure 1, meninges are removed during the surgical procedure, whereas, in Procedure 2, meninges are still present after the surgery. We can assume that the ratio between microglia and macrophages varies in these two models. However, Iba1 staining is not specific and does not allow us to differentiate these two cellular populations into the lesion scar. In effect, we can hypothesize that, after penetrating SCI, the rupture of the meninges leads to a massive infiltration of circulating macrophages, and this should not be the case after contusive SCI, where the meninges are not removed. Thus, our results can reflect the positive effects of rTSMS on macrophages after penetrating SCI. Indeed, the immunomodulatory role played by magnetic stimulation (MS) on macrophages in culture has been already investigated [29]. It appears that MS can act on macrophages polarization. In contrast, after contusive SCI, the ratio between macrophages and microglia into the lesion scar should be different due to the reduction of macrophages infiltration. However, the precise role of MS and especially rTSMS on microglia is not clearly described. Moreover, as mentioned above, microglia and macrophages cannot be differentiated easily by immunostaining. Furthermore, the polarization of these inflammatory cells (M1 and M2) is also hard to conduct due to the possible shared expression of markers. That is why it could be of primary interest to conduct further investigations regarding the polarization of microglia/macrophages after rTSMS treatment. First, *in vitro* investigations based on well-characterized microglia and macrophages cultures could be performed. Then, single-cell sequencing could be a useful technic to reveal the diversity of the inflammatory cells present in the lesioned spinal cord, with or without rTSMS treatment. Some recent studies have pointed out the fact that there are specific microglial subpopulations associated with neurodegenerative diseases [30,31]. This kind of studies could be performed in order to characterize the role played by rTSMS on microglia/macrophages and, by extension, on the other inflammatory cells.

The main aim of the present research was to propose a preclinical study based on two complementary SCI models. Thus, its main limitation is that our study did not dissect the cellular and molecular mechanisms, and this can explain the role played by rTSMS after SCI. However, our study proposes that rTSMS exerts positive effects after SCI in rats in an animal model in which the consequences of SCIs are closer to the ones observed in humans. This study is a further step towards the use of this treatment in humans after SCI.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines9121827/s1>, Figure S1: rTMS treatment does not have effect on sensitive recovery after penetrating SCI in rats.

Author Contributions: N.G. conceptualized the project. N.G. designed the experiments; A.R., P.N., A.H., E.G. and L.N. performed the experiments. A.R., P.N., A.H., E.G., Q.D. and N.G. analyzed the results; Q.D. provided techniques and scientific input; A.R., P.N., A.H. and N.G. wrote the article. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by ADIR association (ADIR-2019-03), IRME association, fonds de dotation Neuroglia (REGENrTMS) and Fondation de l’Avenir (AP-RM-20-028).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. The protocols were designed to minimize pain or discomfort to the 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; 18 December 1986), French Decree no. 97/748 of 19 October 1987 (Journal Officiel de la République Française; 20 October 1987), and the recommendations of the Cenomexa ethics committee (#23767).

Informed Consent Statement: Not applicable.

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

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

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no competing interests.

References

- Guérout, N. Plasticity of the injured spinal cord. *Cells* **2021**, *10*, 1886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hejrati, N.; Fehlings, M.G. A review of emerging neuroprotective and neuroregenerative therapies in traumatic spinal cord injury. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2021**, *60*, 331–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Brockie, S.; Hong, J.; Fehlings, M.G. The role of microglia in modulating neuroinflammation after spinal cord injury. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9706. [[CrossRef](#)]
- Grégoire, C.-A.; Goldenstein, B.L.; Floriddia, E.M.; Barnabé-Heider, F.; Fernandes, K.J.L. Endogenous neural stem cell responses to stroke and spinal cord injury. *Glia* **2015**, *63*, 1469–1482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Göriz, C.; Dias, D.O.; Tomilin, N.; Barbacid, M.; Shupliakov, O.; Frisé, J. A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science* **2011**, *333*, 238–242. [[CrossRef](#)]
- Sabelström, H.; Stenudd, M.; Frisé, J. Neural stem cells in the adult spinal cord. *Exp. Neurol.* **2014**, *260*, 44–49. [[CrossRef](#)]
- Sabelström, H.; Stenudd, M.; Réu, P.; Dias, D.O.; Elfineh, M.; Zdunek, S.; Damberg, P.; Göriz, C.; Frisé, J. Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science* **2013**, *342*, 637–640. [[CrossRef](#)]
- Hussein, R.K.; Mencia, C.P.; Katagiri, Y.; Brake, A.M.; Geller, H.M. Role of chondroitin sulfation following spinal cord injury. *Front. Cell. Neurosci.* **2020**, *14*, 208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chalfouh, C.; Guillou, C.; Hardouin, J.; Delarue, Q.; Li, X.; Duclos, C.; Schampan, D.; Marie, J.-P.; Cosette, P.; Guérout, N. The regenerative effect of trans-spinal magnetic stimulation after spinal cord injury: Mechanisms and pathways underlying the effect. *Neurotherapeutics* **2020**, *17*, 2069–2088. [[CrossRef](#)]
- Chedly, J.; Soares, S.; Montebault, A.; Von Boxberg, Y.; Veron-Ravaille, M.; Mouffle, C.; Benassy, M.-N.; Taxi, J.; David, L.; Nothias, F. Physical chitosan microhydrogels as scaffolds for spinal cord injury restoration and axon regeneration. *Biomaterials* **2017**, *138*, 91–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Delarue, Q.; Mayeur, A.; Chalfouh, C.; Honoré, A.; Duclos, C.; Di Giovanni, M.; Li, X.; Salaun, M.; Dampierre, J.; Vaudry, D.; et al. Inhibition of ADAMTS-4 expression in olfactory ensheathing cells enhances recovery after transplantation within spinal cord injury. *J. Neurotrauma* **2020**, *37*, 507–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kobashi, S.; Terashima, T.; Katagi, M.; Nakae, Y.; Okano, J.; Suzuki, Y.; Urushitani, M.; Kojima, H. Transplantation of M2-deviated microglia promotes recovery of motor function after spinal cord injury in mice. *Mol. Ther.* **2020**, *28*, 254–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Luo, Y.; Fan, L.; Liu, C.; Wen, H.; Wang, S.; Guan, P.; Chen, D.; Ning, C.; Zhou, L.; Tan, G. An injectable, self-healing, electroconductive extracellular matrix-based hydrogel for enhancing tissue repair after traumatic spinal cord injury. *Bioact Mater.* **2021**, *7*, 98–111. [[CrossRef](#)]
- Courtine, G.; Sofroniew, M.V. Spinal cord repair: Advances in biology and technology. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 898–908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Watzlawick, R.; Rind, J.; Sena, E.S.; Brommer, B.; Zhang, T.; Kopp, M.A.; Dirnagl, U.; Macleod, M.R.; Howells, D.W.; Schwab, J.M. 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.* **2016**, *14*, e1002468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Delarue, Q.; Robac, A.; Massardier, R.; Marie, J.-P.; Guérout, N. Comparison of the effects of two therapeutic strategies based on olfactory ensheathing cell transplantation and repetitive magnetic stimulation after spinal cord injury in female mice. *J. Neurosci. Res.* **2021**, *99*, 1835–1849. [[CrossRef](#)]
17. Delarue, Q.; Chalfouh, C.; Guérout, N. Spinal cord injury: Can we repair spinal cord non-invasively by using magnetic stimulation? *Neural. Regen. Res.* **2021**, *16*, 2429–2430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Zhang, Y.; Ma, S.; Ke, X.; Yi, Y.; Yu, H.; Yu, D.; Li, Q.; Shang, Y.; Lu, Y.; Pei, L. The mechanism of Annexin A1 to modulate TRPV1 and nociception in dorsal root ganglion neurons. *Cell Biosci.* **2021**, *11*, 167. [[CrossRef](#)]
19. Algahtany, M.; McFaul, S.; Chen, L.; Zhang, S.; Saarela, O.; Alqahtani, F.; Cusimano, M.D. The changing etiology and epidemiology of traumatic spinal injury: A population-based study. *World Neurosurg.* **2021**, *149*, e116–e127. [[CrossRef](#)]
20. Hofstetter, C.P.; Holmström, N.A.; Lilja, J.A.; Schweinhardt, P.; Hao, J.; Spenger, C.; Wiesenfeld-Hallin, Z.; Kurpad, S.N.; Frisén, J.; Olson, L. Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat. Neurosci.* **2005**, *8*, 346–353. [[CrossRef](#)]
21. Nakhjavan-Shahraki, B.; Yousefifard, M.; Rahimi-Movaghar, V.; Baikpour, M.; Nasirinezhad, F.; Safari, S.; Yaseri, M.; Jafari, A.M.; Ghelichkhani, P.; Tafakhori, A.; et al. Transplantation of olfactory ensheathing cells on functional recovery and neuropathic pain after spinal cord injury; systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 325. [[CrossRef](#)]
22. Soderblom, C.; Luo, X.; Blumenthal, E.; Bray, E.; Lyapichev, K.; Ramos, J.; Krishnan, V.; Lai-Hsu, C.; Park, K.K.; Tsoulfas, P.; et al. Perivascular fibroblasts form the fibrotic scar after contusive spinal cord injury. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 13882–13887. [[CrossRef](#)]
23. Zhu, Y.; Soderblom, C.; Krishnan, V.; Ashbaugh, J.; Bethea, J.R.; Lee, J.K. Hematogenous macrophage depletion reduces the fibrotic scar and increases axonal growth after spinal cord injury. *Neurobiol. Dis.* **2015**, *74*, 114–125. [[CrossRef](#)]
24. Dias, D.O.; Kalkitsas, J.; Kelahmetoglu, Y.; Estrada, C.P.; Tatarishvili, J.; Holl, D.; Jansson, L.; Banitalebi, S.; Amiry-Moghaddam, M.; Ernst, A.; et al. Pericyte-derived fibrotic scarring is conserved across diverse central nervous system lesions. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 5501. [[CrossRef](#)]
25. Bellver-Landete, V.; Bretheau, F.; Mailhot, B.; Vallières, N.; Lessard, M.; Janelle, M.E.; Vernoux, N.; Tremblay, M.-È.; Fuehrmann, T.; Shoichet, M.S.; et al. Microglia are an essential component of the neuroprotective scar that forms after spinal cord injury. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 518. [[CrossRef](#)]
26. Li, Y.; Ritzel, R.M.; Khan, N.; Cao, T.; He, J.; Lei, Z.; Matyas, J.J.; Sabirzhanov, B.; Liu, S.; Li, H.; et al. Delayed microglial depletion after spinal cord injury reduces chronic inflammation and neurodegeneration in the brain and improves neurological recovery in male mice. *Theranostics* **2020**, *10*, 11376–11403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Brifault, C.; Gras, M.; Liot, D.; May, V.; Vaudry, D.; Wurtz, O. Delayed pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide delivery after brain stroke improves functional recovery by inducing m2 microglia/macrophage polarization. *Stroke* **2015**, *46*, 520–528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Evans, T.A.; Barkauskas, D.S.; Myers, J.T.; Hare, E.G.; You, J.Q.; Ransohoff, R.M.; Huang, A.Y.; Silver, J. High-resolution intravital imaging reveals that blood-derived macrophages but not resident microglia facilitate secondary axonal dieback in traumatic spinal cord injury. *Exp. Neurol.* **2014**, *254*, 109–120. [[CrossRef](#)]
29. Vinhas, A.; Almeida, A.F.; Gonçalves, A.I.; Rodrigues, M.T.; Gomes, M.E. Magnetic stimulation drives macrophage polarization in cell to-cell communication with IL-1 β primed tendon cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Li, Y.; He, X.; Kawaguchi, R.; Zhang, Y.; Wang, Q.; Monavarfeshani, A.; Yang, Z.; Chen, B.; Shi, Z.; Meng, H.; et al. Microglia-organized scar-free spinal cord repair in neonatal mice. *Nature* **2020**, *587*, 613–618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Olah, M.; Menon, V.; Habib, N.; Taga, M.F.; Ma, Y.; Yung, C.J.; Cimpean, M.; Khairallah, A.; Coronas-Samano, G.; Sankowski, R.; et al. Single cell RNA sequencing of human microglia uncovers a subset associated with Alzheimer’s disease. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 6129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Article IV

Comparison of the effects of two therapeutic strategies based on olfactory ensheathing cell transplantation and repetitive magnetic stimulation after spinal cord injury in female mice

Delarue Q, Robac A, Massardier R, Marie JP, Guérout N.

Journal of Neuroscience Research. 2021 May 7. DOI: 10.1002/jnr.24836

Introduction article IV

La transplantation de bCGOs et la rTSMS ont toutes les deux montré leur efficacité dans le traitement des LMTs. Chacune de ces deux thérapies semblent induire des mécanismes à la fois communs mais aussi différents dans l'induction de la régénération médullaire. Une approche multimodale combinant les effets de différentes thérapies est une idée envisagée depuis longtemps. Nous avons donc voulu dans cette étude, comparer les effets de la transplantation de bCGOs à l'utilisation de la rTSMS ainsi que combiner ces deux approches dans un modèle de LMT chez la souris.

Pour cela, après la LMT, les animaux ont reçu soit une transplantation de bCGOs au moment de la lésion, soit la rTSMS pendant 14 jours dès le lendemain de la lésion, ou soit l'addition des deux thérapies. Après avoir vérifié que la rTSMS ne modulait pas la survie des bCGOs transplantées, les effets des paradigmes thérapeutiques ont été étudiés par une analyse de la récupération motrice et la régénération médullaire 60 jours après la LMT.

Ce travail a fait l'objet d'une publication en 2021, « *Comparison of the effects of two therapeutic strategies based on olfactory ensheathing cell transplantation and repetitive magnetic stimulation after spinal cord injury in female mice* », dans le journal *Journal of Neuroscience Research* dans laquelle je suis premier auteur.

RESEARCH ARTICLE

Comparison of the effects of two therapeutic strategies based on olfactory ensheathing cell transplantation and repetitive magnetic stimulation after spinal cord injury in female mice

Quentin Delarue^{1,2} | Amandine Robac^{1,2} | Romane Massardier^{1,2} | Jean-Paul Marie^{1,2} |
Nicolas Guérout^{1,2} 

¹Normandie Univ, UNIROUEN, EA3830-GRHV, Rouen, France

²Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Rouen, France

Correspondence

Quentin Delarue and Nicolas Guérout, Normandie Univ, UNIROUEN, EA3830-GRHV, 76000 Rouen, France.
Email: quentin.delarue@univ-rouen.fr (Q. D.) and nicolas.guerout@univ-rouen.fr (N. G.)

Funding information

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

Abstract

Spinal cord injury (SCI) is a debilitating condition, which leads to a permanent loss of functions below the injury site. The events which take place after SCI are characterized by cellular death, release of inhibitory factors, and inflammation. Many therapies have been studied to cure SCI, among them magnetic stimulation aims to reduce the secondary damages in particular by decreasing apoptosis, while, cellular transplantation promotes neuroregeneration by enhancing axonal regrowth. In the present study, we compared individually primary olfactory ensheathing cell (OEC) transplantation and repetitive trans-spinal magnetic stimulation (rTSMs) and then, we combined these two therapeutic approaches on tissue repair and functional recovery after SCI. To do so, SCIs were performed at Th10 level on female C57BL/6 mice, which were randomized into four groups: SCI, SCI + primary bOECs, SCI + STM, SCI + primary bulbar olfactory ensheathing cells (bOECs) + stimulation (STM). On these animals bioluminescence, immunohistological, and behavioral experiments were performed after SCI. Our results show that rTSMs has beneficial effect on the modulation of spinal scar by reducing fibrosis, demyelination, and microglial cell activation and by increasing the astroglial component of the scar, while, primary bOEC transplantation decreases microglial reactivity. At the opposite, locotronic experiments show that both treatments induce functional recovery. We did not observe any additional effect by combining the two therapeutic approaches. Taken together, the present study indicates that primary bOEC transplantation and rTSMs treatment act through different mechanisms after SCI to induce functional recovery. In our experimental paradigm, the combination of the two therapies does not induce any additional benefit.

KEYWORDS

glial scar, magnetic stimulation, olfactory ensheathing cells and neuroregeneration, rehabilitation, RRID:AB_10563302: PDGFR β , Abcam, ab91066, RRID:AB_10643424: PE,

Amandine Robac and Romane Massardier contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2021 The Authors. *Journal of Neuroscience Research* published by Wiley Periodicals LLC

poly4064, BioLegend, 406408, RRID:AB_2313568: Jackson ImmunoResearch, 711-166-152, RRID:AB_2340667: Jackson ImmunoResearch, 712-165-153, RRID:AB_2340812: Jackson ImmunoResearch, 715-165-140, RRID:AB_2715913: Alexa 488, MRG2b-85, BioLegend, RRID:AB_306827: p75, Abcam, ab8874, RRID:AB_476889: GFAP Cy3-conjugated Sigma-Aldrich, C9205, RRID:AB_777165: PDGFR β Abcam ab32570, RRID:AB_839504: Iba1, Wako, 019-19741, RRID:AB_94975: MBP, Millipore, MAB386, RRID:IMSR_JAX:008450: L2G85Chco+/+ (FVB-Tg(CAG-luc,-GFP)L2G85Chco/J), spinal cord injury

Significance

Olfactory ensheathing cell (OEC) transplantation and repetitive magnetic stimulation are two distinct promising therapies, which induce tissue repair and functional recovery after spinal cord injury (SCI). However, the comparison between these two therapeutic approaches and the effects of their combination are not known. In our study, we report that rMS has beneficial effect on the modulation of the scar whereas bOEC transplantation decreases inflammation and both treatments enhance functional recovery. Our results demonstrate also that the combination of these two therapies has no additional effect. Altogether, we hypothesize that these two treatments promote recovery after SCI by different mechanisms.

1 | INTRODUCTION

Spinal cord injury (SCI) is an incurable disease, which leads to a permanent loss of motor, and sensitive functions below the injury site (Ahuja et al., 2020). Indeed, SCI induces an interruption of the afferent and efferent pathways due to the disruption of axonal tracts. However, recently, several approaches have been described as able to enhance recovery after SCI. Indeed, we can cite the complex strategy used by Tabakow et al., based on olfactory ensheathing cell (OEC) transplantation with peripheral nerve bridging or the development of new technology using innovative implanted pulse generator which, in both cases, have demonstrated impressive functional results when applied to paraplegic patients (Tabakow et al., 2014; Wagner et al., 2018). Unfortunately, despite these promising results, to date no cure can be offered to the vast majority of injured patients.

Right after the initial physical damages, a cascade of secondary events take place into the lesioned spine (Grégoire et al., 2015; Stenudd et al., 2015). These secondary events begin by the disruption of axons and the release of myelin debris which induce inflammation by the activation of the resident microglial cells and the infiltration of the blood-derived immune cells (O'Shea et al., 2017). Then, resident astrocytes become hypertrophic and overexpress GFAP. At the same time, ependymal cells which are the spinal cord stem cells, proliferate, migrate into the parenchyma, and differentiate into astrocytes; in the same way, type A pericytes give rise to stromal cells (Göritz et al., 2011; Meletis et al., 2008). All these cellular events lead to scar formation. This scar, initially described as a glial scar, is composed of several cellular types which play a dual inhibitory/permissive role (Anderson et al., 2016; Sabelström et al., 2013). Indeed, the scar is composed of astrocytes from two

origins, resident astrocytes and ependymal cells which constitute the glial component of the scar and stromal cells derived from pericytes which constitute the fibrotic component of it. It has been described that, mainly, the fibrotic scar plays an inhibitory role whereas the glial scar constitutes a permissive environment which enhances axonal regrowth (Anderson et al., 2016; Dias et al., 2018). These precise cellular events have been described using different transgenic mouse lines, it is important to note that the processes which take place after SCI in the other mammals such as rats or Humans are not so well described and can differ from one species to another.

Thereby, two different approaches have been proposed as treatment after SCI. The main purpose of the first approach is looking for reducing the secondary damages which take place after SCI; such as neuronal and oligodendroglial death, axonal dieback or release of myelin debris (Abbaszadeh et al., 2020). Several treatments have been tested, among them chondroitinase ABC and anti-Nogo-A are very promising therapies which have been applied with success in both Humans and rodents (Kucher et al., 2018; Muir et al., 2019; Schneider et al., 2019).

The second approach is based on promoting neuroregeneration by enhancing axonal regrowth or replacing lost cells (Ahuja et al., 2020). Indeed, based on several experimental paradigms, studies have reported that functional recoveries can be promoted after SCI in rodents by using neurotrophic factors infusion, cell transplantation, peripheral nerve graft, or combination of different treatments (Decherchi et al., 1997; Kanno et al., 2014; Thornton et al., 2018). In Humans this second approach is mainly based on cell transplantation. Thereby, several trials have been already conducted using autologous stem or differentiated cells (Ahuja et al., 2020; Badner et al., 2017).

Especially, we and others, have demonstrated that OEC transplantation based therapy can promote, in rodent models, functional recovery, and axonal regrowth (Delarue et al., 2020; Khankan et al., 2016; Mayeur et al., 2013).

Recently, a new strategy has emerged, based on the modulation of the spinal scar which takes place after SCI. As we described above, mainly two populations of cells constitute the spinal scar after SCI in mice; astrocytes and fibroblasts (Dias et al., 2018; Göritz et al., 2011). In taking advantage of optogenetic stimulations in transgenic mouse lines, it has been described, that modulation of these cellular populations in particular, by reducing the fibrotic component of the scar can induce axonal regrowth and enhance functional recovery (Dias et al., 2018). These results are a proof of principle that the cellular populations which compose the spinal scar per se can be modulated and not only the molecular components of it.

Newly, we have described that the spinal scar can be modulated using a focal and non-invasive repetitive trans-spinal magnetic stimulation (rTSMS) paradigm (Chalfouh et al., 2020). Indeed, when applied during 14 consecutive days, rTSMS treatment decreases fibrosis and enhances functional recovery (Chalfouh et al., 2020). In our study, we show that rTSMS decreases fibrosis and increases astroglial scar by enhancing ependymal cells' proliferation and their contribution to the scar by their differentiation into astrocytes and oligodendrocytes. Moreover, rTSMS decreases apoptosis which leads to neuronal survival and axonal regrowth (Chalfouh et al., 2020).

Altogether, it appears that cell transplantation and magnetic stimulation can promote recovery after SCI by different cellular and molecular mechanisms. A recent study have compared and combined several strategies based on stem cell transplantation and repetitive transcranial magnetic stimulation in rats (Guo et al., 2020). However, to our knowledge, our study is the first one to compare

and combine rTSMS and OEC transplantation after SCI. That is why we propose here to compare and combine these two therapies in a severe SCI model in mice.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | 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 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).

2.2 | Animals

Female mice group housed (two to five mice/cage) in secure conventional rodent facilities on a 12-hr light/dark cycle with constant access to food and water.

A total of 54 mice were included in this study (Figure 1). We used two mouse lines in this study (48 wild type (WT) C57BL/6 mice and 6 Tg (CAG-luc,-GFP) L2G85Chco^{+/+} (FVB-Tg(CAG-luc,-GFP) L2G85Chco/J) mice called Luciferase (LUX) thereafter). LUX mice were obtained from the Jackson Laboratory (<https://www.jax.org/strain/008450>, RRID:IMSR_JAX:008450). Then, LUX mice have been crossed with C57BL/6 mice three times consecutively to be sure to avoid any problem related to the strains.

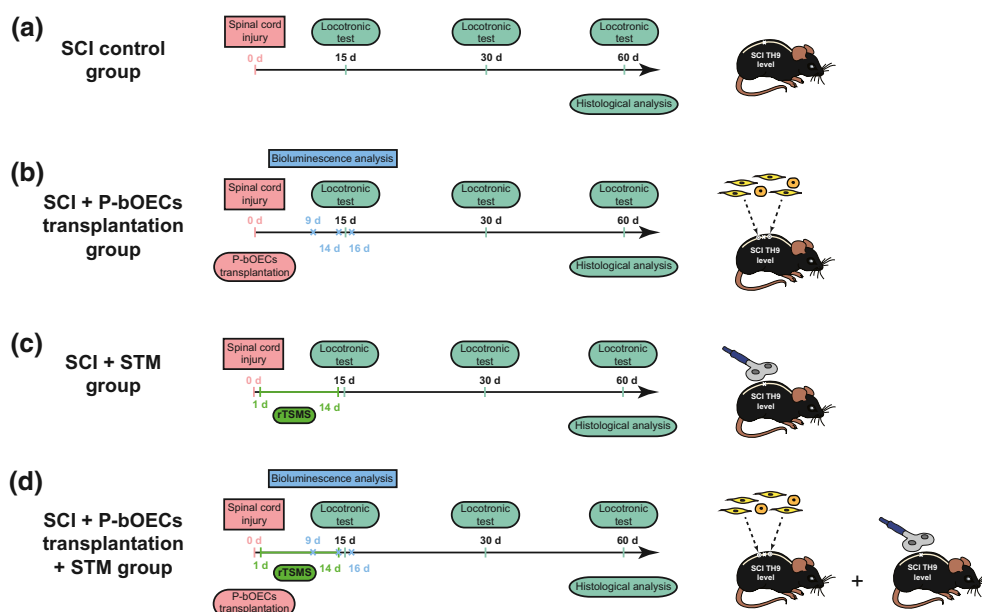


FIGURE 1 Experimental paradigm illustrating the timeline of the major experimental manipulations [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](https://onlinelibrary.wiley.com)]

Eight WT mice have been used to characterize the primary bOECs cultures.

Our study was composed of four main experimental groups:

SCI control group: animals received spinal cord injury ($N = 10$).

SCI + bOEC group: animals received spinal cord injury and primary bOEC transplantation ($N = 10$).

SCI + STM group: animals received spinal cord injury and rTMS treatment during 14 days ($N = 10$).

SCI + bOECs + STM group: animals received spinal cord injury and primary bOEC transplantation and rTMS treatment during 14 days ($N = 10$).

Transplanted primary bOECs was obtained from LUX \pm mice ($n = 6$).

An overview of the paradigms used in this study is presented in Figure 1.

All the experiments were carried out and distributed between three different researchers. SCI, primary OB cultures, and transplantations have been performed by one researcher who performed also histological experiments and statistical analysis, whereas magnetic stimulation, bioluminescence, and locotronic experiments have been performed independently by two other researchers.

2.3 | Primary olfactory bulb culture and cell transplant preparation

Olfactory bulb (OB) primary cultures were prepared as described previously (Delarue et al., 2020; Guérout et al., 2010). Briefly, after anesthesia with 2% of isoflurane (Iso-Vet, Osalia, Paris, France), mice were euthanized by decapitation and OBs were removed from the brain and put in cold PBS. The tissue were dissociated first by trypsinization 0.25% (2.5% Trypsin 10X, 15090-046, Thermofisher) and then mechanically. After dissociation cells were cultured in T25 flask with 5 ml of DF-10S media. DF10s was reconstituted with DMEM:F12 + glutamax, 0.5% Penicillin/Streptomycin, and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (30 min at 56°C). Three 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.

2.4 | Flow cytometry and bOEC characterization

Cells were characterized by flow cytometry 3 weeks after plating ($n = 8$ WT mice). For analysis, the number of primary bOECs were adjusted to a density of 2×10^5 cells/ml in phosphate-buffered saline (PBS)/bovine serum albumin (BSA) solution. TruStain FcX™ PLUS (BioLegend) was added to block non-specific binding. Characterization was performed using rabbit anti-p75 nerve growth factor receptor (p75, Abcam, ab8874, RRID:AB_306827) and rat anti-platelet-derived growth factor β (PDGFR β , Abcam, ab91066, RRID:AB_10563302) primary antibodies. P75 positive (with a

p75high or a p75low expression) and PDGFR β negative cells were defined as OECs. PDGFR β positive and P75 negative cells were identified as stromal cells. Primary antibodies were revealed with the anti-rabbit phycoerythrin fluorochrome-conjugated (PE, poly4064, BioLegend, 406408, RRID:AB_10643424) and the anti-rat Aexafluor 488 fluorochrome-conjugated antibodies (AF488, MRG2b-85, BioLegend, RRID:AB_2715913). Data were analyzed using FlowJo software (version 10.3; FlowJo LLC).

2.5 | Surgical procedure and cell transplantation

Mice received 30 min before surgery an intramuscular injection of nalbuphine hydrochloride (10 mg/ml, Mylan, Canonsburg, PA). Then, mice were anesthetized with 2% of isoflurane during the entire surgery (Iso-Vet, Osalia, Paris, France). Animal's body temperature has been kept steady at 37°C with a heating pad during entire surgical intervention. SCI were performed at T10 level as described previously (Li et al., 2016). 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. Posterior part of vertebrae was countersunk in order to create an ample space for lesion. After laminectomy, the dura mater was removed and a complete transection of the spinal cord was performed with 25-gauge needle, right after the lesion, bOECs were transplanted (Figure 1). To facilitate cells transplantation, a stereotaxic frame with its micromanipulator arm (World Precision Instrument) was used. Thus, primary bOECs were injected using a 1-mm sterile glass capillary needle, which was attached to the micromanipulator. Injections were delivered at 0.6 mm depth, 0.4 mm from the midline at the left, 5 mm rostrally, and caudally from the lesion site. A total of two injections ($2 \times 2 \mu$ l), which contained 25.000 cells/ μ l, was delivered. Each injectate was carefully delivered within 1 min.

After surgery, mice underwent daily check, none of them showed neither skin lesion, infection, nor autophagy throughout the study.

2.6 | 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^{+/-} primary bOECs was monitored during 2.5 weeks via intraperitoneal injections of D-Luciferin (0.3 mg/g body weight) at 9, 14, and 16 days after SCI and measurements of the photon counts were performed as previously described using Brucker molecular imaging software (Delarue et al., 2020).

2.7 | rTMS treatment

rTMS 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 manufacturer's device manual. The area stimulated was 1.5cm². 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.

rTMS treatment was applied at a frequency of 10Hz, 10 min per day during 14 days, the day after SCI (Figure 1). Stimulation protocol consisted of 10s stimulation followed by 20s of rest. Mice were kept anesthetized with 2% of isoflurane during stimulation, the equivalent anesthesia were used for untreated animals. Peak magnetic intensity at the experimental distance was 0.4T.

2.8 | Tissue preparation and sectioning

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 cryo-protected in 30% sucrose (Life Technologies, Carlsbad, CA) for at least 48 hr. After embedding in Tissue-Tek OCT compound (Sakura, Tokyo, Japan), the spinal cords were cut sagittally to 20 µm thickness. Sections were collected accordingly to stereological principles (five sections per slide for sagittal sections) and stored at - 20°C until further use.

2.9 | 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 (PDGFRβ, Abcam, ab32570, RRID:AB_777165), mouse anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP Cy3-conjugated Sigma-Aldrich, C9205, RRID:AB_476889), rabbit anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1, Wako, 019-19741, Osaka, Japan, RRID:AB_839504), and rat anti-myelin basic protein (MBP, Millipore, MAB386, RRID:AB_94975).

After washing, antibody staining was revealed using species-specific fluorescence-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, 711-166-152, RRID:AB_2313568, 715-165-140, RRID:AB_2340812, 712-165-153, RRID:AB_2340667). Sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI; 1 µg/ml; Sigma-Aldrich) and coverslipped with Vectashield mounting media (Vector Labs, Burlingame, UK).

2.10 | Image acquisition analysis

Representative images of the lesion site were acquired using the Zeiss Apotome2 microscope set up at 60 days after SCI. For tissue analysis sagittal sections have been used. For each experimental group and staining, five animals were analyzed. The cross section of spinal cord showing the epicenter of the lesion was taken and analyzed for each animal. The image processing and assembly were acquired with Image J software.

2.11 | Quantification of immunohistochemically stained areas

Three to five sections per animal were observed in order to determine the epicenter of the lesion. Then, an image of the epicenter was taken and analyzed. On these sagittal sections, the GFAP-, PDGFRβ+, and MBP- areas were measured. To standardize Iba1 measurement, analysis of intensity was performed on rectangle of 6 µm × 2 µm. Iba1 intensities were collected after threshold standardization.

2.12 | Locotronic test: Foot misplacement apparatus

Experiments have been performed as described previously by Chort et al. (Intellibio, Nancy, France) (Chort et al., 2013). The equipment consists of a flat ladder on which the animal can move from the starting zone toward 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 the day before the surgery to provide baseline data. Experiment were performed three times 15, 30, and 60 days after SCI.

2.13 | Statistical analysis

2.13.1 | Statistical analyses have been carried out blindly

All data are presented as means ± standard deviation (SD). Shapiro tests were performed for assessing data distribution. These tests reveal that our data are not normally distributed. That is why non-parametric tests have been performed. Comparison of means were

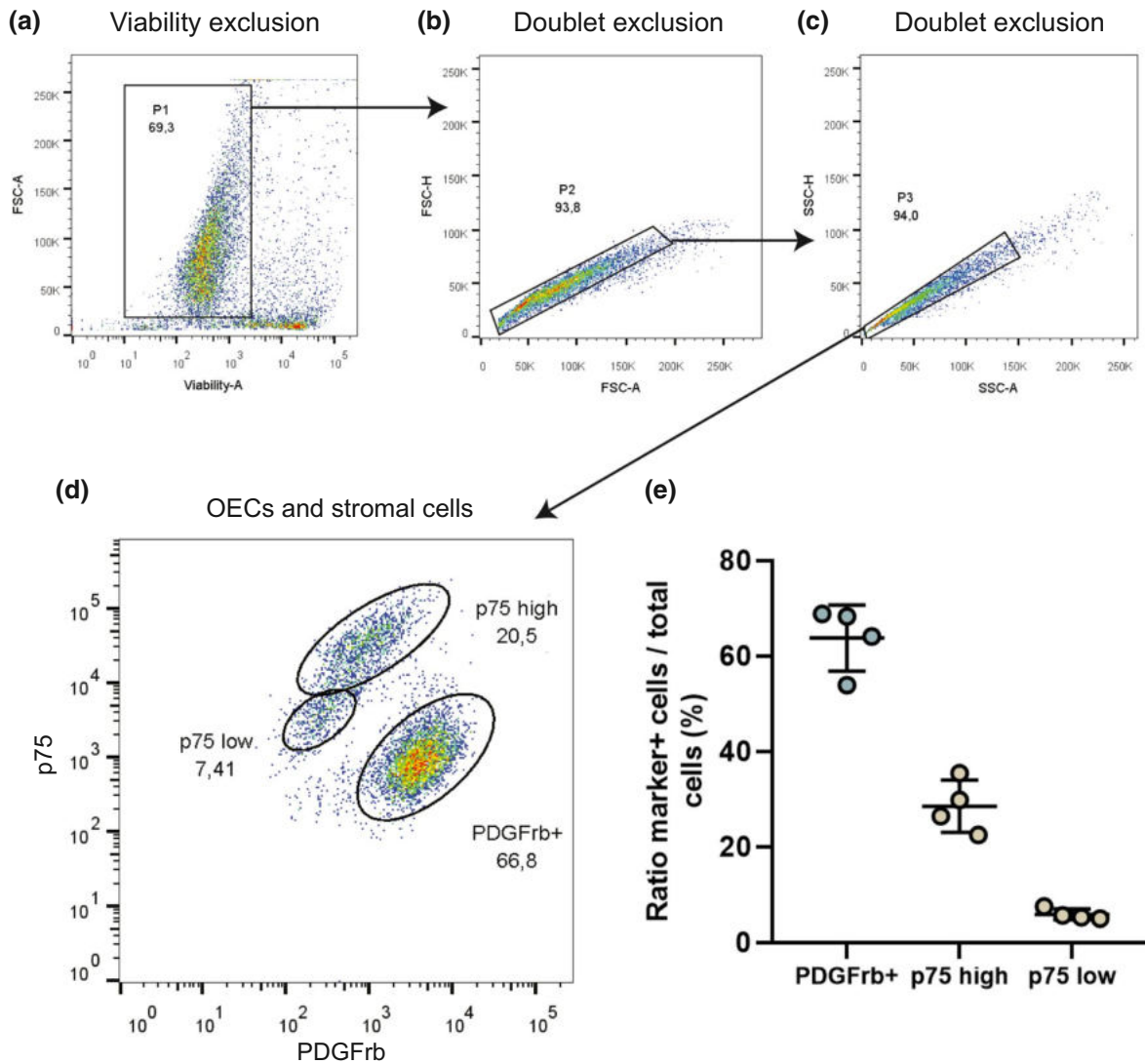


FIGURE 2 Cellular characterization of bOEC primary culture by flow cytometry. Cells are isolated after (a) viability exclusion and (b and c) doublet exclusion. (d) Cells are characterized using anti-p75 and anti-PDGFr β antibodies. Olfactory ensheathing cells (OECs) were defined as p75high or p75low positive and PDGFr β negative cells. Stromal cell was defined as PDGFr β positive (PDGFr β +) and p75 negative cells. (e) Cell ratio in the bOEC primary culture. Dot plots represent mean \pm standard deviation. $N = 4$ per group. All experiments were conducted in duplicate [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

performed using Mann–Whitney test for Figure 3. Comparison of medians was performed using Kruskal–Wallis tests for Figures 4–6. In all tests, $p < 0.05$ were considered statically significant.

3 | RESULTS

3.1 | Characterization of the two cell populations in primary bOEC cultures

To determine the cell populations present in the primary OB cultures, flow cytometry analyses were performed. After viability exclusion (Figure 2a) and two doublet exclusions (Figure 2b,c), flow cytometry revealed that primary bOEC cultures contain two distinct populations of cells; fibroblasts (PDGFr β positive cells) and OECs

(p75 positive cells). In effect, in these cultures, $63.8\% \pm 6.9\%$ of the cells were PDGFr β positive and $34.4\% \pm 6.4\%$ cells were p75 positive. The p75 population was in fact, as previously described by our laboratory in rats (Honoré et al., 2012), composed of two subpopulations, one which expresses low level of p75 ($5.9\% \pm 1.1\%$) called p75 low and one which expresses high level of p75 ($28.5\% \pm 5.5\%$), called p75 high (Figure 2d,e).

3.2 | The survival of transplanted primary bOECs is not influenced by rTSMs treatment

Before to compare the effects of the two therapies and there combined effects on functional recovery and tissue repair, we analyzed the impact of rTSMs treatment on the survival of transplanted

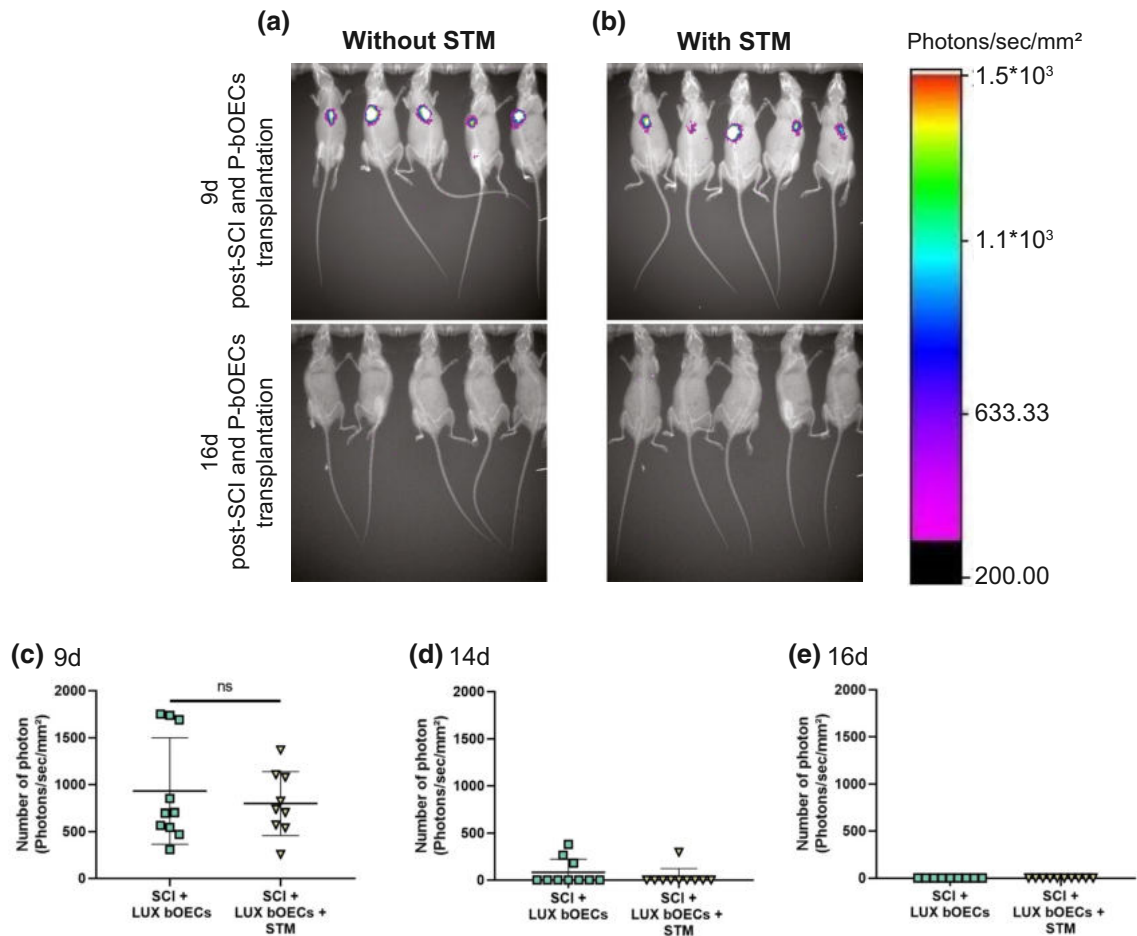


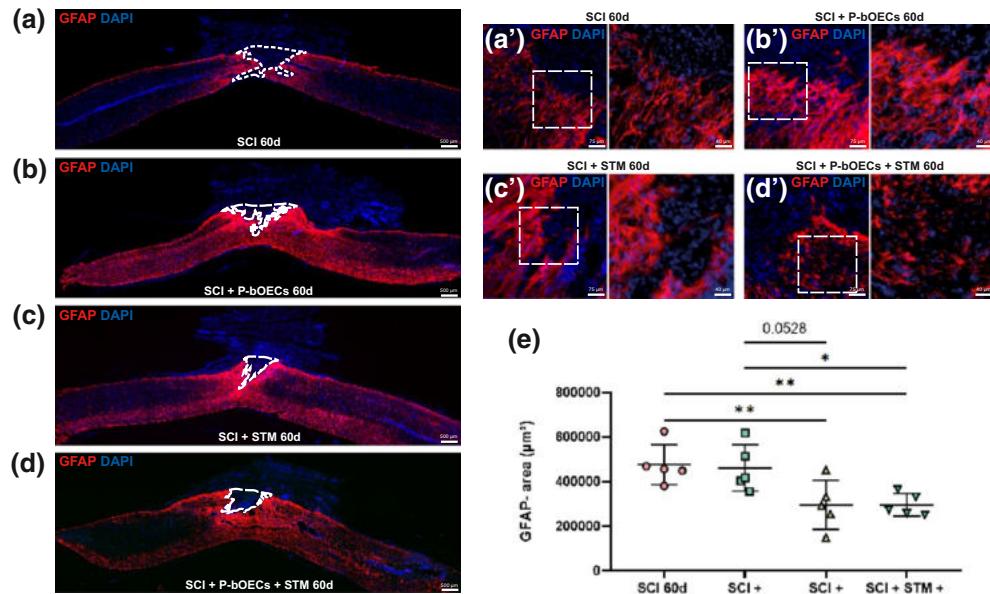
FIGURE 3 The survival of transplanted primary bOECs is not influenced by rTSMs treatment. (a and b) Representative images of luciferase+ (LUX) primary bOECs transplanted in mice stimulated or not at 9d and 16d after SCI. (c–e) Quantification of luciferase signals at (c) 9d, (d) 14d, and (e) 16d after SCI and/or rTSMs treatment. Quantifications are expressed as average \pm standard deviation. $N = 10$ per group. Statistical evaluations were based on Mann–Whitney test (ns = not significant) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

primary bOECs. We performed bOECs primary culture with cells obtained from LUX \pm mice. Then, using bioluminescence imaging system we followed the transplanted cells overtime. We transplanted the same number of cells ($100 \cdot 10^3$ cells) in 20 mice divided in two groups of 10 and in one of it, rTSMs treatment has been applied during 14 consecutive days (Figure 3a,b). By quantification of emitted photons, we measured in each group the number of remaining cells at 9 days, 14 days, and 16 days after SCI (Figure 3c–e). Our data show that there is no significant statistical difference between groups with and without rTSMs treatment. The number of surviving cells was the same in each group 9, 14, and 16 days after SCI. Specifically, surviving cells could be observed in all the mice in both groups of animals at 9 days after SCI (Figure 3c). Fourteen days after SCI, surviving cells could be found in only three mice in bOEC group and in only one mouse in STM group (Figure 3d). Sixteen days after SCI, we could not see any surviving cells in both groups of mice (Figure 3a,b, and e). These results suggest that rTSMs treatment does not affect the survival of the transplanted primary bOECs after SCI.

3.3 | rTSMs treatment modulates glial and fibrotic scars but not primary bOEC transplantation

In order to investigate the impact of the two therapies on tissue repair, we performed histological analyses on SCI, SCI + primary bOECs, SCI + STM, and SCI + primary bOECs + STM groups 60 days after SCI. As the scar which takes place after SCI is mainly composed of astrocytes and fibroblasts, we measured the glial scar (Figure 4a–e) and the fibrotic scar (Figure 4f–j) after primary bOEC transplantation, rTSMs treatment, or the combination of the two therapies. To do so, in a first time we analyzed the GFAP negative (GFAP-) area, our results show that in SCI + primary bOEC group (Figure 4b,e) astrocytic scar is not statically different to the SCI control group (Figure 4a,e), whereas at the same time in rTSMs groups (STM and primary bOECs + STM groups), the “astrocyte-free” areas are smaller than in SCI control group (Figure 4c–e). Our results also show that in rTSMs groups (STM and primary bOECs + STM groups) the GFAP negative area is smaller than in bOECs transplanted group (Figure 4c–e).

Astrocyte



Stromal cell

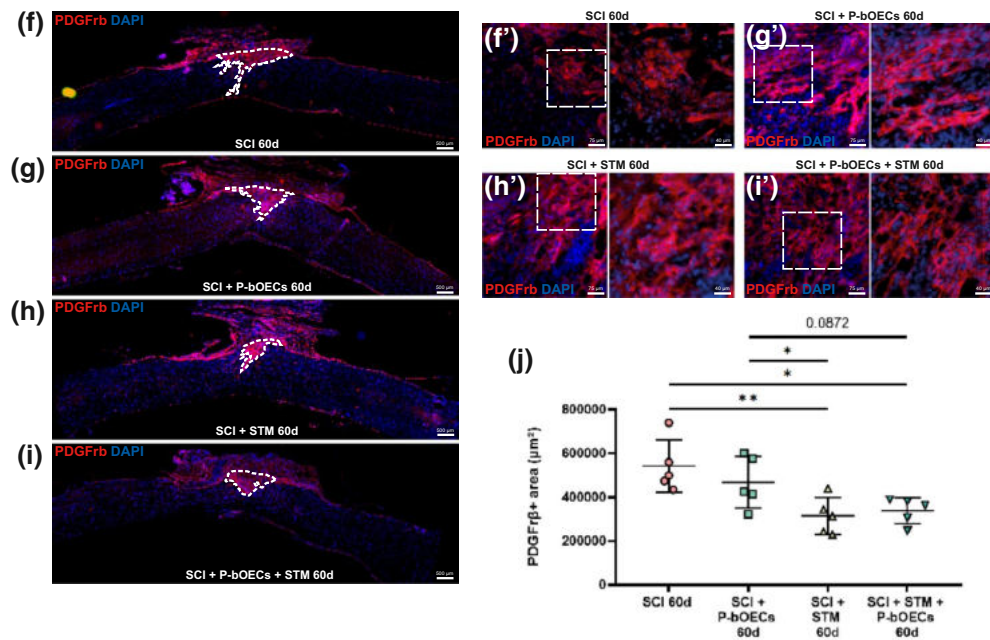
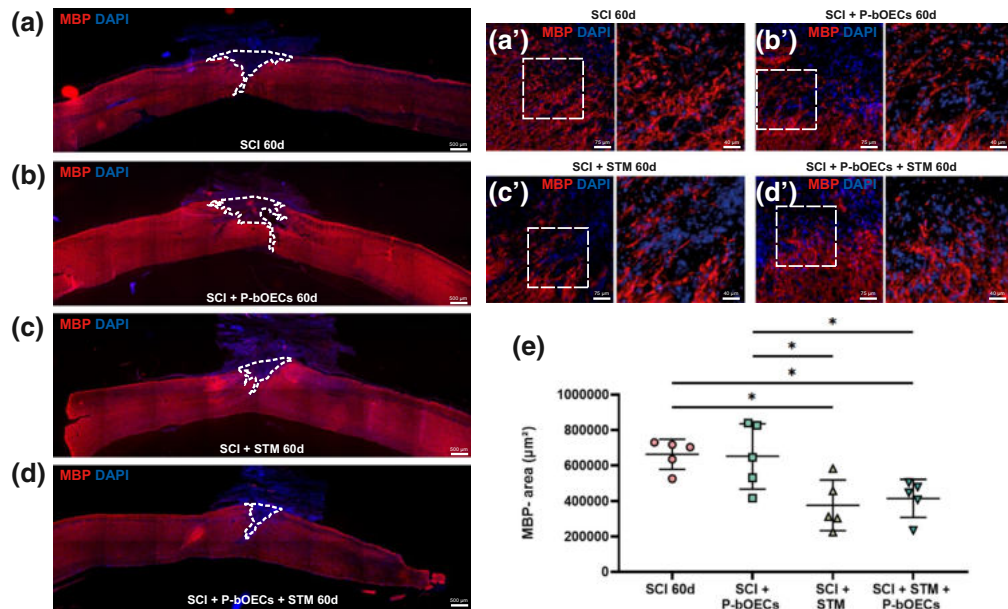


FIGURE 4 rTSMs treatment modulates glial and fibrotic scars but not primary bOEC transplantation. Representative pictures of sagittal spinal cord sections 60 days after SCI (a, b, c, d, f, g, h, and i 50× magnification) and border of the spinal cord scar (a', b', c', d', f', g', h', and i 200× magnification). (a and f) SCI control, (b and g) SCI + primary bOECs, (c and h) SCI + STM, (d and i) SCI + primary bOECs + STM. Sections were stained with (a–d) anti-GFAP antibody, (f–i) anti-PDGFr β antibody and DAPI. Dotted lines show (a–d) astrocytic negative area (GFAP $^-$) and (f–i) PDGFr β positive area (PDGFr β^+). (e and j) Quantitative analysis of (e) GFAP $^-$ areas and (j) PDGFr β^+ areas. Quantifications are expressed as average \pm standard deviation. $N = 5$ per group. Statistical evaluations were based on Kruskal–Wallis test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

To complete the scar analysis, in a second time, we quantified the PDGFr β positive area (PDGFr β^+). In the same way, our results show that the fibrosis component is reduced in SCI + STM (Figure 4h,j) and SCI + primary bOECs + STM (Figure 4i,j) groups but not in

SCI + primary bOEC group (Figure 4g,j), in comparison to SCI group (Figure 4f,j). It appears that in the rTSMs groups (STM and primary bOECs + STM groups) the PDGFr β^+ areas are smaller than in the transplanted primary bOEC group (Figure 4g–j).

Oligodendrocyte



Microglial cell/macrophage

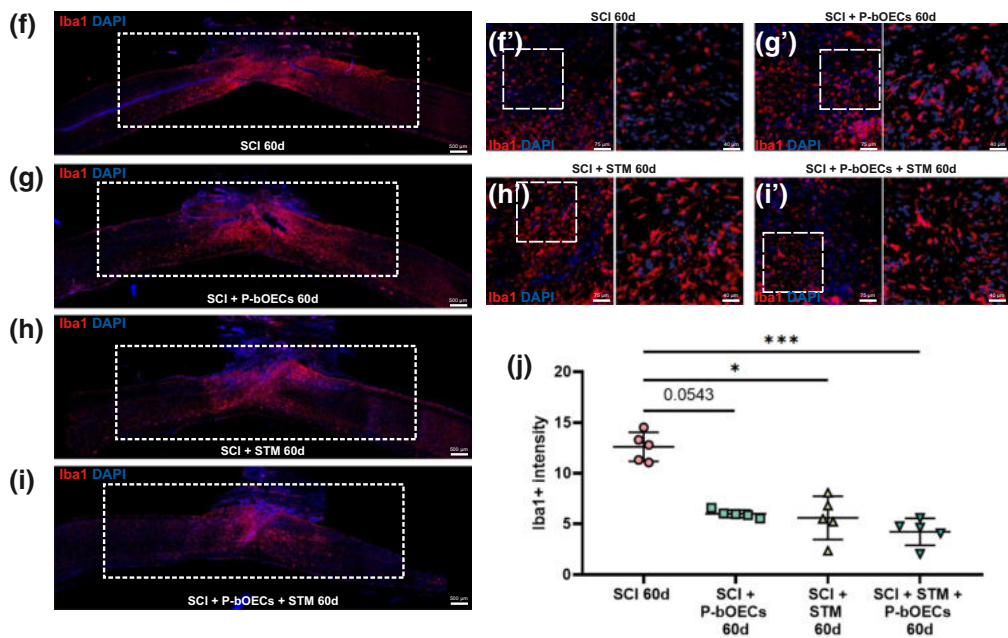


FIGURE 5 Primary bOEC transplantation and rTSMS treatment decrease microglial cells activation but only rTSMS treatment decreases demyelination. Representative pictures of sagittal spinal cord sections 60 days after SCI (a, b, c, d, f, g, h, and i 50x magnification) and border of the spinal cord scar (a', b', c', d', f', g', h', and i 200x magnification). (a and f) SCI control, (b and g) SCI + primary bOECs, (c and h) SCI + STM, (d and i) SCI + primary bOECs + STM. Sections were stained with (a-d) anti-MBP antibody, (f-i) anti-Iba1 antibody and DAPI. Dotted lines show (a-d) demyelinated area (MBP-). Rectangles show (f-i) Iba1 intensity areas measured. (e and j) Quantitative analysis of (e) MBP- area and (j) Iba1 intensity. Quantifications are expressed as average \pm standard deviation. $N = 5$ per group. Statistical evaluations were based on Kruskal-Wallis test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Altogether, these results show that only rTSMS treatment has an effect on the modulation of the spinal scar by decreasing fibrosis and increasing astroglial scar.

Cell morphology at the lesion epicenter has been also assessed for astrocytes (Figure 4a'-d') and for stromal cells (Figure 4f'-i'). Our analysis reveals that no change could be observed between groups.

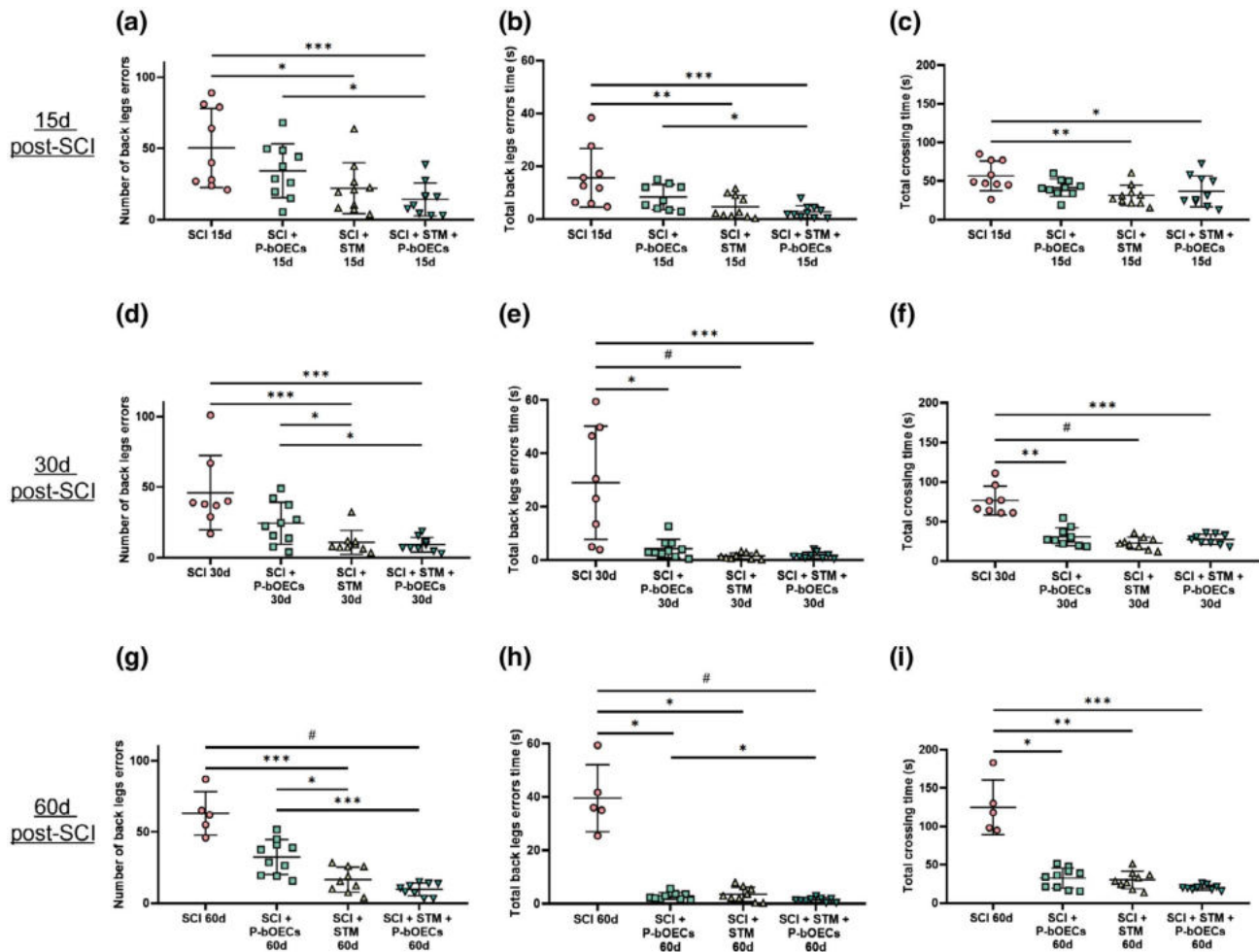


FIGURE 6 Primary bOEC transplantation and rTMS treatment enhance functional recovery after SCI. Quantification of locomotoric evaluation at (a–c) 15 days, (d–f) 30 days, and (g–i) 60 days after SCI. Parameters are (a, d, and g) number of back leg errors, (b, e, and h) total back leg error time and (c, f, and i) total crossing time. Quantifications are expressed as average \pm standard deviation. $N = 5$ –10 in control group and $N = 8$ –10 in SCI + primary bOECs, SCI + STM and SCI + primary bOECs + STM groups. Statistical evaluations were based on Kruskal–Wallis test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; # $p < 0.0001$) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

3.4 | Primary bOEC transplantation and rTMS treatment decrease microglial cell activation but only rTMS treatment decreases demyelination

To evaluate the therapies' effects on the other spinal cord cell populations, we investigated the myelination/demyelination process and the microglial cell reactivity in the SCI control, primary bOECs, STM, and primary bOECs + STM mice 60 days after SCI. We first analyzed demyelination process by using MBP staining (Figure 5a–e) and by quantification of the MBP⁻ areas. We found that MBP⁻ area is reduced in SCI + STM (Figure 5c) and SCI + primary bOECs + STM (Figure 5d) groups whereas primary bOECs alone had no effect on this parameter in comparison to the control SCI group (Figure 5a,b,e). Our results demonstrate also that in the rTMS groups (STM and primary bOECs + STM groups) the MBP negative areas are smaller than in primary bOEC group (Figure 5b–e).

We further investigated the effects of these therapies on microglial cells activation by Iba1 intensity quantification (Figure 5f–j). By quantifying an area of 12 mm² including lesion core and the

caudal and rostral parts spaced 3 mm from the epicenter of the lesion, it appears that all therapies (primary bOECs, STM, and primary bOECs + STM groups) decrease microglial cells activation (Figure 5f–j). Our results show that there is no difference between treated groups (Figure 5g–j).

Cell morphology at the lesion epicenter have been also assessed for oligodendrocytes (Figure 5a'–d') and for microglia/macrophage cells (Figure 5f'–i'). Our analysis reveals that no change could be observed between groups.

3.5 | Primary bOEC transplantation and rTMS treatment enhance functional recovery after SCI

To correlate the beneficial effects of primary bOEC transplantation and rTMS treatment obtained on tissue repair, with functional recovery, we conducted sensorimotor test. To do so, we used locomotoric test which allows to measure three distinct and complementary parameters: the number of back leg errors (Figure 6a,d,g),

the total back leg error time (Figure 6b,e,h), and the total crossing time (Figure 6c,f,i). We performed these tests 15 (Figure 6a–c), 30 (Figure 6d–f), and 60 (Figure 6g–i) days after SCI.

Our results showed that at 15 days post-SCI, only rTSMS-based treatment (STM and primary bOECs + STM groups) improves functional recovery. Indeed, the number of back leg errors, the total back leg error time, and the total crossing time were lower in the two rTSMS groups (STM and primary bOECs + STM groups) in comparison to the SCI control group.

More interestingly, our analysis shows that 30 days after SCI, primary bOEC transplantation alone induced functional recovery compared to the SCI control group, observable by the reduction of the total back leg error time and the total crossing time (Figure 6e,f). As described at 15 days after SCI, it appears also that rTSMS-based treatment (STM and primary OECs + STM groups) induces functional recovery for all the parameters tested (Figure 6d–f).

Lastly, we performed this test at 60 days after SCI, we found the same results as at 30 days after SCI. All therapies (primary bOECs, STM, and primary bOECs + STM) induce functional recovery regarding the total back leg error time and the total crossing time (Figure 6h,i). Only rTSMS-based therapy (STM and primary bOECs + STM groups) showed significant differences in the number of back leg errors (Figure 6g).

Our locotronic test results also show that rTSMS treatment (STM or primary bOECs + STM groups) reduces the number of back leg errors in comparison to the primary bOEC group for all the time points analyzed (Figure 6a,d,g).

4 | DISCUSSION

The main purpose of our study was to compare and combine two therapies, primary bOEC transplantation and rTSMS treatment, after SCI. To do so, three treated groups of mice (1-primary bOECs, 2-rTSMS, and 3-primary bOECs + rTSMS) have been used and compared to untreated mice (SCI group). No control group has been added to the experimental design due to the fact that the main point was to compare the potential benefits obtained after treatment to untreated animals after SCI.

In our study, we demonstrated that both; primary bOEC transplantation and rTSMS treatment can enhance functional recovery after SCI (Figure 6). Our results also show that these two clinically relevant treatments induce their effects by different molecular and cellular mechanisms. Indeed, immunohistological results indicate that only rTSMS treatment modifies the spinal scar by decreasing fibrosis and demyelination and increasing the astroglial component of the scar, whereas bOEC transplantation did not have a strong effect on these parameters (Figures 4 and 5). On the other hand, Iba1 intensity measurement indicates that both therapies reduce activation of microglial/macrophage cells (Figure 5). Finally, our results demonstrate, too, that there is no additional benefit when both therapies are applied together (Figures 4–6). In effect, neither

immunohistological data nor locotronic analyses show differences between STM and primary bOECs + STM groups.

It is very important to note that our histological analyses are based on the measurements of the different areas present at the epicenter of the lesion, which are representative of the different cellular populations which constitute the scar. Indeed, we measured the glial, fibrotic, and myelinated components of the scar based on GFAP, PDGFr β , and MBP staining, respectively. This method is one of the mostly used nowadays (Chalfouh et al., 2020; Delarue et al., 2020; Li et al., 2016, 2020). However, another method is currently used also, this method is based on intensity measurements, mainly GFAP intensity is assessed in order to evaluate gliosis and hypertrophic astrocytes. Based on GFAP intensity measurement, it has been described that OEC transplantation reduces gliosis after SCI (López-Vales, Forés, Navarro, et al., 2006; López-Vales, Forés, Verdú, et al., 2006; López-Vales et al., 2007; Wang et al., 2021). The fact that two distinct methods have been used to assess tissue repair after SCI and OEC transplantation can explain the differences between our results and some previously published studies where gliosis and hypertrophic astrocytes have been assessed.

In our study, we show that primary bOEC transplantation decreases inflammation. Our results are in agreement with previously published studies. Indeed, Khankan et al, have demonstrated that OEC transplantation facilitates neuroregeneration by modulation of the inflammatory responses (Khankan et al., 2016). More recently, the immunomodulatory role played by OECs after transplantation has been described (Zhang et al., 2021). In particular, in this study the authors show that OECs decrease inflammation at the lesion site *via* interleukin-1 receptor signaling pathway (Zhang et al., 2021).

It is now well described that OECs and in particular bOEC transplantation enhances functional recovery (Li et al., 1997; Watzlawick et al., 2016). In the vast majority of the previously published studies the most commonly used test is the The Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) score (Watzlawick et al., 2016). In contrast, in our study neurobehavioral recovery has been assessed using a computer-assisted test; the locotronic test. Our results are in agreement with those published previously by other teams, indeed they demonstrate that primary OEC transplantation induces functional recovery after SCI. In particular, our locotronic results show that primary OEC transplantation enhances locomotion 30 days and 60 days after SCI and transplantation. Interestingly, locotronic test shows that primary bOEC transplantation induces functional recovery but at a later time point than rTSMS treatment. Indeed, rTSMS enhances functional recovery 15 days after SCI whereas we could observe a significant increase of it in primary bOEC group only 30 days after SCI. These data related to “late” recovery are in agreement with our previously published study in rats, in which we showed that OEC transplantation enhances recovery only at 60 days after SCI (Mayeur et al., 2013).

To date, the precise mechanisms by which OECs play their key role during neurogeneration is still poorly described. In fact, OEC transplantation reduces axonal dieback and inflammation at the lesion site (Khankan et al., 2016; Zhang et al., 2021). Moreover, it has been also described that OEC transplantation modulates chondroitin

sulfate proteoglycan (CSPG) expression in injured spinal cord (Wang et al., 2021). Several studies have demonstrated as well that OECs secrete different neurotrophic factors (Blumenthal et al., 2013; Gu et al., 2017; Lipson et al., 2003). Phagocytic properties of OECs may also explain the positive role played by these cells in SCI context. Indeed, it has been described that OECs can phagocytose axon debris during development but also after transplantation into lesioned spinal cord (Lankford et al., 2008; Nazareth et al., 2015). We could hypothesize that after SCI and transplantation, OECs phagocytose axonal and myelin debris, known to strongly inhibit axonal regrowth, which may put in place a permissive microenvironment.

The precise role which is played by OECs after transplantation is difficult to characterize due to the fact that many studies have reported that the OECs survival is poor in injured spinal cords (Delarue et al., 2020; Khankan et al., 2016; Watzlawick et al., 2016). In fact, most studies have described that a very low ratio of OECs survived 2 week after SCI and transplantation and virtually no surviving cells could be found at 4 weeks (Reshamwala et al., 2019). Our bioluminescence results are in agreement with these studies. Indeed, we could not find any surviving cells 14 days after SCI and transplantation. We can hypothesize that the microenvironment which is put in place after SCI decreases OECs survival due to the release of inhibitory factors such as CSPG, myelin debris, and liberation of apoptotic factors which follow neurons and oligodendrocytes death. We and others have demonstrated that rMS can reduce apoptosis (Chalfouh et al., 2020; Dufor et al., 2019), that is why we assessed the survival rate of primary bOECs after rTSMS. Our results demonstrate that rTSMS treatment do not increase primary bOEC survival (Figure 3).

In our study, we demonstrate that rTSMS treatment modulates the spinal scar, in increasing its glial component and decreasing its fibrotic component. Moreover, our results show that rTSMS decreases inflammation and demyelination. These results confirm the data previously published by us and others (Chalfouh et al., 2020; Dufor et al., 2019). In effect, it is described that magnetic stimulation induces tissue repair after brain or spinal cord injuries (Chalfouh et al., 2020; Dufor et al., 2019). Both studies have described that one of the key roles plays by magnetic stimulation is to reduce apoptosis leading to among others neuronal survival (Chalfouh et al., 2020; Dufor et al., 2019). This specific role on apoptosis could explain why rTSMS induces "early" functional recovery. We confirm here that rTSMS treated mice show already at 15 days after SCI a statistically significant improvement of their locomotor functions (Chalfouh et al., 2020). It could also explain the positive role played by rTSMS on myelin preservation which in turn leads to neuronal survival and functional recovery. This specific role of magnetic stimulation on oligodendrocyte precursor cells (OPCs) has been already described in uninjured brain (Cullen et al., 2019). In fact, Cullen et al reported that in mice, magnetic stimulation promotes proliferation of OPCs and promotes also differentiation of OPCs to mature oligodendrocytes (Cullen et al., 2019). rTSMS plays a pleiotropic role after SCI by reducing inflammation, fibrosis, and apoptosis, which increase neuronal and oligodendroglial survival and by enhancing ependymal cells proliferation and their contribution to the lesion scar.

Altogether, the specificity of the potential roles played by both primary bOECs and rTSMS comforted us to combine these two therapies in SCI context. Surprisingly, our results show that there is no additional benefit when primary bOEC transplantation and rTSMS treatment are combined together. In effect, for all the parameters measured there is no difference between STM and primary bOECs + STM groups. Different hypotheses could be made to explain these results. The first one is that the magnetic field exert its effects on a larger spinal cord area than primary bOEC transplantation. Indeed, our magnetic coils stimulate an area of 1.5cm² whereas you could hypothesize that bOEC transplantation exerts their effects more locally. The second hypothesis is that rTSMS treatment and bOEC transplantation do not exert their main effects at the same time, which could explain the differences observed in locomotor test results between primary bOEC and STM groups. We can hypothesize that rTSMS, *via* reduction of apoptosis, exerts its main effects shortly after the beginning of the treatment whereas, at the opposite bOEC transplantation through neurotrophic factors secretion induces its effects at later time point. It could be of great interest to validate this hypothesis in combining rTSMS treatment, in beginning the day right after SCI and in transplanting bOECs 2 weeks later, the day after the end of rTSMS treatment. Moreover, this paradigm is more clinically relevant. Indeed, autologous OEC transplantation can be performed in Humans only after a culture step, it has been described that the necessary time to obtain the amount of cells needed for transplantation is around 12 days (Tabakow et al., 2014). Nevertheless, in our study, primary bOEC transplantation has been performed right after SCI because it has been reported that this experimental design is the most efficient one (Watzlawick et al., 2016).

In our study, primary bOECs and not purified bOECs have been transplanted due to the fact that several studies have described that the transplantation of primary bOECs is more efficient than transplantation of purified bOECs to enhance functional recovery after SCI (Watzlawick et al., 2016). Li et al have hypothesized that OB nerve fibroblasts may express regenerative properties after SCI which are linked to the specific role they play into the regeneration of the primary olfactory system (Li et al., 2005).

It is important to note that our study has been performed in female mice due to the fact that the disruption of the autonomic nervous system induces very severe urogenital complications such as necrosis of the penis due to persistent priapism. However, to our knowledge, the locomotor deficit observed after SCI are comparable between males and females (Fukutoku et al., 2020).

It could also be interesting to confirm our results in other animal models. Indeed, the cellular and molecular mechanisms which are involved after SCI are different between species. In mice the lesioned scar is mostly composed of glial and fibrotic cells without cystic cavity after contusive or penetrating injuries whereas at the opposite it is well described that in Humans after SCI large cavities are present into the lesioned spinal cord (Courtine & Sofroniew, 2019; Soderblom et al., 2013). That is why it could be of primary interest to evaluate the effects of the combination of these two therapies in an animal in which the secondary events which take place after SCI

are the same than those described in Humans such as rats or non-human primates.

DECLARATION OF TRANSPARENCY

The authors, reviewers and editors affirm that in accordance to the policies set by the *Journal of Neuroscience Research*, this manuscript presents an accurate and transparent account of the study being reported and that all critical details describing the methods and results are present.

ACKNOWLEDGMENTS

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

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no competing interests.

CONSENT FOR PUBLICATION

All authors have read the manuscript and indicated consent for publication.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, N.G.; Methodology, N.G. and Q.D.; Resources, J.-P.M.; Investigation, Q.D., A.R. and R.M.; Formal Analysis, N.G. Q.D., A.R., and R.M.; Writing, N.G. and Q.D - Original Draft, N.G. and Q.D.; Writing - Review & Editing, N.G. and Q.D.; Supervision, N.G.; Funding Acquisition, N.G.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and its Supporting Information.

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/jnr.24836>.

ORCID

Nicolas Guéroul  <https://orcid.org/0000-0003-0237-4981>

REFERENCES

- Abbaszadeh, F., Fakhri, S., & Khan, H. (2020). Targeting apoptosis and autophagy following spinal cord injury: Therapeutic approaches to polyphenols and candidate phytochemicals. *Pharmacological Research*, *160*, 105069. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105069>
- Ahuja, C. S., Mothe, A., Khazaei, M., Badhiwala, J. H., Gilbert, E. A., van der Kooy, D., Morshead, C. M., Tator, C., & Fehlings, M. G. (2020). The leading edge: Emerging neuroprotective and neuroregenerative cell-based therapies for spinal cord injury. *Stem Cells Translational Medicine*, *9*, 1509–1530. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0135>
- Anderson, M. A., Burda, J. E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T. M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B. S., Deming, T. J., & Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*, *532*, 195–200. <https://doi.org/10.1038/nature17623>
- Badner, A., Siddiqui, A. M., & Fehlings, M. G. (2017). Spinal cord injuries: How could cell therapy help? *Expert Opinion on Biological Therapy*, *17*, 529–541. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1308481>
- Blumenthal, J., Cohen-Matsliah, S. I., & Levenberg, S. (2013). Olfactory bulb-derived cells seeded on 3D scaffolds exhibit neurotrophic factor expression and pro-angiogenic properties. *Tissue Engineering Part A*, *19*, 2284–2291. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0090>
- Chalfouh, C., Guillou, C., Hardouin, J., Delarue, Q., Li, X., Duclos, C., Schapman, D., Marie, J.-P., Cosette, P., & Guéroul, N. (2020). The regenerative effect of trans-spinal magnetic stimulation after spinal cord injury: Mechanisms and pathways underlying the effect. *Neurotherapeutics*, *17*, 2069–2088. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00915-5>
- Chort, A., Alves, S., Marinello, M., Dufresnois, B., Dornbierer, J.-G., Tesson, C., Latouche, M., Baker, D. P., Barkats, M., El Hachimi, K. H., Ruberg, M., Janer, A., Stevanin, G., Brice, A., & Sittler, A. (2013). Interferon beta induces clearance of mutant ataxin 7 and improves locomotion in SCA7 knock-in mice. *Brain*, *136*, 1732–1745. <https://doi.org/10.1093/brain/awt061>
- Courtine, G., & Sofroniew, M. V. (2019). Spinal cord repair: Advances in biology and technology. *Nature Medicine*, *25*, 898–908. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0475-6>
- Cullen, C. L., Senesi, M., Tang, A. D., Clutterbuck, M. T., Auderset, L., O'Rourke, M. E., Rodger, J., & Young, K. M. (2019). Low-intensity transcranial magnetic stimulation promotes the survival and maturation of newborn oligodendrocytes in the adult mouse brain. *Glia*, *67*, 1462–1477. <https://doi.org/10.1002/glia.23620>
- Decherchi, P., Lammari-Barreault, N., Cochard, P., Carin, M., Réga, P., Pio, J., Péllissier, J. F., Ladaïque, P., Novakovitch, G., & Gauthier, P. (1997). CNS axonal regeneration within peripheral nerve grafts cryopreserved by vitrification: Cytological and functional aspects. *Cryobiology*, *34*, 214–239. <https://doi.org/10.1006/cryo.1997.2003>
- Delarue, Q., Mayeur, A., Chalfouh, C., Honoré, A., Duclos, C., Di Giovanni, M., Li, X., Salaun, M., Dampierre, J., Vaudry, D., Marie, J.-P., & Guéroul, N. (2020). Inhibition of ADAMTS-4 expression in olfactory ensheathing cells enhances recovery after transplantation within spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, *37*, 507–516. <https://doi.org/10.1089/neu.2019.6481>
- Dias, D. O., Kim, H., Holl, D., Werne Solnestam, B., Lundeberg, J., Carlén, M., Göritz, C., & Frisé, J. (2018). Reducing pericyte-derived scarring promotes recovery after spinal cord injury. *Cell*, *173*, 153–165.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.004>
- Dufor, T., Grehl, S., Tang, A. D., Doulazmi, M., Traoré, M., Debray, N., Dubacq, C., Deng, Z.-D., Mariani, J., Lohof, A. M., & Sherrard, R. M. (2019). Neural circuit repair by low-intensity magnetic stimulation requires cellular magnetoreceptors and specific stimulation patterns. *Science Advances*, *5*, eaav9847. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav9847>
- Fukutoku, T., Kumagai, G., Fujita, T., Sasaki, A., Wada, K., Liu, X., Tanaka, T., Kudo, H., Asari, T., Nikaido, Y., Ueno, S., & Ishibashi, Y. (2020, November 1). Sex-related differences in anxiety and functional recovery after spinal cord injury in mice. *Journal of Neurotrauma*, *37*(21), 2235–2243. <https://doi.org/10.1089/neu.2019.6929>
- Göritz, C., Dias, D. O., Tomilin, N., Barbacid, M., Shupliakov, O., & Frisé, J. (2011). A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science*, *333*, 238–242. <https://doi.org/10.1126/science.1203165>
- Grégoire, C.-A., Goldenstein, B. L., Floriddia, E. M., Barnabé-Heider, F., & Fernandes, K. J. L. (2015). Endogenous neural stem cell responses to stroke and spinal cord injury. *Glia*, *63*, 1469–1482. <https://doi.org/10.1002/glia.22851>
- Gu, M., Gao, Z., Li, X., Guo, L., Lu, T., Li, Y., & He, X. (2017). Conditioned medium of olfactory ensheathing cells promotes the functional recovery and axonal regeneration after contusive spinal cord

- injury. *Brain Research*, 1654, 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.10.023>
- Guérout, N., Derambure, C., Drouot, L., Bon-Mardion, N., Duclos, C., Boyer, O., & Marie, J.-P. (2010). Comparative gene expression profiling of olfactory ensheathing cells from olfactory bulb and olfactory mucosa. *Glia*, 58, 1570–1580. <https://doi.org/10.1002/glia.21030>
- Guo, M., Wu, L., Song, Z., & Yang, B. (2020). Enhancement of neural stem cell proliferation in rats with spinal cord injury by a combination of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) and human umbilical cord blood mesenchymal stem cells (hUCB-MSCs). *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 26, e924445-1–e924445-8. <https://doi.org/10.12659/MSM.924445>
- Honoré, A., Le Corre, S., Derambure, C., Normand, R., Duclos, C., Boyer, O., Marie, J.-P., & Guérout, N. (2012). Isolation, characterization, and genetic profiling of subpopulations of olfactory ensheathing cells from the olfactory bulb. *Glia*, 60, 404–413 <https://doi.org/10.1002/glia.22274>
- Kanno, H., Pressman, Y., Moody, A., Berg, R., Muir, E. M., Rogers, J. H., Ozawa, H., Itoi, E., Pearse, D. D., & Bunge, M. B. (2014). Combination of engineered Schwann cell grafts to secrete neurotrophin and chondroitinase promotes axonal regeneration and locomotion after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 34, 1838–1855. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2661-13.2014>
- Khankan, R. R., Griffis, K. G., Haggerty-Skeans, J. R., Zhong, H., Roy, R. R., Edgerton, V. R., & Phelps, P. E. (2016). Olfactory ensheathing cell transplantation after a complete spinal cord transection mediates neuroprotective and immunomodulatory mechanisms to facilitate regeneration. *Journal of Neuroscience*, 36, 6269–6286. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0085-16.2016>
- Kucher, K., Johns, D., Maier, D., Abel, R., Badke, A., Baron, H., Thietje, R., Casha, S., Meindl, R., Gomez-Mancilla, B., Pfister, C., Rupp, R., Weidner, N., Mir, A., Schwab, M. E., & Curt, A. (2018). First-in-man intrathecal application of neurite growth-promoting anti-nogo-A antibodies in acute spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair*, 32, 578–589. <https://doi.org/10.1177/1545968318776371>
- Lankford, K. L., Sasaki, M., Radtke, C., & Kocsis, J. D. (2008). Olfactory ensheathing cells exhibit unique migratory, phagocytic, and myelinating properties in the X-irradiated spinal cord not shared by Schwann cells. *Glia*, 56, 1664–1678. <https://doi.org/10.1002/glia.20718>
- Li, X., Floriddia, E. M., Toskas, K., Fernandes, K. J. L., Guérout, N., & Barnabé-Heider, F. (2016). Regenerative potential of ependymal cells for spinal cord injuries over time. *EBioMedicine*, 13, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.10.035>
- Li, Y., Field, P. M., & Raisman, G. (1997). Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science*, 277, 2000–2002. <https://doi.org/10.1126/science.277.5334.2000>
- Li, Y., Field, P. M., & Raisman, G. (2005). Olfactory ensheathing cells and olfactory nerve fibroblasts maintain continuous open channels for regrowth of olfactory nerve fibres. *Glia*, 52, 245–251. <https://doi.org/10.1002/glia.20241>
- Li, Y., He, X., Kawaguchi, R., Zhang, Y., Wang, Q., Monavarfeshani, A., Yang, Z., Chen, B., Shi, Z., Meng, H., Zhou, S., Zhu, J., Jacobi, A., Swarup, V., Popovich, P. G., Geschwind, D. H., & He, Z. (2020). Microglia-organized scar-free spinal cord repair in neonatal mice. *Nature*, 587, 613–618. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2795-6>
- Lipson, A., Widenfalk, J., Lindqvist, E., Ebendal, L., & Olson, L. (2003). Neurotrophic properties of olfactory ensheathing glia. *Experimental Neurology*, 180, 167–171. [https://doi.org/10.1016/s0014-4886\(02\)00058-4](https://doi.org/10.1016/s0014-4886(02)00058-4)
- López-Vales, R., Forés, J., Navarro, X., & Verdú, E. (2006). Olfactory ensheathing glia graft in combination with FK506 administration promote repair after spinal cord injury. *Neurobiology of Diseases*, 24(3), 443–454. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.08.001>
- López-Vales, R., Forés, J., Navarro, X., & Verdú, E. (2007). Chronic transplantation of olfactory ensheathing cells promotes partial recovery after complete spinal cord transection in the rat. *Glia*, 55, 303–311. <https://doi.org/10.1002/glia.20457>
- López-Vales, R., Forés, J., Verdú, E., & Navarro, X. (2006). Acute and delayed transplantation of olfactory ensheathing cells promote partial recovery after complete transection of the spinal cord. *Neurobiology of Diseases*, 21(1), 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.06.011>
- 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., & Guérout, N. (2013). Potential of olfactory ensheathing cells from different sources for spinal cord repair. *PLoS ONE*, 8, e62860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062860>
- Meletis, K., Barnabé-Heider, F., Carlén, M., Evergren, E., Tomilin, N., Shupliakov, O., & Frisén, J. (2008). Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biology*, 6, e182. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060182>
- Muir, E., De Winter, F., Verhaagen, J., & Fawcett, J. (2019). Recent advances in the therapeutic uses of chondroitinase ABC. *Experimental Neurology*, 321, 113032. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113032>
- Nazareth, L., Lineburg, K. E., Chuah, M. I., Tello Velasquez, J., Chehrehasa, F., St John, J. A., & Ekberg, J. A. K. (2015). Olfactory ensheathing cells are the main phagocytic cells that remove axon debris during early development of the olfactory system. *Journal of Comparative Neurology*, 523, 479–494. <https://doi.org/10.1002/cne.23694>
- O'Shea, T. M., Burda, J. E., & Sofroniew, M. V. (2017). Cell biology of spinal cord injury and repair. *Journal of Clinical Investigation*, 127, 3259–3270. <https://doi.org/10.1172/JCI90608>
- Reshamwala, R., Shah, M., St John, J., & Ekberg, J. (2019). Survival and integration of transplanted olfactory ensheathing cells are crucial for spinal cord injury repair: Insights from the last 10 years of animal model studies. *Cell Transplantation*, 28, 1325–159S. <https://doi.org/10.1177/0963689719883823>
- Sabelström, H., Stenudd, M., Réu, P., Dias, D. O., Elfineh, M., Zdonek, S., Damberg, P., Göritz, C., & Frisén, J. (2013). Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science*, 342, 637–640. <https://doi.org/10.1126/science.1242576>
- Schneider, M. P., Sartori, A. M., Ineichen, B. V., Moors, S., Engmann, A. K., Hofer, A.-S., Weinmann, O., Kessler, T. M., & Schwab, M. E. (2019). Anti-Nogo-A antibodies as a potential causal therapy for lower urinary tract dysfunction after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 39, 4066–4076. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3155-18.2019>
- Soderblom, C., Luo, X., Blumenthal, E., Bray, E., Lyapichev, K., Ramos, J., Krishnan, V., Lai-Hsu, C., Park, K. K., Tsoulfas, P., & Lee, J. K. (2013). Perivascular fibroblasts form the fibrotic scar after contusive spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 33, 13882–13887. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2524-13.2013>
- Stenudd, M., Sabelström, H., & Frisén, J. (2015). Role of endogenous neural stem cells in spinal cord injury and repair. *JAMA Neurology*, 72, 235–237. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.2927>
- Tabakow, P., Raisman, G., Fortuna, W., Czyz, M., Huber, J., Li, D., Szewczyk, P., Okurowski, S., Miedzybrodzki, R., Czapiaga, B., Salomon, B., Halon, A., Li, Y., Lipiec, J., Kulczyk, A., & 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 Transplantation*, 23, 1631–1655. <https://doi.org/10.3727/096368914X685131>
- Thornton, M. A., Mehta, M. D., Morad, T. T., Ingraham, K. L., Khankan, R. R., Griffis, K. G., Yeung, A. K., Zhong, H., Roy, R. R., Edgerton, V. R.,

- & Phelps, P. E. (2018). Evidence of axon connectivity across a spinal cord transection in rats treated with epidural stimulation and motor training combined with olfactory ensheathing cell transplantation. *Experimental Neurology*, 309, 119–133. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.07.015>
- Wagner, F. B., Mignardot, J.-B., Goff-Mignardot, C. G. L., Demesmaeker, R., Komi, S., Capogrosso, M., Rowald, A., Seáñez, I., Caban, M., Pirondini, E., Vat, M., McCracken, L. A., Heimgartner, R., Fodor, I., Watrin, A., Seguin, P., Paoles, E., Keybus, K. V. D., Eberle, G., ... Courtine, G. (2018). Targeted neurotechnology restores walking in humans with spinal cord injury. *Nature*, 563, 65–71. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0649-2>
- Wang, G., Cheng, Z., Yuan, P., Li, H., & He, X. (2021). Olfactory ensheathing cell transplantation alters the expression of chondroitin sulfate proteoglycans and promotes axonal regeneration after spinal cord injury. *Neural Regeneration Research*, 16, 1638–1644. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.301023>
- Watzlawick, R., Rind, J., Sena, E. S., Brommer, B., Zhang, T., Kopp, M. A., Dirnagl, U., Macleod, M. R., Howells, D. W., & 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*, 14, e1002468. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002468>
- Zhang, L., Zhuang, X., Kotitalo, P., Keller, T., Krzyczmonik, A., Haaparanta-Solin, M., Solin, O., Forsback, S., Grönroos, T. J., Han, C., López-Picón, F. R., & Xia, H. (2021). Intravenous transplantation of olfactory ensheathing cells reduces neuroinflammation after spinal cord injury via interleukin-1 receptor antagonist. *Theranostics*, 11, 1147–1161. <https://doi.org/10.7150/thno.52197>

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section.

Transparent Science Questionnaire for Authors
Supplementary Material

How to cite this article: Delarue Q, Robac A, Massardier R, Marie J-P, Guérout N. Comparison of the effects of two therapeutic strategies based on olfactory ensheathing cell transplantation and repetitive magnetic stimulation after spinal cord injury in female mice. *J Neurosci Res.* 2021;99: 1835–1849. <https://doi.org/10.1002/jnr.24836>

DISCUSSION

La LMT est une affection chronique et incurable dévastatrice générée par une atteinte physique externe de la moelle spinale entraînant des pertes fonctionnelles sensori-motrices, handicapant à vie le patient. Les pertes fonctionnelles varient en fonction de l'intensité de la lésion et de l'étage médullaire touché. Touchant 250 000 à 500 000 personnes dans le monde et diminuant drastiquement leur espérance de vie, le besoin d'une thérapie efficace dans le traitement des LMTs est grand. Malheureusement, dû à la complexité de la physiopathologie faisant intervenir un grand nombre d'acteurs cellulaires et moléculaires ayant une temporalité précise, la compréhension des mécanismes impliqués est rendue difficile. En effet, après la première atteinte physique détruisant le tissu médullaire, une série d'événements conduisent à la destruction des tissus adjacents. L'ischémie, les débris cellulaires, les métabolites, la perturbation de l'homéostasie ionique, les cytokines et l'infiltration leucocytaire, forment un micro-environnement cytotoxique provoquant la mort des neurones par nécrose ou apoptose ainsi que la démyélinisation des axones. Le micro-environnement conduit à la formation d'une cicatrice médullaire constituée d'une cicatrice fibrotique au centre de la zone lésionnelle, composée de fibroblastes méningiaux et de péricytes de type A. Entourant la cicatrice fibrotique, une cicatrice gliale composée d'astrocytes locaux hyper-réactifs et provenant de la division des cellules épendymaires, confinent la réaction immunitaire et le micro-environnement cytotoxique au centre lésionnel. De par sa structure, elle permet une protection des tissus épargnés par la lésion mais agit comme une barrière à la régénération des axones. Sa stabilisation au cours du temps et la persistance d'une inflammation latente réduisent progressivement la plasticité du tissu médullaire lésé et la possibilité de régénération des réseaux axonaux (Silver & Miller, 2004).

Par différentes stratégies, plusieurs études ont essayé de stimuler la régénération du tissu médullaire après une LMT. L'une des premières approches a été l'utilisation d'anti-inflammatoires afin de réduire la mise en place et l'intensité de la réponse immunitaire et ainsi, réduire les dégâts neuronaux. Après 30 ans d'études autour de cette approche, les résultats ne permettent pas de conclure à un réel intérêt de leur administration. Cependant les différents protocoles mis en place ont apporté des informations quant à la temporalité de la réponse inflammatoire, ainsi que du rôle de l'infiltration leucocytaire et de l'activation des cellules microgliales. L'administration d'anti-inflammatoires en phase aiguë, limite l'infiltration leucocytaire, réduit les dégâts neurotoxiques et provoque une amélioration de la récupération fonctionnelle précoce. Cependant le blocage de la mise en place de la réponse immunitaire, limite l'induction des mécanismes de régénération supportée par les cellules réactives pro-

inflammatoires en communiquant avec les autres cellules médullaires, conduisant alors à une plus faible récupération fonctionnelle sur le long terme (Casha *et al.*, 2012; Brennan *et al.*, 2022). La réalisation d'une immuno-modulation à des temps très précis ayant pour but de réduire la réponse immunitaire et la réponse inflammatoire mais sans les inhiber complètement, semble être une piste thérapeutique intéressante. Cependant il est préalablement nécessaire de comprendre parfaitement les mécanismes inflammatoires et régénérateurs mis en place ainsi que leurs temporalités.

D'autres études ont essayé d'améliorer la croissance axonale en agissant sur la cicatrice médullaire, aussi bien au niveau de sa composante moléculaire que cellulaire. D'un point de vue moléculaire, l'utilisation de la chondroïtinases ABC, dégradant les CSPGs inhibiteurs de la croissance axonale, permet de lever cette inhibition (Shinozaki *et al.*, 2016). D'un point de vue cellulaire, tirant avantage de la souris transgénique GLAST-CreERT2::YFP-Rasless, permettant l'inhibition du cycle cellulaire des péricytes de type A, la réduction de la composante fibrotique est associée à une amélioration de la récupération sensori-motrice (Dias *et al.*, 2018). En ce qui concerne la cicatrice gliale, une étude utilisant une lignée de souris transgénique permettant l'inhibition de la réactivité astrocytaire en présence de ganciclovir, la mGFAP-TK, a mis en avant que la réponse astrocytaire et la cicatrice gliale sont essentielles pour limiter la propagation de l'infiltration leucocytaire et protéger les tissus adjacents. Cette étude a aussi prouvé, par l'intermédiaire d'une analyse par RT-qPCR, que les astrocytes participent à l'établissement d'un environnement propice à la croissance axonale par la sécrétion de facteurs permissifs à cette régénération (Anderson *et al.*, 2016). La mise en place de la cicatrice médullaire est fortement influencée par l'activation microgliale, qui par l'intermédiaire de cytokines et de facteurs de croissance, stimulent la fibrose et l'astrogliose.

Les cellules microgliales sont des cellules essentielles à la physiologie du SNC et à la physiopathologie des LMTs. En condition physiologique, elles jouent un rôle important dans la régulation de l'homéostasie du SNC. Par la libération de cytokines et de facteurs de croissance, comme l'IL-1 β , TNF- α et le BDNF, elles influencent la survie et le devenir des cellules du SNC ainsi que la différenciation des cellules souches neurales et des précurseurs oligodendrocytaires (Rogers *et al.*, 2011; Trang *et al.*, 2011; Golia *et al.*, 2019). Elles sont aussi impliquées dans la régulation de l'activité neuronale en captant l'ATP libéré dans la fente synaptique lors de la transmission du potentiel d'action, la métabolisant en adénosine qu'elles sécrètent. La fixation de l'adénosine sur les récepteurs neuronaux A1R induit alors une inhibition de l'activité neuronale (Peng *et al.*, 2019; Badimon *et al.*, 2020). A l'inverse, la

libération de TNF- α par les cellules microgliales contribue à une hyperactivité neuronale liée à l'augmentation des récepteurs synaptiques AMPA (Kim & Joh, 2006; Stellwagen & Malenka, 2006). Un autre de leurs rôles, est la régulation synaptique de la plasticité et de la stabilisation des synapses. La libération de BDNF participe à augmenter la plasticité des synapses et à la réorganisation synaptique, alors que l'interaction CX3CR1-CXCL1 entre les cellules microgliales et les neurones, stabilise et protège les synapses (Hellwig *et al.*, 2016; Bolos *et al.*, 2018).

Les cellules microgliales activées après la LMT, produisent une réponse inflammatoire par la sécrétion d'IL-1 α , d'IL-1 β , de TNF- α ou encore du CCL2 stimulant l'infiltration leucocytaire et l'exacerbation de l'inflammation, provoquant l'augmentation des dégâts neuronaux (Zhou *et al.*, 2014). Les cellules microgliales agissent aussi directement sur la déstabilisation des réseaux neuronaux. La production excessive de TNF- α , induisant l'hyperactivité neuronale, conduit à la mort des neurones déjà affaiblis. De plus, la destruction du PNN protégeant les neurones, par la libération de MMP9 par les cellules microgliales, les rend plus sensibles au micro-environnement et plus hyperactifs (Kawasaki *et al.*, 2008; Tansley *et al.*, 2022). L'interaction CX3CR1-CXCL1 en condition physiologique stabilise les synapses. Lors d'un contexte inflammatoire, la présence de cytokines pro-inflammatoires diminue cette interaction favorisant la phagocytose inflammatoire des synapses et la libération de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-6 par les cellules microgliales agissant comme un cercle vicieux accélérant la dégénérescence neuronale (Bachstetter *et al.*, 2011; Rogers *et al.*, 2011).

Le développement d'une thérapie efficace est donc lié à la possibilité d'induire une diminution de la réponse immunitaire et inflammatoire ainsi que de réduire la cicatrice fibrotique au profit du tissu glial, sans empêcher la mise en place des mécanismes de protection et de régénération. Différentes études fondamentales et cliniques faisant appel à divers domaines sont actuellement en développement. L'un des domaines prometteurs est la transplantation cellulaire. Le but de cette approche est d'utiliser les propriétés de certains types cellulaires de manière à recoloniser les tissus lésés ou d'apporter un support trophique afin de limiter la mort cellulaire tout en stimulant le remplacement des cellules mortes par les cellules endogènes.

Objectif I - La transplantation de bCGOs (bOECs) améliore la régénération tissulaire et la récupération fonctionnelle après une LMT.

Au sein du laboratoire nous étudions particulièrement la transplantation de bCGOs. Par la réalisation de différents protocoles de recherches depuis plusieurs années dans le laboratoire et l'analyse de la littérature, nous pouvons dire que les bCGOs montrent un potentiel thérapeutique intéressant.

En effet, les CGOs sont parfois qualifiées d'immunocytes du OB. Le système olfactif, du fait de sa localisation, est constamment en contact de pathogènes. Les CGOs expriment à leur surface des récepteurs permettant de détecter les *pathogen associated molecular pattern* (PAMPs), le TLR9, leur permettant la détection des agents pathogènes et leur phagocytose (Jiang, Guo, *et al.*, 2022). Elles produisent aussi un chimio-répulsif des cellules microgliales, le *macrophage migration inhibitory factor* (MIF), leur conférant un rôle important dans la réponse immunitaire innée et le renouvellement tissulaire du OB (Wright *et al.*, 2020). Elles entretiennent la survie et la fonctionnalité des nouveaux neurones, par la sécrétion de BDNF, NGF, GDNF ou encore CNTF, mais aussi l'angiogenèse par la libération de VEGF (Guérout *et al.*, 2010; Lan *et al.*, 2021; Jiang, Guo, *et al.*, 2022). En culture primaire, la réalisation d'analyses par RT-qPCR du profil d'expression génétique, montre que les bCGOs conservent leurs capacités à produire des facteurs trophiques (**Article II et Annexe III**) (Guérout *et al.*, 2010).

La production de ces molécules, entretient une communication avec les cellules microgliales. Par la réalisation de cultures cellulaires de BV2 (cellules microgliales immortalisées) en présence de concentra de milieu de culture obtenu après une culture primaire de bCGOs, nous avons observé que les bCGOs induisent une diminution de la production d'ARNm des gènes *ccl5*, *cx3cr1*, *p2rx4* et *p2ry6*, et induisent une augmentation de l'expression de *ccr5*. Cela traduit une diminution de l'état de réactivité des cellules BV2 (**Article II**).

En effet, les récepteurs *p2ry6* et *p2rx4* sont connus pour induire une neurodégénération et l'activation d'une réponse inflammatoire par les cellules microgliales (Puigdellívol *et al.*, 2021; Castillo *et al.*, 2022).

Le rôle joué par le récepteur CX3CR1 est assez ambigu. Alors qu'en condition physiologique il assure l'homéostasie neuronale en stabilisant les connections synaptiques, en condition inflammatoire, il est lié à une augmentation de la mort neuronale. La première semaine suivant la LMT, l'expression d'ARNm codant pour le CX3CL1 est diminuée dans les

neurones, alors que celle de l'ARNm codant pour le CX3CR1 est augmentée dans les cellules microgliales. Dans une étude, des LMTs ont été réalisées chez des souris CX3CR1^{-/-}. Dans ces souris n'exprimant pas le récepteur CX3CR1, la réponse inflammatoire et immunitaire est diminuée en comparaison des animaux WT, conduisant à une amélioration des performances fonctionnelles la première semaine après la lésion. Les auteurs observent aussi que 42 jours après la lésion, les performances chez les animaux CX3CR1^{-/-} sont toujours améliorées mais la différence avec les animaux WT est nettement diminuée en comparaison des résultats obtenus la première semaine. Cela met en avant le rôle pro-inflammatoire du CX3CR1 en condition pathologique, responsable d'une augmentation de la dégénérescence neuronale (Donnelly *et al.*, 2011). Le récepteur CX3CR1 est aussi exprimé par les monocytes circulants. Il permet leur migration vers le site de lésion et à leur différenciation en macrophages, contribuant à l'émergence des dégâts neuronaux. L'utilisation de souris CX3CR1^{-/-} empêche donc aussi la migration des monocytes au site de lésion, limitant les dégâts tissulaires après la LMT (Staniland *et al.*, 2010). On peut cependant mettre en avant une limite à cette étude. Il est connu qu'il existe différentes vagues d'infiltrations leucocytaires dans le site de lésion. En phase chronique, 60 jours après la lésion chez la souris, une seconde infiltration de macrophages dérivés des monocytes est observée. Il est décrit que cette phase d'infiltration est nécessaire à la régénération axonale (Beck *et al.*, 2010). L'utilisation de souris CX3CR1^{-/-}, peut donc induire une diminution de la régénération axonale en phase chronique, après une LMT.

En ce qui concerne *ccr5*, l'augmentation de son expression est intéressante. Initialement décrit comme un effecteur pro-inflammatoire, des études s'intéressant à son expression sur les cellules microgliales lors de pathologies démyélinisantes, ont mis en lumière sa possible implication dans les processus d'initiation de la remyélinisation. Par la réalisation de biopsies de lésions chez des patients souffrant de sclérose en plaque, il a été mis en avant qu'en fonction du stade de la lésion, on observe une différence d'expression par les cellules microgliales du récepteur CCR5. Alors que dans tous les types de lésions le CCR5 est exprimé, son expression est fortement augmentée dans les nouvelles lésions et les lésions récemment remyélinisées. Dans les lésions où le processus de remyélinisation n'est pas présent ou terminé depuis longtemps, l'expression de CCR5 est diminuée. Une autre étude a mesuré l'expression de différents cytokines, chimiokines et récepteurs dans le tronc cérébral de rats transgéniques présentant un échec des processus de myélinisation et de remyélinisation conduisant à un état d'hypomyélinisation tout au long leur vie, et a montré des taux de CCR5 diminués en comparaison de rats WT (Trebst *et al.*, 2008; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015). Il est donc possible

de supposer, qu'en plus d'apporter une neuroprotection lors de la phase aiguë, limitant la dégénérescence axonale et la démyélinisation, les bCGOs induisent une augmentation du processus de remyélinisation observé *in vivo* 15 jours après la lésion chez les animaux transplantés (**Article II**).

Cette différence de réactivité microgliale en présence de bCGOs s'observe aussi *in vivo*. Déjà décrit dans des anciennes publications (Jiang, Wang, *et al.*, 2022), nous retrouvons aussi le même effet sur la modulation de la polarisation des Mi-M Φ , vers un phénotype pro-régénérateur, mais sans variation de la quantité de Mi-M Φ . La modulation se traduit par une augmentation de l'expression du récepteur phénotypique pro-régénérateur CD206R 14 jours après la lésion et se poursuivant 28 jours après la lésion. On observe aussi une diminution de l'expression de la protéine de costimulation pro-inflammatoire CD86 (**Article II**). La modulation de la réactivité et de la polarisation vers le phénotype pro-inflammatoire des cellules microgliales en présence de bCGOs a déjà été observée *in vitro*. En effet, après stimulation avec du LPS, les cultures cellulaires microgliales ont été mises au contact de bCGOs. Cela a diminué la quantité d'IL-1 β , IL-6 et de TNF- α , produits par les cellules microgliales (Jiang, Wang, *et al.*, 2022).

Il est décrit que l'activation des cellules microgliales, participe à la dégradation du PNN en condition inflammatoire, déstabilisant les neurones et favorisant leur mort. Il est possible d'associer la meilleure préservation du PNN dès 28 jours après la lésion, observée chez les animaux transplantés, avec une diminution de la réactivité microgliale (**Article II**). Afin de confirmer cette hypothèse il serait nécessaire d'identifier les cellules microgliales possédant des fragments de PNN dans leur cytoplasme, correspondant à une phagocytose de ces derniers (Tansley *et al.*, 2022).

La transplantation de bCGOs après une LMT, apporte donc lors de la phase aiguë de la physiopathologie, un effet neuroprotecteur et immuno-modulateur. Leurs actions sur la préservation des réseaux axonaux et sur la survie neuronale contribuent à limiter la neurodégénération et les pertes fonctionnelles. La réduction de la réactivité microgliale, et possiblement de l'infiltration cellulaire, favorise la régénération médullaire précoce, à laquelle elles participent en stimulant la remyélinisation.

La modulation de la réactivité des Mi-M Φ n'est pas la seule action des bCGOs. La réalisation *in vitro* de cultures de neurosphères à partir de moelles spinales prélevées sur des souris hFoxJ1-CreERT2::YFP, permettant le suivi des cellules épendymaires et de leurs

progénies, montre qu'après une LMT, la transplantation de bCGOs stimule le nombre de neurosphères générées (**Article I**). De plus, la proportion d'oligodendrocytes et de neurones différenciés à partir des neurosphères générées par les cellules épendymaires est plus importante (**Article I**). Toutefois, *in vivo*, la transplantation de bCGOs induit seulement une augmentation du nombre d'astrocytes différenciés à partir des cellules épendymaires. Les bCGOs ont donc la capacité d'influencer la différenciation des cellules épendymaires en stimulant la génération préférentielle d'oligodendrocytes et de neurones. Cependant, *in vivo* la présence d'autres signaux endogènes, influence aussi la différenciation des cellules épendymaires (**Article I**) (Ma *et al.*, 2020).

Cette différence peut s'expliquer par un effet direct des bCGOs sur les cellules épendymaires ou par l'intermédiaire de la stimulation des Mi-M Φ . En effet, les cellules microgliales influencent la prolifération et la différenciation des cellules épendymaires. Dans un contexte inflammatoire, les Mi-M Φ produisent une interleukine, l'oncostatine - M (OSM). Cette molécule se fixe sur les récepteurs OSMR présents à la surface des cellules épendymaires et influence leurs proliférations et leurs différenciations, favorisant la différenciation astrocytaire (Repovic & Benveniste, 2002; Chevreau *et al.*, 2021).

La stimulation d'un phénotype M2 par les Mi-M Φ augmente *in vivo* l'activation et le recrutement des cellules épendymaires (Ma *et al.*, 2020). Le recrutement de ces cellules est essentiel à la formation de la cicatrice gliale. En effet, les astrocytes provenant des cellules épendymaires, contribuent à la formation de la cicatrice gliale et à la réduction de la cicatrice fibrotique augmentant la perméabilité axonale (**Article I**) (Barnabé-Heider *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2016).

Du fait d'une action directe ou par l'intermédiaire de la modification de la cicatrice médullaire en stimulant le recrutement des cellules épendymaires, les bCGOs agissent sur le micro-environnement cellulaire. Chez les animaux transplantés, la quantité d'ARNm codant pour des molécules permissives et inhibitrices de la croissance axonale comme *sdc3*, *sdc4*, *fgf2*, *xylt1*, *rgma*, *rgmb*, *ephna4*, *cspg4*, *vcn* est modulée et favorise l'émergence d'un micro-environnement permissif à la régénération axonale (**Article I**). Les mécanismes de communication entre les bCGOs et les cellules médullaires permettant la modulation de la zone lésionnelle n'est pas clairement établie, cependant celle-ci est dépendante des cellules épendymaires. La réalisation de l'analyse des ARNm ainsi que de la survie neuronale, chez des souris hFoxJ1-CreERT2::YFP-Rasless (inhibition de la prolifération des cellules épendymaires), montre l'absence des effets décrits précédemment, induits par les bCGOs

(**Article I**). Du fait que la culture primaire de bCGOs soit un mélange de CGOs et de fibroblastes olfactifs (Ramón-Cueto & Nieto-Sampedro, 1992) (**Article II et Annexe III**), il a été confirmé que l'effet était aussi dépendant des CGOs en réalisant une culture purifiée de fibroblastes olfactifs par la technique décrite par Nash (Nash *et al.*, 2001). Les résultats n'ont pas montré de différence dans l'activation et le recrutement des cellules épendymaires *in vivo* (**données non présentées**). Une méta-analyse des données de la littérature, a fait la synthèse des paramètres importants à respecter pour obtenir un effet thérapeutique optimal de la transplantation de bCGOs après une LMT. Il est décrit que les cultures primaires doivent respecter une proportion de fibroblastes olfactifs/CGOs de 60-70%/30-40% (Gómez *et al.*, 2018). La caractérisation cellulaire de nos cultures montre une proportion proche de 60% de fibroblastes olfactifs et de 40% de CGOs (**Article II, Article IV et Annexe III**).

Il est à noter que les neurosphères obtenues à partir des animaux hFoxJ1-CreERT2::YFP se différencient en faible quantité en neurones, identifiés *in vitro* par le marqueur Tuj1. Les bCGOs induisent *in vivo* une neurogenèse médullaire caractérisée par la formation deux semaines après la lésion de nouveaux neurones immatures (DCX+/Edu+) devenant matures 14 semaines après la lésion (NeuN+/EdU). Cependant à notre grande surprise, aucun de ces nouveaux neurones ne provient des cellules épendymaires (YFP+), soulevant l'hypothèse de la présence d'un précurseur ou d'un progéniteur neuronal (**Article I**). Une étude s'intéressant au potentiel souche neuronale des cellules épendymaires, a identifié une population discrète de cellules, exprimant le facteur de transcription Troy. Par la réalisation *in vitro* de cultures de neurosphères, ils ont identifié que cette sous-population de cellules épendymaires, comme étant celle générant des neurones *in vitro* (Stenudd *et al.*, 2022).

Par la limitation de la neurodégénérescence, les bCGOs limitent les pertes fonctionnelles chez les animaux qui montrent alors de meilleures performances lors de la réalisation de tests locomoteurs et ce dès 14 jours après la lésion (**Article II**), confirmant leurs effets sur la survie neuronale (Khankan *et al.*, 2016). La préservation du PNN lors de la phase aiguë pourrait expliquer la limitation de la neurodégénérescence. En effet, le PNN est une structure dynamique, se modifiant en fonction du micro-environnement et des besoins structurels du réseau neuronal. Après une LMT chez le rat, sa densité diminue rapidement avant d'augmenter six semaines après la lésion. Cependant, la réalisation de rééducation fonctionnelle motrice, induit un PNN de faible densité, facilitant ainsi la plasticité médullaire (Grycz *et al.*, 2022). Le rôle joué par le PNN dans un modèle de sclérose latérale amyotrophique, montre que la diminution de sa densité est associée à une augmentation de la neurodégénérescence des

motoneurones (Lemarchant *et al.*, 2016). Il est donc possible d'associer la neuroprotection des bCGOs, avec la préservation en phase aiguë du PNN.

L'analyse du dynamisme du PNN 14, 28 et 56 jours après la lésion chez les animaux contrôles, montre une diminution de l'intensité du PNN 14 jours après la lésion, puis une augmentation à 28 jours avant de rediminuer 56 jours après la lésion. Les observations faites jusqu'au 28^{ème} jour après la lésion correspondent aux observations de l'étude discutée précédemment (Grycz *et al.*, 2022). Dans ces travaux, l'étude du PNN a été réalisée seulement jusqu'à 6 semaines après la lésion. La diminution du PNN à 56 jours que nous observons, pourrait correspondre à la seconde vague d'infiltration leucocytaire impliquée dans la régénération axonale et la restauration des réseaux neuronaux (Beck *et al.*, 2010). Du fait que le PNN agit comme une barrière peu perméable à la réalisation de connexions synaptiques, la diminution de sa densité 56 jours après la lésion participerait donc à la régénération médullaire. Chez les animaux transplantés, l'intensité du PNN est plus importante les 14 premiers jours et légèrement augmentée 28 jours après la LMT, en comparaison des animaux non transplantés. Cette période correspond à la survie des bCGOs après transplantation (**Article II**). Puis, l'intensité du PNN redevient identique avec celle mesurée sur les animaux non transplantés. Il est donc possible que durant leur présence dans la moelle spinale, particulièrement lors des deux premières semaines où leur nombre est important, qu'elles apportent un effet neuroprotecteur. Puis en mourant, laissent les mécanismes de régénération endogène prendre le relai, en agissant sur la dénaturation du PNN afin d'augmenter la plasticité synaptique.

L'environnement plus permissif, la réduction de la cicatrice médullaire et la conservation d'un réseau neuronal plus important chez les souris transplantées, favorisent la régénération axonale au travers de la lésion médullaire ainsi que la formation de nouvelles synapses. En plus de la présence de molécules permissives à la régénération axonale, la présence d'une cicatrice médullaire plus riche en laminine chez les animaux transplantés pourrait aussi expliquer en partie l'augmentation de la croissance des axones (**Article II**) (Sosale *et al.*, 1988). L'amélioration de la régénération axonale, observable encore 56 jours après la lésion, se traduit par une amélioration des performances motrices mesurées par le test du Locotronic et du CatWalk, 28 et 56 jours après la lésion (**Article II**), ce qui correspond à de précédentes observations réalisées par une autre équipe mettant en avant l'amélioration du Basso, Beattie and Bresnahan score (BBBS) (**Article II**) (Zhang *et al.*, 2019). Cependant, l'amélioration de la récupération fonctionnelle est accompagnée d'une augmentation de la sensibilité douloureuse. Par la réalisation du test plantaire de Hargreaves, nous mettons en avant

l'augmentation du seuil de sensibilité lors d'une stimulation thermique chez les animaux transplantés avec les bCGOs, 14 et 56 jours après la lésion (**Article II**). En effet, en coculture avec des neurones, les bCGOs ont la capacité d'agir sur la croissance des neurites. En s'alignant avec les neurites, ils forment une « gaine olfactive » stimulant leur croissance (Khankan *et al.*, 2015).

La régénération axonale et la reconstruction des réseaux neuronaux est un processus complexe. Reformuler des connexions synaptiques entre les neurones ne suffit pas à obtenir un réseau fonctionnel précis. Il est nécessaire que les synapses nouvellement formées subissent une étape de maturation permettant la conservation ou l'élimination des synapses inutiles ou inappropriées. L'absence de maturation induit donc des conductions nerveuses pouvant être inappropriées ou trop importantes entraînant l'activation anormale de neurones sensitifs provoquant des phénomènes de douleurs neuropathiques. Il est à noter que le micro-environnement réactif agit sur l'induction de potentiels d'action par les neurones provoquant une hyperactivité et l'apparition de douleurs (Zhang *et al.*, 2011). Ce phénomène appelé allodynie, est observé dans un grand nombre de travaux s'intéressant à la transplantation médullaire de bCGOs. Il a aussi été observé lors de la transplantation de NSC, qui en plus d'apporter un effet bénéfique sur la récupération fonctionnelle, induit un « sprouting » aberrant, associé à une hypersensibilité de type allodynie (Hofstetter *et al.*, 2005; Nakhjavan-Shahraki *et al.*, 2018). Cependant, l'identification de la formation de synapses, ne témoigne pas d'une activité de celles-ci, la réalisation d'expériences d'électrophysiologie permettant de valider la conduction électrique au sein du réseau neuronal reconstruit est nécessaire pour étudier la transmission synaptique (**Article II**).

Dans des modèles murins, la transplantation de bCGOs montre un réel intérêt dans le traitement des LMTs. Son action sur les Mi-M Φ apporte un effet neuroprotecteur nécessaire à la préservation des fonctions motrices épargnées par la lésion physique mais sans inhiber la mise en place des mécanismes de régénération, favorisant la croissance axonale. Cependant, la mise en place de cette thérapie en clinique humaine nécessite d'améliorer les connaissances l'entourant. En effet, les différentes études cliniques montrent des effets thérapeutiques hétérogènes, ne convainquant pas réellement. Quelques études ont apporté des résultats impressionnants, comme celle de l'équipe de Tabakow en 2014 chez un patient ayant subi une transection médullaire à l'étage médullaire Th9. La mesure de l'évolution des performances motrices et du score AIS, ont montré une récupération fonctionnelle très importante. Il est à

noter que dans cette étude clinique, le patient a subi une rééducation motrice intense, favorisant la récupération fonctionnelle (Tabakow *et al.*, 2014).

Objectifs II - La transplantation de bCGOs provenant d'animaux ayant subi une LMT (bCGOs I – bOECs I) a un effet thérapeutique diminué en comparaison de la transplantation de bCGOs provenant d'animaux non médullo-lésés (bCGOs H – bOECs H)

Contrairement aux études sur des modèles animaux, où les cellules étudiées sont prélevées sur un animal donneur sain avant d'être mises en culture et transplantées dans un animal ayant subi une LMT, bien souvent dans les études cliniques, une transplantation autologue est réalisée. Les cellules sont donc prélevées sur le patient médullo-lésé, c'est à dire sur un organisme traumatisé. Or, depuis une dizaine d'années, plusieurs études se sont intéressées aux conséquences périphériques et cérébrales de la lésion. Après une LMT, la rupture des projections des systèmes autonomes entraîne une dérégulation du fonctionnement des organes désinnervés. La propagation des cytokines TNF- α , de l'IL-1 α , 1 β et de l'IL-6, produites par les cellules de la moelle spinale, dans la circulation sanguine (Anthony & Couch, 2014), entraîne une réaction immunitaire généralisée dans l'organisme et l'activation cellulaire dans un grand nombre d'organes. On observe la présence des molécules du complément activés, des cytokines, des chimiokines et des neutrophiles dans le foie, la rate, les poumons, les reins ou encore le parenchyme cérébral (Lenz *et al.*, 2007; Gris *et al.*, 2008; Anthony & Couch, 2014). Cela a pour conséquence la mise en place d'une réactivité cellulaire locale dans certains organes participant à la régénération médullaire. Par exemple, le foie joue un rôle important dans la coordination de la réponse immunitaire. Lors d'une inflammation aiguë, la présence de cytokines dans le foie stimule la libération dans la circulation sanguine de CCL2 et de CXCL1. Ces chimiokines agissent ensuite sur la clairance et la phagocytose des cellules nécrotiques et apoptotiques, le chimiotactisme et l'adhérence des macrophages et des lymphocytes, mais aussi une protection contre les ROS, dans la moelle spinale (Campbell *et al.*, 2005). Le foie n'agit pas seulement lors de la phase aiguë. Il a été démontré qu'un mois et demi après la lésion, les concentrations d'ARNm de *tnfa*, *il1a*, *1b* et de *ccl2* sont encore élevées dans le foie (Goodus *et al.*, 2018) et qu'elles restent élevées pendant au moins six mois.

Comme le cerveau est en contact direct avec la moelle spinale par le sang, mais aussi par le LCS et les prolongements axonaux, il n'échappe pas à la réactivité généralisée de l'organisme. On observe dans différentes structures cérébrales, des modifications cellulaires et structurelles. En effet, la LMT induit une perturbation de la neurogenèse dans les aires

neurogéniques du cerveau. La perturbation de la neurogenèse de la SVZ conduit à une perturbation du système olfactif primaire par la diminution de nouveaux neurones empruntant la RMS jusqu'aux OB, induisant alors une rupture de l'homéostasie bulbaire (Wu, Stoica, *et al.*, 2014; Craig *et al.*, 2017).

L'hypothèse soulevée a alors été que les effets thérapeutiques des bCGOs, regroupant l'amélioration des fonctions sensorimotrices, la diminution de la taille de la cicatrice médullaire et la modulation de sa matrice extracellulaire, l'amélioration de la croissance axonale et l'augmentation de la synaptogenèse (**Article II**), pouvaient être modifiés lorsqu'elles sont prélevées sur un animal médullo-lésé.

Pour répondre à cette hypothèse, nous avons tout d'abord réalisé une analyse histologique de la réactivité microgliale et des variations de l'expression d'ARNm impliqués dans la production de molécules liées à la réponse immunitaire dans les OB de souris non lésées et dans des souris ayant subi une LMT, récupérés 7 jours après la lésion. Alors que la lésion n'induit pas de variation de la quantité de cellules microgliales, identifiées par Iba1, la proportion de cellules microgliales pro-inflammatoires, identifiées par le CD86, est supérieure à celle retrouvée dans des animaux non lésés. L'analyse par RT-qPCR, confirme cette observation. En effet, on note une diminution de l'expression des ARNm des gènes *il10rb*, *cx3cl1*, *cx3cr1*, *bdnf*, *tgfb2*, *cxcr4*, *ifngr2*, *irf1*, *irf3* et *tnsfrsa*. Ces variations traduisent l'émergence d'un environnement réactif au sein des bulbes olfactifs, lié à une modulation de l'expression de gènes anti- et pro-inflammatoires, de facteurs trophiques et de la communication cellules microgliales/neurones (**Article II**). Du fait que l'analyse des ARNm dans le OB a été réalisé sans distinguer les types cellulaires, il est difficile de définir les cellules impliquées dans la réactivité et celles modulant les ARNm analysés.

A la suite de cette première caractérisation, nous avons réalisé la transplantation des cultures primaires de bCGOs à partir de bulbes olfactifs prélevés sur des animaux non lésés (bCGOs H) et des animaux ayant subi une LMT modérée à l'étage médullaire Th9 (bCGOs I), 7 jours après la lésion. La réalisation de tests sensorimoteur (Locotronic), moteur (CatWalk) et sensitif (Hargreaves), montre une tendance à la baisse des performances motrices chez les animaux transplantés avec les bCGOs I. Cette baisse se traduit par un nombre d'erreurs sur les « pièges » du Locotronic et un temps de traversée du corridor plus élevé, ainsi qu'une hétérogénéité des performances plus importante. Chez ces animaux, le placement des pattes arrière pendant la marche est altérée et on observe une sensibilité douloureuse identique aux animaux contrôle, alors que celle des animaux transplantés avec les bCGOs H est augmentée

(**Article II**). La différence d'effets thérapeutiques a été confirmée par l'analyse tissulaire des moelles spinales des animaux. La caractérisation de la cicatrice médullaire montre que les bCGOs I perdent leur capacité à diminuer la taille de la cicatrice fibrotique ainsi que leur capacité à réduire la démyélinisation et à induire la remyélinisation les 28 premiers jours suivant la lésion (**Article II**). La composition moléculaire de la cicatrice médullaire est aussi altérée. Chez les animaux ayant reçu les bCGOs H, la cicatrice médullaire est composée d'une matrice extracellulaire plus riche en laminine que chez les animaux ayant reçu les bCGOs I (**Article II**).

Le bouleversement de la mise en place de la cicatrice médullaire, peut être expliqué par une différence d'expression d'ARNm entre les cultures primaires de bCGOs H et de bCGOs I. En effet, les bCGOs I expriment des taux plus importants d'ARNm codant pour le TGF β , le TNF- α ainsi que pour l'IL-6, connus pour stimuler la fibrose en agissant directement sur les astrocytes et les cellules stromales (Sofroniew, 2009; Hu *et al.*, 2018). La modulation de l'activation et de la polarisation des Mi-M Φ peut aussi expliquer cette différence. Comme décrit précédemment, il est prouvé que l'orientation de ces cellules vers un phénotype M2, améliore l'activation et le recrutement des cellules épendymaires (Ma *et al.*, 2020). En effet, le profil d'expression des ARNm produits par les cellules BV2 en culture, en présence du concentrat du milieu de culture primaire de bCGOs H ou I, montre des différences. Précédemment nous avons décrit que la présence du concentrat du milieu de culture des bOECs H, induisait une diminution de l'expression de récepteurs caractéristiques de l'activation microgliale. En présence du concentrat de bCGOs I, la réponse des BV2 est différente de celle des BV2 contrôles. L'augmentation de l'expression de *ccl5*, *cxcr4*, *il18* et *p2ry12* témoigne de l'activation microgliale et de son orientation vers un phénotype pro-inflammatoire (Felderhoff-Mueser *et al.*, 2005; Tysseling *et al.*, 2011). En comparant les variations entre les BV2 en présence du concentrat bOECs H et les BV2 en présence du concentrat de bCGOs I, on se rend mieux compte des différences du profil d'expression d'ARNm. En plus de l'augmentation des taux de *ccl5*, *cxcr4* et *p2ry12*, dans les cellules BV2 en présence du concentrat provenant de la culture des bCGOs I, les taux de *csf1*, *il1b*, *cx3cr1* et *ifngr2*, connus pour contribuer à la réponse pro inflammatoire (Mecca *et al.*, 2018; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2020), sont augmentés, confirmant une variation de la communication entre les cellules microgliales et les bCGOs, en fonction que ces dernières proviennent d'un animal lésé ou non (**Article II**). Cependant *in vivo*, la différence d'activation des Mi-M Φ n'est pas observée. L'analyse du nombre de cellules microgliales

présentes dans la moelle spinale et de leurs polarisations après la LMT et la transplantation de bCGOs H ou de bCGOs I, ne montre pas de différence (**Article II**).

L'utilisation de cellules immortalisées afin de caractériser un effet *in vivo*, impose des limites. Les BV2 sont des cellules microgliales immortalisées par une modification génétique. Cette modification entraîne des différences avec les cellules présentes physiologiquement dans les tissus. Les BV2 sont connues pour avoir des défauts de sécrétion de TGF- β et de chimiotactisme. Cependant, il est admis que ce modèle, couramment utilisé en recherche, permet tout de même une bonne caractérisation *in vitro* du rôle que peuvent jouer les cellules microgliales *in vivo* (He *et al.*, 2018; Timmerman *et al.*, 2018).

On peut mettre en avant la limite de la caractérisation des Mi-M Φ reposant seulement sur l'expression du CD86 ou du CD206. La faiblesse de discrimination de ces marqueurs au regard de la diversité des sous populations de Mi-M Φ ne permet pas d'identifier précisément les phénotypes et les rôles des cellules microgliales (Chhor *et al.*, 2013). Il serait donc intéressant de compléter cette analyse par la réalisation de marquages immunohistochimiques des cytokines pro- et anti-inflammatoires ainsi que d'autres récepteurs ou ligands, exprimés à la surface des Mi-M Φ . L'analyse des variations des ARNm et des protéines présentes pourrait aussi apporter des données intéressantes.

Afin de caractériser les différences que peuvent induire les bCGOs H ou I sur les cellules épendymaires, la réalisation de cultures de neurosphères à partir de moelle spinale d'animaux hFoxJ1-CreERT2::YFP après lésion et transplantation des deux cultures, permettrait d'identifier le rôle que joue les bCGOs I sur la différenciation des cellules épendymaires en astrocytes *in vitro*. En complétant la caractérisation *in vitro* par une analyse *in vivo* de *fate mapping* des cellules épendymaires comme décrit dans l'article I, nous aurions alors une caractérisation complète de l'influence des bCGOs I, sur l'activation, la migration et la différenciation des cellules épendymaires.

Les modifications de composition de la cicatrice médullaire, l'augmentation potentielle de la réactivité des Mi-M Φ et l'augmentation de la production d'ARNm codant pour des molécules inhibant la croissance axonale comme *lamc1*, *lgals1*, *sema3f*, *dcn*, *neol*, *ntn1* ou encore *robo1* (**Article II**) (Anderson *et al.*, 2016), diminue donc le potentiel régénératif du tissu médullaire et des axones. Cependant, à part une diminution du nombre d'axones bourgeonnants dans une portion du cœur lésionnel 28 jours après la lésion, la transplantation de bCGOs I ne modifie pas la croissance axonale en comparaison des bCGOs H. On observe toutefois que les

axones du groupe ayant reçu les bCGOs I, forment moins de synapses glutamatergiques, identifiées par vGlut1, (Sosale *et al.*, 1988; Anderson *et al.*, 2016) particulièrement dans la partie rostrale et le cœur lésionnel, 28 et 56 jours après la lésion. On peut associer la diminution du nombre de synapses, à une plus faible stabilité des bourgeons axonaux, du fait d'une cicatrice médullaire plus pauvre en laminine et riche en molécules inhibant la croissance axonale (**Article II**). Comme décrit précédemment, la formation d'un réseau neuronal fonctionnel et précis, nécessite la maturation des synapses afin de réduire les transmissions inappropriées pouvant conduire à des phénomènes de douleurs neuropathiques (M'Dahoma *et al.*, 2014). La réduction de la quantité de synapses chez les animaux transplantés avec des bOECs I, pourrait donc être associée à l'absence de diminution du seuil de sensibilité douloureuse, observé chez les animaux transplantés avec les bOECs H (**Article II**). On peut aussi noter qu'en présence de concentrat de bCGOs I, l'expression de l'ARNm du récepteur p2ry12 est quasiment doublée alors que chez les BV2 ayant été au contact du concentrat de bCGOs H, elle est identique aux BV2 contrôles. Le récepteur p2ry12 participe à la réduction des douleurs neuropathiques induites par l'hyperactivité neuronale en fixant l'ATP libéré lors de la transmission synaptique. L'ATP est alors endocytée et dégradée en adénosine avant d'être sécrétée et fixée par les récepteurs A1R des neurones, inhibant alors l'activité neuronale (Peng *et al.*, 2019).

La formation de nouveaux réseaux neuronaux est liée à la plasticité du tissu médullaire. Comme décrit précédemment, l'analyse du PNN permet d'étudier l'état de neuroprotection des neurones mais aussi leur plasticité. Alors que 14 jours après la lésion, l'intensité du PNN est augmentée chez les animaux ayant reçu les bCGOs H en comparaison des animaux non transplantés, chez les animaux ayant reçu les bCGOs I on n'observe plus de différence significative, mais seulement une tendance forte. Cependant, 28 et 56 jours après la lésion, plus aucune différence n'est visible entre les trois groupes. Cela témoigne du fait que les bCGOs H, lorsqu'elles sont présentes dans le tissu médullaire, apportent un effet neuroprotecteur passant par une préservation du PNN, qui est légèrement diminué avec les bCGOs I. L'analyse de la densité neuronale confirme cette idée. En effet, 28 jours après la lésion, seuls les animaux transplantés avec les bCGOs H présentent une densité neuronale significativement augmentée par rapport aux animaux n'ayant pas reçu de transplantation, témoignant d'une plus grande neurodégénérescence dans le groupe transplanté avec les bCGOs I (**Article II**). On note également que le nombre de neurones entourés d'un PNN est significativement augmenté seulement chez les animaux transplantés avec les bCGOs I en comparaison des animaux non transplantés, 56 jours après la lésion. On peut en tirer la conclusion que chez les animaux

transplantés avec les bCGOs I, lors du stade chronique, la moelle spinale est moins plastique et moins propice à la régénération des circuits neuronaux par la formation de nouvelles synapse (**Article II**) (Grycz *et al.*, 2022).

Nous pouvons émettre l'hypothèse que les différences observées lors de la transplantation des bCGOs I, proviennent d'un défaut de neuroprotection lors de la phase aiguë. En effet, la proportion plus importante de Mi-M Φ arborant un phénotype pro-inflammatoire M1, contribue à une neurodégénérescence et une perte fonctionnelle plus importante. La mort neuronale plus importante contribue à la formation d'un tissu non neurogène plus étendu et donc d'une cicatrice médullaire plus grande. La diminution de la polarisation des Mi-M Φ vers un phénotype M2 provoque un défaut de recrutement des cellules épendymaires, limitant leur différenciation en astrocytes participant à la formation de la cicatrice gliale. Les variations d'expression génétique des molécules impliquées dans la croissance axonale, combinée à la modulation de la cicatrice médullaire, du point de vue cellulaire et moléculaire, la rendant plus étanche à la régénération axonale, déstabilisent les cônes de croissances axonaux et provoquent une diminution de la régénération axonale.

Afin de confirmer cette hypothèse il serait intéressant de comparer la capacité de phagocytose des bCGOs (Wright *et al.*, 2018) et celle des Mi-M Φ , en fonction des cultures primaires transplantées. La phagocytose étant le point de départ de la régénération tissulaire, il est possible qu'un défaut de ce mécanisme soit observé et puisse contribuer à l'explication des événements s'en suivant. Une analyse des astrocytes réactifs peut aussi être utile. Récemment la vision du rôle des astrocytes dans les physiopathologies du SNC a évolué, mettant en avant la possibilité de deux types d'astrocytes réactifs ayant des rôles différents, les « prolifératifs » et les « non prolifératifs ». Dans cette description, les astrocytes prolifératifs participent à la réactivité du tissu médullaire en contribuant à la formation de la cicatrice gliale et en libérant des cytokines et des facteurs trophiques. Les astrocytes non prolifératifs, quant à eux, conservent leur structure et leurs connexions cellulaires afin de pouvoir continuer à assurer les fonctions observées en condition physiologique et contribuer à la préservation des cellules épargnées par la lésion (Sofroniew, 2020). Une déstabilisation de ce réseau astrocytaire pourrait provoquer des défauts de communication astrocyte/astrocyte mais aussi astrocyte/neurone, perturbant les mécanismes mis en jeu pour retrouver une homéostasie du tissu.

En résumant les effets bénéfiques apportés par les bCGOs I, nous pouvons conclure qu'elles contribuent tout de même à apporter un effet thérapeutique. Leur transplantation, comme celles des bCGOs H, provoque une réduction de la proportion de Mi-M Φ CD86+, 28

jours après la lésion ainsi que la remyélinisation et la réduction de la cicatrice médullaire devinable 56 jours après la lésion (aire MBP négative). Sa composition en laminine, identique aux animaux transplantés avec les bCGOs H, est associée à une augmentation du nombre de bourgeons axonaux dans le cœur lésionnel et à la formation de synapses dans la section caudale, 14 jours après la lésion. L'observation de la diminution des Mi-M Φ CD86+, alors que les valeurs obtenues 14 jours après la lésion sont plus proches des animaux non transplantés que ceux ayant reçu les bCGOs H est intéressante, si on la rapproche de la durée de survie des bCGOs I après transplantation. Les bCGOs I ne sont plus visibles dans le tissu médullaire 28 jours après la lésion (**Article II**). Malgré la production de facteurs de croissance plus importante que celle des bCGOs H, les modifications induites par la LMT avant leur prélèvement, stimulent leurs rôles d'immunocytes et leur participation à la réponse immunitaire lors des premières semaines de la physiopathologie. Cela a pour conséquence d'augmenter la mort neuronale plus rapidement qu'en présence de bCGOs H. Cependant après leur mort, il semblerait que les effets bénéfiques apportés par les bCGOs I lors des premières semaines soient visibles en phase chronique. Cela met en avant la plasticité de la cicatrice médullaire après le premier mois suivant la LMT.

Il est à noter que pour un grand nombre d'analyses, les animaux transplantés avec les bCGOs I présentent une hétérogénéité assez importante, en comparaison de ceux transplantés avec des bCGOs H. On peut supposer que la réactivité des bulbes olfactifs prélevés est variable en fonction des animaux malgré une lésion identique. Dans cette étude, un ratio de souris mâles et femelles de 50%/50% a été utilisé. Il est bien connu qu'il existe des différences quant à la réponse immunitaire entre les deux sexes. Chez les femelles, la réponse immunitaire est plus élevée et prolongée que chez les mâles. Elles sont, par conséquent, plus résistantes aux infections mais développent plus facilement des troubles auto-immuns et des maladies inflammatoires. La capacité de phagocytose des neutrophiles et des macrophages est plus importante chez les femelles, alors que chez les mâles, les monocytes produisent plus de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-6. La libération d'œstrogène stimule la réponse immunitaire innée et induit une augmentation de la prolifération des LBs et la production d'auto-anticorps (Voskuhl, 2011; Ruggieri *et al.*, 2016). Le rôle joué par les LBs et les anticorps anti-myéline après une LMT est important. Ils ont la capacité de pénétrer dans le parenchyme cérébral, influençant à la fois la croissance axonale et la dégénérescence neuronale (Ankeny *et al.*, 2009; Capuz *et al.*, 2022). Les taux différents d'interleukines et d'anticorps pourraient influencer la réactivité cérébrale.

L'étage médullaire est aussi un paramètre influençant la réponse inflammatoire et immunitaire. L'axe hypothalamo-pituitaire (HPA) influence la réponse immunitaire périphérique en produisant des glucocorticoïdes et de la norépinephrine. Juste après la lésion, l'HPA s'active et libère ces molécules qui ont la capacité d'inhiber la réponse immunitaire. Cependant la rupture des effecteurs axonaux sympathiques contribue à une surexpression de molécules immunomodulatrices, influençant la régénération médullaire. Les glandes surrénales sont innervées par des nerfs sortant de la moelle spinale au niveau des dernier segments médullaires thoraciques. Cette perturbation est donc vraie pour des lésions plus hautes que ces segments. Une atteinte de la moelle spinale sur les segments lombaires, ne produirait donc pas le même résultat. De plus, dans des maladies neurodégénératives humaine liées à l'âge comme la maladie d'Alzheimer, la perturbation de l'HPA et l'augmentation de la concentration sanguine de glucocorticoïdes aggravent les déficits cognitifs (Cruse *et al.*, 1996; Lucin *et al.*, 2007; Gupta & Morley, 2014).

Comme la réponse immunitaire et inflammatoire semblent être les acteurs principaux de l'apparition de la réactivité cérébrale après une LMT, l'idée de moduler la réponse immunitaire lors de la phase aiguë de la pathologie semble être intéressante. Cependant l'utilisation d'anti-inflammatoires stéroïdiens ou non stéroïdiens, malgré plus de 30 ans de recherche, n'a pas montré de résultats réellement convaincants quant à leur efficacité. Leur administration, les premières heures après la lésion, induit une amélioration de la récupération des fonctions motrices précoces mais a des conséquences sur la phase chronique, là où, elle réduit la plasticité favorisant la récupération fonctionnelle. La réponse inflammatoire ne peut pas être considérée seulement comme délétère. Elle permet la communication et la coordination cellulaire, permettant la mise en place des mécanismes de régénération. Son inhibition ou l'inhibition de l'un de ses acteurs, comme les cellules microgliales, perturbe la régénération médullaire (Bellver-Landete *et al.*, 2019; Brennan *et al.*, 2022). De plus, les glucocorticoïdes réduisent la différenciation des cellules souches neurales (Nürnberg *et al.*, 2018). L'idée d'agir sur la réponse inflammatoire n'est pourtant pas une mauvaise idée. Cependant, au vu de la complexité de la réponse physiopathologie de la LMT, la réduction de l'intensité de la réponse inflammatoire doit cibler précisément certains types cellulaires et à des moments précis. L'amélioration de la compréhension des mécanismes et leurs temporalités permettra le développement de thérapies répondant à ces besoins.

Ces dernières années, différentes équipes se sont intéressées au développement de transplantations n'utilisant plus de cellules, mais des exosomes. Les exosomes contiennent les

molécules « actives » sécrétées par les cellules. Ils sont faiblement immunogènes, laissant la possibilité de développer des transplantations autologues s'affranchissant de la perturbation généralisée de l'organisme (Zhang *et al.*, 2020).

A la vue de ces résultats, l'autogreffe de bCGOs reste donc, tout de même, une solution envisageable en l'absence de thérapies apportant une meilleure balance bénéfice/risque. Il serait intéressant de développer une approche multimodale reposant sur une thérapie permettant la réduction de la réponse immunitaire et la propagation de l'inflammation dans l'organisme, sans pour autant l'entraver. La limitation de l'inflammation, induite lors de la phase aigüe, permettrait ainsi de réduire la neurodégénérescence médullaire et diminuerait la propagation de la réponse inflammatoire au cerveau. Il sera donc alors possible de réaliser des autogreffes de bCGOs moins réactives que celles prélevées dans notre étude.

Objectif III - La transplantation de bOECs (H) dans la moelle spinale après une LMT corrige les perturbations cognitives provoquées par la lésion

Comme décrit précédemment, la réactivité périphérique provoquée par la LMT se retrouve aussi dans le cerveau. La présence de cytokines dans la circulation sanguine provoque leur pénétration dans le parenchyme cérébrale via des transporteurs sur les cellules endothéliales de la BBB (Pan & Kastin, 2016). Elles augmentent aussi la perméabilité de la BBB favorisant l'entrée dans le parenchyme de lymphocytes activés par la présence d'antigènes provenant de la moelle spinale et drainés dans les méninges (Spampinato *et al.*, 2022). La proximité des ganglions cervicaux profonds drainant l'ensemble du liquide interstitiel et de la lymphe, du réseau glymphatique, est aussi une source d'activation des lymphocytes (Radjavi *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2020). Ils peuvent aussi pénétrer dans le parenchyme par l'intermédiaire des capillaires du plexus choroïde, provoquant leur présence dans le LCR. La présence de cytokines et de lymphocytes activés, induit la réactivité des cellules microgliales cérébrales, perturbant l'homéostasie. Ces perturbations, en plus de toucher les OB, ont pu être observées dans d'autres aires cérébrales comme l'hippocampe, le cortex, ou encore le thalamus (Felix *et al.*, 2012; Wu, Zhao, *et al.*, 2014; Li, Ritzel, *et al.*, 2020). La LMT provoque dans l'hippocampe l'activation des cellules microgliales. Les taux d'expression des ARNm *tnfa*, *inos*, *il6*, témoignant d'une polarisation M1, sont augmentés dès le lendemain de la lésion et restent élevés 9 semaines après, alors que le taux d'ARNm associé au phénotype M2 *arg1* est rapidement augmenté le premier jour, puis est réduit 7 jours après la lésion, avant d'augmenter 9 semaines après, comme *ym1* (Wu, Zhao, *et al.*, 2014). On observe donc la mise en place d'une réponse microgliale identique à celle observée lors d'une lésion. La réponse microgliale est

associée à une diminution de la neurogenèse et de la densité neuronale, provoquant une diminution des capacités cognitives.

La réactivité cérébrale après une LMT a aussi été caractérisée chez l'Homme. Elle provoque chez la patient médullo-lésé, une augmentation des états anxieux et dépressifs ainsi qu'un déficit de la mémoire (Craig *et al.*, 2017). Nous nous sommes donc demandé qu'elles pouvaient être les conséquences d'une transplantation cellulaire médullaire après une LMT sur la réactivité cérébrale.

Pour répondre à cette question, nous avons transplanté des bCGOs dans des souris ayant subi une LMT et nous avons comparé leurs performances cognitives, 1 et 2 mois après la lésion à celles de souris n'ayant pas reçu de cellules, puis nous avons analysé par immunohistochimie, les modifications tissulaires de leur hippocampe, 64 jours après la lésion.

Les animaux ont réalisé des tests de mémoires (reconnaissance d'un nouvel objet et Y-maze), de résilience (suspension caudale) et d'anhédonie (consommation d'eau sucré). Parmi ces tests nous avons observé une différence uniquement sur le test de reconnaissance d'un nouvel objet (**Article II**). Les animaux transplantés montrent une mémoire de l'ancien objet et une curiosité pour le nouvel objet plus importante que les animaux n'ayant pas reçu de transplantation. Cela s'observe dès 32 jours après la lésion, avec une tendance à la hausse et à 60 jours où là, la différence avec le groupe contrôle est significative. Les performances des animaux transplantés, 60 jours après la lésion, est même très proche des performances enregistrées avec les animaux non lésés (**Article II**). Pour le test de consommation d'eau sucrée et le Y-maze, on peut noter des discordances avec la littérature (**Article II**). En effet dans plusieurs études il est mis en avant que la LMT diminue les performances des animaux lors de ces tests. La différence peut s'expliquer par l'intensité de la lésion. Celle que nous réalisons est considérée comme modérée. Dans l'étude Wu *et al.*, de 2016, les auteurs ont comparé les conséquences de la lésion sur la cognition, en comparant trois intensités de LMTs par contusions : légère, modérée et sévère. Ils mettent en avant que les perturbations cognitives s'observent lors de lésions sévères pour le test de consommation d'eau sucrée et sévère/modéré pour le test Y-maze. L'intensité de notre lésion ne permet probablement pas d'induire de différence lors de ces tests (Wu *et al.*, 2016).

L'amélioration des performances lors du test de reconnaissance d'un nouvel objet, s'explique par une amélioration de la neurogenèse dans la SGZ, observée 14 jours après la lésion. Elle est associée à une plus grande densité neuronale dans le DG (**Article II**). Même s'il

est décrit dans la littérature que la neurogenèse du DG produit des interneurons s'intégrant majoritairement dans le DG (Toni *et al.*, 2008; Llorens-Martín *et al.*, 2015), notre analyse ne permet pas de déterminer si ce plus grand nombre de neurones est associé à l'augmentation de la neurogenèse. L'injection d'EdU, permettant de marquer les cellules s'étant divisées, au moment de la LMT, permettrait de déterminer si les nouveaux neurones s'intègrent au réseau neuronal du DG. De plus, la caractérisation de l'apoptose cellulaire à des temps plus précoces apporterait aussi des informations sur la survie neuronale et la densité de neurones observés 64 jours après la lésion.

La transplantation de bCGOs diminue la quantité de cellules microgliales dans le CA1 14 jours après la lésion, puis dans le CA3 et le CA1 28 jours après la lésion et enfin seulement dans le CA3 64 jours après la lésion (**Article II**). L'augmentation de leur quantité ne permettent pas d'apporter des informations sur leurs polarisations, cependant au regard de leurs rôles dans la régulation des transmissions synaptiques, il est possible d'associer la diminution de leur nombre et l'amélioration des performances cognitives. Dans une étude cherchant à comparer les performances cognitives de rats de trois tranches d'âges : jeune, adulte et âgé, les performances des animaux âgés lors de la réalisation de tests cognitifs comme le test de reconnaissance d'objet, ont été diminuées. L'analyse de leur hippocampe révèle une augmentation du nombre de cellules microgliales, en particulier dans le CA3 (Canatelli-Mallat *et al.*, 2022). Le CA3 et le CA1 ont une communication intime, caractérisée par le réseau synaptique CA3-CA1. Cette communication joue un rôle important dans la mémorisation et la récupération. Une perturbation de celle-ci entraîne donc des déficits mémoriels importants (Malenka & Bear, 2004).

Là aussi, nous mettons en avant des modifications tissulaires et cellulaires. La réalisation d'expériences d'électrophysiologie permettra l'identification de la modulation fonctionnelle du réseau neuronal par la neurogenèse et la réactivité microgliale.

L'observation d'une perturbation de la neurogenèse dans le DG sans variation de la quantité de cellules microgliales met en avant la présence d'autres mécanismes. L'un d'eux pourrait être la diffusion de cytokines et d'anticorps dans le parenchyme par l'intermédiaire de la circulation sanguine et du LCR. Le TNF- α par exemple, est impliqué dans la plasticité synaptique et participe aux mécanismes de LTP et LTD (Stellwagen & Malenka, 2006). Lorsqu'il est en concentration importante, il induit une hyperactivité perturbant la communication neuronale, liée à des déficits cognitifs (Golia *et al.*, 2019). Sa présence, associée à d'autres cytokines pro-inflammatoires dans le parenchyme cérébral, induit une diminution de

l'interaction CX3CR1-CX3CL1 entre les cellules microgliales et les neurones, conduisant à une augmentation de la phagocytose des synapses et des neurones, ainsi qu'à la libération de cytokines pro-inflammatoires (Sellner *et al.*, 2016).

La transplantation médullaire de bCGOs peut donc contribuer de façon indirecte à la diminution de la réactivité cérébrale. En limitant l'activation des cellules microgliales et des leucocytes, elle limite donc la production de molécules pro-inflammatoires délétères pour le SNC et dérégulant les réseaux synaptiques. La quantité de ces molécules pro-inflammatoires se retrouve donc diminuée dans la circulation sanguine et le LCR, limitant ainsi la réactivité cérébrale et les pertes neuronales. Afin de confirmer cette hypothèse, l'analyse de la densité et de la survie neuronale ainsi que la densité et la stabilité synaptique à des temps précoces, permettrait de caractériser la perte neuronale et le déficit cognitif s'opérant après la LMT. Cela permettrait, ainsi, de mieux caractériser les mécanismes induits par la transplantation des bCGOs. Les analyses protéomiques du LCR et du sang seraient aussi intéressantes à réaliser. La présence de cytokines et chimiokines dans ces tissus après une LMT, est connue depuis longtemps (Anthony & Couch, 2014; Capirossi *et al.*, 2020). Le dosage de ces molécules après transplantation de bCGOs, permettrait la compréhension des acteurs moléculaires impliqués et de confirmer que les bCGOs agissent en limitant la propagation des molécules pro-inflammatoires. L'analyse de la perméabilité de la BBB, par l'injection d'un traceur, permettrait alors de faire le lien entre la propagation des molécules pro inflammatoires et la réactivité cérébrale.

Dans nos études, nous n'avons pas porté notre attention sur les astrocytes. Ces cellules partenaires clés des neurones, jouent un rôle important dans la régulation de l'homéostasie cérébrale ainsi que dans la régulation de la transmission synaptique par l'intermédiaire de la synapse tripartite. Organisés en réseau sous forme d'un syncytium, ils communiquent entre eux via des jonctions communicantes, les connexines, mais aussi avec les neurones. Les astrocytes sont sensibles à la présence d'IL-1 β , IL-6 et de TNF- α dans leur environnement. Ces cytokines sont responsables d'une vague de Ca²⁺ se propageant dans le syncytium et induisant des dysfonctionnements synaptiques, appelés synaptopathies, associées à des déficits cognitifs (Mandolesi *et al.*, 2015; Panattoni *et al.*, 2021).

Afin de déterminer si les effets observés sont propres aux bCGOs, nous avons fait réaliser le test de reconnaissance d'un nouvel objet à des souris ayant reçu une transplantation de MSCs obtenues après une culture purifiée de la fraction vasculaire stromale prélevée sur le

tissu adipeux inguinal. En parallèle, nous avons étudié la récupération fonctionnelle des animaux, puis leur cerveau et leur moelle spinale ont été étudiés.

Comme pour la transplantation de bCGOs, la transplantation de MSCs améliore les performances cognitives des animaux qui sont associées à une plus grande densité neuronale dans le DG deux mois après la lésion. Cependant l'analyse fonctionnelle et tissulaire de la moelle spinale, montre une absence d'amélioration des performances et aucun effet sur la cicatrice médullaire. L'absence d'effet thérapeutique sur la moelle spinale est discordante avec la littérature. Toutefois ici, nous avons réalisé nos tests seulement deux mois après la lésion, nous n'avons donc aucune donnée sur la phase aiguë, là où la réactivité médullaire ainsi que l'action des MSCs sont les plus importantes (Malgieri *et al.*, 2010; Vawda *et al.*, 2012; Boido *et al.*, 2014).

Nous pouvons nous demander si la transplantation de bCGOs I, comme dans la moelle spinale, apporte un effet thérapeutique diminué en comparaison des bCGOs H. Nous avons donc fait passer le test de reconnaissance du nouvel objet à des souris ayant subi une LMT et reçu des bCGOs I. Les résultats nous ont montré que ces animaux ont des performances cognitives identiques aux animaux n'ayant pas reçu de bCGOs, alors que ceux ayant reçu les bOECs H, comme indiqué avant, ont des performances proches des animaux non lésés (**Article II**). La poursuite de cette étude est en cours. L'analyse des cerveaux de ces animaux et la comparaison avec ceux ayant reçu des bOECs H, nous permettra de comprendre les différences cognitives observées.

L'amélioration des performances cognitives, mais sans récupération fonctionnelle chez les animaux ayant reçus les MSCs, indique que l'effet thérapeutique produit sur le cerveau par ces cellules et probablement également par les bCGOs, n'est pas liée à l'amélioration de la locomotion chez ces animaux.

Objectif IV – V et perspectives

La transplantation cellulaire est un domaine thérapeutique prometteur suscitant un grand intérêt dans le traitement des LMTs mais présentant ses limites. Les effets thérapeutiques qu'elle apporte dans les modèles animaux, permettent une meilleure compréhension de la physiopathologie de ce traumatisme. L'avancement des connaissances sur les mécanismes inflammatoires, immunitaires et régénératifs, définit, recherche après recherche, les rôles et la temporalité des différents acteurs impliqués.

La prise en compte de l'aspect global de la pathologie a poussé des chercheurs à associer différentes approches thérapeutiques. On distingue par exemple la transplantation de NPC associée à de la rééducation fonctionnelle (Lu *et al.*, 2022), la transplantation de MSCs et de la rTSMS (Huang *et al.*, 2022), la stimulation épидurale et l'injection de la chondroïtinase ABC (Sinopoulou *et al.*, 2022) ou encore l'utilisation d'un hydrogel associé à des MSCs (Haggerty *et al.*, 2022). L'ensemble de ces études montre que la combinaison des thérapies apporte de meilleurs effets thérapeutiques que chacune de ces thérapies seules.

Dans notre laboratoire nous développons une deuxième approche thérapeutique, la stimulation magnétique trans-spinele répétitive (rTSMS). La stimulation magnétique est initialement utilisée comme diagnostic pour la mesure des seuils d'excitabilité et de la vitesse de conduction ainsi que dans le traitement des patients souffrant de dépression (Becker *et al.*, 2019), d'AVC (Dionísio *et al.*, 2018), de Parkinson (Torres *et al.*, 2015) ou encore d'Alzheimer (Rabey & Dobronevsky, 2016).

L'analyse bibliographique des études sur l'utilisation de la stimulation magnétique sur les pathologies du SNC, a donc poussé à son étude sur des modèles murins de lésions médullaires. Les études réalisées dans le laboratoire par le Dr. Chaima Chalfouh dans le cadre de son doctorat et par Amandine Robac et Pauline Neveu dans le cadre de leur Master, auxquelles j'ai contribué de façon significative, sont respectivement résumées et présentées dans l'**Article III** et les **Annexes I et II**.

L'utilisation de la rTSMS aussi bien chez le rat que chez la souris, apporte un effet thérapeutique impressionnant. En effet, dans nos études, l'application d'un champ magnétique de 0,4T à une fréquence de 10 Hz, 10 min par jour, pendant 14 jours, améliore considérablement la récupération fonctionnelle des animaux. Elle réduit la formation de la cicatrice fibrotique chez la souris ainsi que les cavités cystiques chez le rat et elle promeut la cicatrice gliale ainsi que la régénération et la myélinisation des axones. Comme les bOECs, elle stimule l'activation,

le recrutement et la différenciation des cellules épendymaires. Cette thérapie, qui est déjà utilisée en clinique, est non invasive, indolore et sans effet secondaire connu. Ces caractéristiques la rendent intéressante d'autant plus qu'il est possible de la débiter seulement 10 jours après la lésion, correspondant au délai nécessaire pour l'application des thérapeutiques d'urgences actuelles. Elle est aussi efficace chez des souris considérées comme jeunes adultes et chez des souris âgées (**Article III, Annexe I et II**).

Pendant longtemps il était considéré que son mode d'action était lié à la dépolarisation des neurones. Cependant, son utilisation à des intensités ne permettant pas de polariser les neurones, induit aux mêmes effets. L'identification de structures cellulaires répondant spécifiquement aux champs magnétiques permettent de comprendre, en partie, son mode d'action. Elle agit sur des récepteurs magnétiques cryptochromes activant une cascade de signalisations cellulaires stimulant la régénération (Dufor *et al.*, 2019; Lohof *et al.*, 2022)

Nous nous sommes donc demandé, si la combinaison de la transplantation des bCGOs et de la rTSMS pouvait apporter de meilleurs effets thérapeutiques que les deux thérapies seules. Pour répondre à cette question quatre groupes d'étude ont été constitués : lésé (SCI), transplanté (bCGOs), stimulé (rTSMS) et transplanté – stimulé (bCGOs + rTSMS). La transplantation a été réalisée au moment de la lésion et la stimulation appliquée dès le lendemain de la LMT, pendant 14 jours.

Une analyse des performances sensori-motrices a été réalisée 15, 30 et 60 jours après la LMT, et une analyse histologique des moelles spinales des animaux a été conduite. Les résultats montrent que la rTSMS est plus efficace que la transplantation de bOECs sur l'ensemble des tests réalisés, mis à part sur l'analyse de la réactivité microgliale qui est identique. L'application des deux thérapies ne permet pas d'obtenir des effets supérieurs à la rTSMS seule (**Article IV**).

En comparaison des résultats obtenus dans les études s'intéressant à la combinaison de thérapies, nos résultats sont décevants. Cependant la transplantation de bCGOs, comme la rTSMS, apportent essentiellement des effets similaires. Leur mode d'action principal serait la neuroprotection et la réduction de la neurodégénérescence des neurones, conduisant à une réduction des événements physiopathologiques découlant de la LMT, favorisant alors un tissu moins réactif et pro-régénérateur. Du fait que la rTSMS apporte un effet thérapeutique impressionnant, il est possible qu'elle masque les effets thérapeutiques des bCGOs moins efficaces. Dans l'étude s'intéressant à la combinaison de la stimulation magnétique et la transplantation de MSC, citée précédemment, les auteurs observent que l'addition des deux

thérapies est supérieure à chacune d'elles seules. Les différences de mode opératoire comme le type cellulaire utilisé ou le type de stimulation magnétique peuvent expliquer les différences. En effet, dans cette étude, les animaux reçoivent un champ magnétique sur l'ensemble de leur corps pendant 8 semaines à raison d'une heure de stimulation par jour. La fréquence de 50 Hz et l'intensité de 1 mT utilisées, sont aussi différentes de notre protocole de stimulation (Huang *et al.*, 2022).

Afin d'améliorer les effets de la combinaison des deux thérapies et de potentialiser les effets de bCGOs, il serait intéressant de réaliser la transplantation deux semaines après la lésion, une fois l'application de la rTSMS terminée. On pourrait alors imaginer un relai des deux thérapies, d'autant plus que la transplantation des bCGOs dans un environnement moins réactif, potentialise leurs effets thérapeutiques (Basu *et al.*, 2022). De surcroît, cette combinaison clinique serait possible et pourrait corriger les limites de la transplantation autologue dont nous avons parlé précédemment. En effet, l'analyse des cerveaux de souris ayant subi une LMT et l'application de la rTSMS montrent que 7 jours après la LMT, les cellules microgliales des OB et également de l'hippocampe sont moins réactives que chez les souris n'ayant pas reçu de thérapie (**Données personnelles**).

Cette combinaison permettrait alors un effet neuroprotecteur important les 15 premiers jours suivant la lésion, lors de la phase aiguë qui est la phase la plus délétère pour le tissu médullaire. Puis les bCGOs, pendant les 30 jours suivant apporteraient un support trophique stimulant la prolifération des précurseurs neuronaux et la croissance axonale. On aurait alors l'application d'une thérapie sans discontinuer pendant les 6 semaines suivant la lésion, période la plus importante pour stimuler la régénération médullaire et la récupération fonctionnelle. De plus, il est à noter que la rTSMS, comme les bCGOs, stimule l'activation, le recrutement et la différenciation des cellules épendymaires. La transplantation retardée des bCGOs ne serait donc pas délétère quant à la formation de la cicatrice gliale (**Annexe I**).

Quelle que soit la thérapie, l'utilisation d'une rééducation fonctionnelle intensive est nécessaire afin de reproduire les mécanismes physiologiques de l'organisme.

Le développement d'une thérapie efficace pour le traitement des LMTs nécessitera encore plusieurs années de recherche. Cependant l'accroissement exponentiel des connaissances et des technologies nous autorise à croire au développement de cette thérapie dans les prochaines années. Pour être efficace, celle-ci devra obligatoirement prendre en compte le facteur multifactoriel et la complexité de la pathologie. Même si l'objectif final est de

permettre à des patients de retrouver des fonctions locomotrices leur permettant de se déplacer, le développement d'une thérapie ayant une bonne balance bénéfique/risque et permettant la récupération de fonctions très importantes pour l'Homme, comme la miction ou la possibilité d'avoir une vie sexuelle, sera une très grande avancée.

CONCLUSION

L'utilisation de la transplantation de bCGOs dans le traitement des pathologies du SNP et du SNC a montré son effet au travers de différentes études réalisées chez l'animal. Après une LMT, elle apporte un effet neuroprotecteur, immunomodulateur et neurorégénératif. Les essais cliniques quant à eux, montrent des effets hétérogènes. La différence de physiopathologie entre l'Homme et les modèles animaux ainsi que les différences de protocoles utilisés ou encore l'application de la thérapie à des stades de la pathologie différents, explique en partie les différences entre les résultats dans des modèles animaux et chez l'Homme.

La LMT provoque une réponse immunitaire généralisée dans l'organisme associée à une réactivité des tissus périphériques et cérébraux. Dans le cerveau, cette réactivité conduit à l'activation des cellules microgliales entraînant une diminution de la neurogenèse, de la densité neuronale et des performances cognitives.

Le deuxième objectif de ces travaux a été de caractériser l'effet de la LMT sur la qualité thérapeutique des bCGOs, quand celles-ci sont prélevées sur un animal médullo-lésé puis transplantées dans un animal ayant subi une LMT.

Dans ce contexte, le prélèvement de OB conduit à la génération de bCGOs possédant des propriétés neurorégénératives diminuées par rapport à des OB prélevés sur un animal sain. Cette modulation des capacités thérapeutiques a été observée par la caractérisation de la cicatrice médullaire, la réactivité microgliale, la plasticité médullaire et la récupération fonctionnelle en résultant.

A la vue de nos résultats, la transplantation cellulaire après une LMT, en particulier de bCGOs montre ses limites. Le développement d'approches permettant l'inhibition préliminaire de l'activation immunitaire et l'inflammation responsable de la réactivité des cellules des bulbes olfactifs, mais sans interférer avec les processus de régénération, serait donc une des pistes afin de maximiser l'effet thérapeutique des cellules.

C'est pour cela que le troisième objectif de ces travaux, a été de déterminer si la thérapie médullaire pouvait agir à distance et réduire la réactivité cérébrale et les atteintes cognitives associées. Par la transplantation de bCGOs, nous avons mis en avant qu'il était possible de réduire la réactivité microgliale hippocampique et améliorer la mémoire des animaux. Ces résultats innovants, permettent d'améliorer la compréhension de la physiopathologie des LMTs et de sa vision multimodale, nécessaire au développement d'une thérapie efficace qui pourrait traiter toutes les conséquences de la LMT.

La difficulté d'agir sur la réponse immunitaire après la lésion et la complexité de la réalisation de transplantations allogéniques chez l'Homme, limite l'utilisation des bCGOs. Le développement d'approches n'étant pas influencés par la lésion médullaire est donc nécessaire.

La rTSMS est une thérapie connue et utilisée depuis longtemps dans le traitement de maladies cérébrales. Son étude au sein du laboratoire depuis plusieurs années a permis de mettre en avant son énorme potentiel. En plus d'être non invasive, indolore, utilisée en clinique et applicable par n'importe quel personnel médical, la rTSMS apporte un effet thérapeutique semblable à la transplantation de bCGOs mais avec une intensité bien plus importante. De plus, comme avec les bCGOs, il semblerait qu'elle agisse aussi sur la réactivité cérébrale.

En conclusion, nos études apportent des données nécessaires à l'amélioration de la transplantation cellulaire et met en lumière l'espoir que suscite la rTSMS. Malgré nos résultats, pouvant être expliqués par un défaut de temporalité, son utilisation combinée à d'autres thérapies pourrait être l'une des pistes les plus prometteuse pour le traitement des LMTs. Dans le cas de la transplantation de bCGOs, son utilisation en phase aiguë permettrait de diminuer l'émergence des dommages secondaires responsables de la neurodégénérescence médullaire mais aussi de la réactivité des bulbes OB. Il serait alors possible de réaliser une transplantation autologue sans perte de fonction thérapeutique du matériel biologique. Cela permettra d'ajouter l'effet neuroprotecteurs de la rTSMS lors des deux premières semaines suivant la LMT à la capacité des bCGOs de stimuler la croissance axonale pendant les trente jours suivant l'application de la rTSMS.

Le chemin permettant la compréhension totale de la physiopathologie des LMTs et le développement d'une thérapie efficace chez l'Homme est encore long. Cependant, l'accroissement exponentiel des connaissances, l'amélioration des technologies et la curiosité combinés à l'ingéniosité des chercheurs, permettent d'avoir un espoir immense quant au développement d'une thérapie efficace.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, N.J. (2004) Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem. Int.*, **45**, 545–552.
- Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., & Begley, D.J. (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.*, **37**, 13–25.
- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006) Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.*, **7**, 41–53.
- Absinta, M., Ha, S.-K., Nair, G., Sati, P., Luciano, N.J., Palisoc, M., Louveau, A., Zaghoul, K.A., Pittaluga, S., Kipnis, J., & Reich, D.S. (2017) Human and nonhuman primate meninges harbor lymphatic vessels that can be visualized noninvasively by MRI. *eLife*, **6**, e29738.
- Aguirre, A., Rubio, M.E., & Gallo, V. (2010) Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature*, **467**, 323–327.
- Agulhon, C., Petravicz, J., McMullen, A.B., Sweger, E.J., Minton, S.K., Taves, S.R., Casper, K.B., Fiacco, T.A., & McCarthy, K.D. (2008) What Is the Role of Astrocyte Calcium in Neurophysiology? *Neuron*, **59**, 932–946.
- Ahmed, Z. & Wieraszko, A. (2008) Combined effects of acrobatic exercise and magnetic stimulation on the functional recovery after spinal cord lesions. *J. Neurotrauma*, **25**, 1257–1269.
- Ahuja, C.S., Wilson, J.R., Nori, S., Kotter, M.R.N., Druschel, C., Curt, A., & Fehlings, M.G. (2017) Traumatic spinal cord injury. *Nat. Rev. Dis. Primer*, **3**, 1–21.
- Albayar, A.A., Roche, A., Swiatkowski, P., Antar, S., Ouda, N., Emara, E., Smith, D.H., Ozturk, A.K., & Awad, B.I. (2019) Biomarkers in Spinal Cord Injury: Prognostic Insights and Future Potentials. *Front. Neurol.*, **10**, 27.
- Albrecht, U., Yang, X., Asselta, R., Keitel, V., Tenchini, M.L., Ludwig, S., Heinrich, P.C., Häussinger, D., Schaper, F., & Bode, J.G. (2007) Activation of NF-kappaB by IL-1beta blocks IL-6-induced sustained STAT3 activation and STAT3-dependent gene expression of the human gamma-fibrinogen gene. *Cell. Signal.*, **19**, 1866–1878.
- Alexanian, A.R., Svendsen, C.N., Crowe, M.J., & Kurpad, S.N. (2011) Transplantation of human glial-restricted neural precursors into injured spinal cord promotes functional and sensory recovery without causing allodynia. *Cytotherapy*, **13**, 61–68.
- Alfaro-Cervello, C., Soriano-Navarro, M., Mirzadeh, Z., Alvarez-Buylla, A., & Garcia-Verdugo, J.M. (2012) Biciliated ependymal cell proliferation contributes to spinal cord growth. *J. Comp. Neurol.*, **520**, 3528–3552.
- Alizadeh, A., Dyck, S.M., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2015) Myelin damage and repair in pathologic CNS: challenges and prospects. *Front. Mol. Neurosci.*, **8**, 35.
- Alizadeh, A., Dyck, S.M., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2019) Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Front. Neurol.*, **10**, 282.
- Allen, N.J., Bennett, M.L., Foo, L.C., Wang, G.X., Chakraborty, C., Smith, S.J., & Barres, B.A. (2012) Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature*, **486**, 410–414.
- Alliot, F., Gobin, I., & Pessac, B. (1999) Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Dev. Brain Res.*, **117**, 145–152.
- Alvarez, J.I., Dodelet-Devillers, A., Kebir, H., Ifergan, I., Fabre, P.J., Terouz, S., Sabbagh, M., Wosik, K., Bourbonnière, L., Bernard, M., van Horssen, J., de Vries, H.E., Charron, F., & Prat, A. (2011) The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science*, **334**, 1727–1731.
- Amaral, D.G. & Witter, M.P. (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, **31**, 571–591.

- Anderson, M.A., Burda, J.E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T.M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B.S., Deming, T.J., & Sofroniew, M.V. (2016) Astrocyte scar formation aids CNS axon regeneration. *Nature*, **532**, 195–200.
- Angeli, C.A., Boakye, M., Morton, R.A., Vogt, J., Benton, K., Chen, Y., Ferreira, C.K., & Harkema, S.J. (2018) Recovery of Over-Ground Walking after Chronic Motor Complete Spinal Cord Injury. *N. Engl. J. Med.*, **379**, 1244–1250.
- Ankeny, D.P., Guan, Z., & Popovich, P.G. (2009) B cells produce pathogenic antibodies and impair recovery after spinal cord injury in mice. *J. Clin. Invest.*, **119**, 2990–2999.
- Ankeny, D.P., Lucin, K.M., Sanders, V.M., McGaughy, V.M., & Popovich, P.G. (2006) Spinal cord injury triggers systemic autoimmunity: evidence for chronic B lymphocyte activation and lupus-like autoantibody synthesis. *J. Neurochem.*, **99**, 1073–1087.
- Anthony, D.C. & Couch, Y. (2014) The systemic response to CNS injury. *Exp. Neurol.*, **258**, 105–111.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H.R., Robitaille, R., & Volterra, A. (2014) Gliotransmitters Travel in Time and Space. *Neuron*, **81**, 728–739.
- Araujo, D. & Cotman, C. (1992) Basic FGF in astroglial, microglial, and neuronal cultures: characterization of binding sites and modulation of release by lymphokines and trophic factors. *J. Neurosci.*, **12**, 1668–1678.
- Armand, J. (1982) The origin, course and terminations of corticospinal fibers in various mammals. *Prog. Brain Res.*, **57**, 329–360.
- Aspelund, A., Antila, S., Proulx, S.T., Karlsen, T.V., Karaman, S., Detmar, M., Wiig, H., & Alitalo, K. (2015) A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J. Exp. Med.*, **212**, 991–999.
- Attwell, D., Buchan, A.M., Charpak, S., Lauritzen, M., MacVicar, B.A., & Newman, E.A. (2010) Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*, **468**, 232–243.
- Bachstetter, A.D., Morganti, J.M., Jernberg, J., Schlunk, A., Mitchell, S.H., Brewster, K.W., Hudson, C.E., Cole, M.J., Harrison, J.K., Bickford, P.C., & Gemma, C. (2011) Fractalkine and CX3CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiol. Aging*, **32**, 2030–2044.
- Badimon, A., Strasburger, H.J., Ayata, P., Chen, X., Nair, A., Ikegami, A., Hwang, P., Chan, A.T., Graves, S.M., Uweru, J.O., Ledderose, C., Kutlu, M.G., Wheeler, M.A., Kahan, A., Ishikawa, M., Wang, Y.-C., Loh, Y.-H.E., Jiang, J.X., Surmeier, D.J., Robson, S.C., Junger, W.G., Sebra, R., Calipari, E.S., Kenny, P.J., Eyo, U.B., Colonna, M., Quintana, F.J., Wake, H., Gradinaru, V., & Schaefer, A. (2020) Negative feedback control of neuronal activity by microglia. *Nature*, **586**, 417–423.
- Balland, E., Dam, J., Langlet, F., Caron, E., Steculorum, S., Messina, A., Rasika, S., Falluel-Morel, A., Anouar, Y., Dehouck, B., Trinquet, E., Jockers, R., Bouret, S.G., & Prévot, V. (2014) Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab.*, **19**, 293–301.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., & Gutierrez, E.G. (1994) Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosci. Lett.*, **179**, 53–56.
- Banks, W.A., Ortiz, L., Plotkin, S.R., & Kastin, A.J. (1991) Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **259**, 988–996.
- Barbour, H.R., Plant, C.D., Harvey, A.R., & Plant, G.W. (2013) Tissue sparing, behavioral recovery, supraspinal axonal sparing/regeneration following sub-acute glial transplantation in a model of spinal cord contusion. *BMC Neurosci.*, **14**, 106.

- Barnabé-Heider, F., Göritz, C., Sabelström, H., Takebayashi, H., Pfrieger, F.W., Meletis, K., & Frisén, J. (2010) Origin of New Glial Cells in Intact and Injured Adult Spinal Cord. *Cell Stem Cell*, **7**, 470–482.
- Barra, B., Conti, S., Perich, M.G., Zhuang, K., Schiavone, G., Fallegger, F., Galan, K., James, N.D., Barraud, Q., Delacombaz, M., Kaeser, M., Rouiller, E.M., Milekovic, T., Lacour, S., Bloch, J., Courtine, G., & Capogrosso, M. (2022) Epidural electrical stimulation of the cervical dorsal roots restores voluntary upper limb control in paralyzed monkeys. *Nat. Neurosci.*, **25**, 924–934.
- Barraud, P., Seferiadis, A.A., Tyson, L.D., Zwart, M.F., Szabo-Rogers, H.L., Ruhrberg, C., Liu, K.J., & Baker, C.V.H. (2010) Neural crest origin of olfactory ensheathing glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 21040–21045.
- Bartzokis, G., Lu, P.H., Heydari, P., Couvrette, A., Lee, G.J., Kalashyan, G., Freeman, F., Grinstead, J.W., Villablanca, P., Finn, J.P., Mintz, J., Alger, J.R., & Altshuler, L.L. (2012) Multimodal magnetic resonance imaging assessment of white matter aging trajectories over the lifespan of healthy individuals. *Biol. Psychiatry*, **72**, 1026–1034.
- Basu, J. & Siegelbaum, S.A. (2015) The Corticohippocampal Circuit, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **7**.
- Basu, S., Choudhury, I.N., Lee, J.Y.P., Chacko, A., Ekberg, J.A.K., & St John, J.A. (2022) Macrophages Treated with VEGF and PDGF Exert Paracrine Effects on Olfactory Ensheathing Cell Function. *Cells*, **11**, 2408.
- Battista, D., Ferrari, C.C., Gage, F.H., & Pitossi, F.J. (2006) Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.*, **23**, 83–93.
- Baumann, N. & Pham-Dinh, D. (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.*, **81**, 871–927.
- Beck, K.D., Nguyen, H.X., Galvan, M.D., Salazar, D.L., Woodruff, T.M., & Anderson, A.J. (2010) Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain*, **133**, 433–447.
- Becker, J.E., Shultz, E.K.B., & Maley, C.T. (2019) Transcranial Magnetic Stimulation in Conditions Other than Major Depressive Disorder. *Child Adolesc. Psychiatr. Clin. N. Am.*, **28**, 45–52.
- Belci, M., Catley, M., Husain, M., Frankel, H.L., & Davey, N.J. (2004) Magnetic brain stimulation can improve clinical outcome in incomplete spinal cord injured patients. *Spinal Cord*, **42**, 417–419.
- Bellver-Landete, V., Bretheau, F., Mailhot, B., Vallières, N., Lessard, M., Janelle, M.-E., Vernoux, N., Tremblay, M.-È., Fuehrmann, T., Shoichet, M.S., & Lacroix, S. (2019) Microglia are an essential component of the neuroprotective scar that forms after spinal cord injury. *Nat. Commun.*, **10**, 518.
- Benabid, A.L., Costecalde, T., Eliseyev, A., Charvet, G., Verney, A., Karakas, S., Foerster, M., Lambert, A., Morinière, B., Abroug, N., Schaeffer, M.-C., Moly, A., Sauter-Starace, F., Ratel, D., Moro, C., Torres-Martinez, N., Langar, L., Oddoux, M., Polosan, M., Pezzani, S., Auboiron, V., Aksenova, T., Mestais, C., & Chabardes, S. (2019) An exoskeleton controlled by an epidural wireless brain-machine interface in a tetraplegic patient: a proof-of-concept demonstration. *Lancet Neurol.*, **18**, 1112–1122.
- Benito, J., Kumru, H., Murillo, N., Costa, U., Medina, J., Tormos, J.M., Pascual-Leone, A., & Vidal, J. (2012) Motor and gait improvement in patients with incomplete spinal cord injury induced by high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation. *Top. Spinal Cord Inj. Rehabil.*, **18**, 106–112.

- Benner, E.J., Luciano, D., Jo, R., Abdi, K., Paez-Gonzalez, P., Sheng, H., Warner, D., Liu, C., Eroglu, C., & Kuo, C.T. (2013) Post-injury protective astrogenesis from SVZ niche is controlled by Notch modulator Thbs4. *Nature*, **497**, 369–373.
- Berdugo-Vega, G., Arias-Gil, G., López-Fernández, A., Artegiani, B., Wasielewska, J.M., Lee, C.-C., Lippert, M.T., Kempermann, G., Takagaki, K., & Calegari, F. (2020) Increasing neurogenesis refines hippocampal activity rejuvenating navigational learning strategies and contextual memory throughout life. *Nat. Commun.*, **11**, 135.
- Bialas, A.R. & Stevens, B. (2013) TGF- β Signaling Regulates Neuronal C1q Expression and Developmental Synaptic Refinement. *Nat. Neurosci.*, **16**, 1773–1782.
- Bican, O., Minagar, A., & Pruitt, A.A. (2013) The Spinal Cord: A Review of Functional Neuroanatomy. *Neurol. Clin.*, **31**, 1–18.
- Bijlard, M., Klunder, B., de Jonge, J.C., Nomden, A., Tyagi, S., de Vries, H., Hoekstra, D., & Baron, W. (2015) Transcriptional expression of myelin basic protein in oligodendrocytes depends on functional syntaxin 4: a potential correlation with autocrine signaling. *Mol. Cell. Biol.*, **35**, 675–687.
- Blight, A.R. (1992) Macrophages and inflammatory damage in spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, **9 Suppl 1**, S83-91.
- Bliss, T.V. & Lomo, T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.*, **232**, 331–356.
- Boggs, J.M. & Wang, H. (2004) Co-clustering of galactosylceramide and membrane proteins in oligodendrocyte membranes on interaction with polyvalent carbohydrate and prevention by an intact cytoskeleton. *J. Neurosci. Res.*, **76**, 342–355.
- Böhm, U.L., Prendergast, A., Djenoune, L., Nunes Figueiredo, S., Gomez, J., Stokes, C., Kaiser, S., Suster, M., Kawakami, K., Charpentier, M., Concordet, J.-P., Rio, J.-P., Del Bene, F., & Wyart, C. (2016) CSF-contacting neurons regulate locomotion by relaying mechanical stimuli to spinal circuits. *Nat. Commun.*, **7**, 10866.
- Boido, M., Garbossa, D., Fontanella, M., Ducati, A., & Vercelli, A. (2014) Mesenchymal Stem Cell Transplantation Reduces Glial Cyst and Improves Functional Outcome After Spinal Cord Compression. *World Neurosurg.*, **81**, 183–190.
- Boison, D. & Stoffel, W. (1994) Disruption of the compacted myelin sheath of axons of the central nervous system in proteolipid protein-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 11709–11713.
- Boldrini, M., Fulmore, C.A., Tartt, A.N., Simeon, L.R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G.B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A.J., Hen, R., & Mann, J.J. (2018) Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell*, **22**, 589–599.e5.
- Bolos, M., Perea, J., Terreros-Roncal, J., Pallas-Bazarrá, N., Jurado-Arjona, J., Avila, J., & Llorens-Martin, M. (2018) Absence of microglial CX3CR1 impairs the synaptic integration of adult-born hippocampal granule neurons. *Brain. Behav. Immun.*, **68**, 76–89.
- Bombardi, C., Grandis, A., Gardini, A., & Cozzi, B. (2013) Nitroergic neurons in the spinal cord of the bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). *Anat. Rec. Hoboken NJ 2007*, **296**, 1603–1614.
- Borsini, A., Zunszain, P.A., Thuret, S., & Pariante, C.M. (2015) The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. *Trends Neurosci.*, **38**, 145–157.
- Bottai, D., Madaschi, L., Di Giulio, A.M., & Gorio, A. (2008) Viability-Dependent Promoting Action of Adult Neural Precursors in Spinal Cord Injury. *Mol. Med.*, **14**, 634–644.
- Boullerne, A.I. (2016) The history of myelin. *Exp. Neurol.*, **283**, 431–445.

- Bove, G.M. & Moskowitz, M.A. (1997) Primary afferent neurons innervating guinea pig dura. *J. Neurophysiol.*, **77**, 299–308.
- Bracken, M.B., Collins, W.F., Freeman, D.F., Shepard, M.J., Wagner, F.W., Silten, R.M., Hellenbrand, K.G., Ransohoff, J., Hunt, W.E., & Perot, P.L. (1984) Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *JAMA*, **251**, 45–52.
- Bracken, M.B. & Holford, T.R. (1993) Effects of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS 2. *J. Neurosurg.*, **79**, 500–507.
- Bracken, M.B., Shepard, M.J., Collins, W.F., Holford, T.R., Young, W., Baskin, D.S., Eisenberg, H.M., Flamm, E., Leo-Summers, L., & Maroon, J. (1990) A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N. Engl. J. Med.*, **322**, 1405–1411.
- Bracken, M.B., Shepard, M.J., Holford, T.R., Leo-Summers, L., Aldrich, E.F., Fazl, M., Fehlings, M., Herr, D.L., Hitchon, P.W., Marshall, L.F., Nockels, R.P., Pascale, V., Perot, P.L., Piepmeyer, J., Sonntag, V.K., Wagner, F., Wilberger, J.E., Winn, H.R., & Young, W. (1997) Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. *JAMA*, **277**, 1597–1604.
- Brambilla, R., Persaud, T., Hu, X., Karmally, S., Shestopalov, V.I., Dvorientchikova, G., Ivanov, D., Nathanson, L., Barnum, S.R., & Bethea, J.R. (2009) Transgenic Inhibition of Astroglial NF- κ B Improves Functional Outcome in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Suppressing Chronic Central Nervous System Inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, **182**, 2628–2640.
- Breasted, J.H. (1924) Historical Tradition and Oriental Research. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **10**, 289–294.
- Brennan, F.H., Li, Y., Wang, C., Ma, A., Guo, Q., Li, Y., Pukos, N., Campbell, W.A., Witcher, K.G., Guan, Z., Kigerl, K.A., Hall, J.C.E., Godbout, J.P., Fischer, A.J., McTigue, D.M., He, Z., Ma, Q., & Popovich, P.G. (2022) Microglia coordinate cellular interactions during spinal cord repair in mice. *Nat. Commun.*, **13**, 4096.
- Bretzner, F., Gilbert, F., Baylis, F., & Brownstone, R.M. (2011) Target Populations for First-In-Human Embryonic Stem Cell Research in Spinal Cord Injury. *Cell Stem Cell*, **8**, 468–475.
- Brook, G.A., Plate, D., Franzen, R., Martin, D., Moonen, G., Schoenen, J., Schmitt, A.B., Noth, J., & Nacimiento, W. (1998) Spontaneous longitudinally orientated axonal regeneration is associated with the Schwann cell framework within the lesion site following spinal cord compression injury of the rat. *J. Neurosci. Res.*, **53**, 51–65.
- Bunge, M.B. & Wood, P.M. (2012) Realizing the maximum potential of Schwann cells to promote recovery from spinal cord injury. *Handb. Clin. Neurol.*, **109**, 523–540.
- Burda, J.E. & Sofroniew, M.V. (2014) Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*, **81**, 229–248.
- Burgess, N. & O’Keefe, J. (1996) Neuronal computations underlying the firing of place cells and their role in navigation. *Hippocampus*, **6**, 749–762.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., & Ellisman, M.H. (2002) Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains. *J. Neurosci.*, **22**, 183–192.
- Bywalez, W.G., Ona-Jodar, T., Lukas, M., Ninkovic, J., & Egger, V. (2016) Dendritic Arborization Patterns of Small Juxtglomerular Cell Subtypes within the Rodent Olfactory Bulb. *Front. Neuroanat.*, **10**, 127.

- Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., Thompson, W.J., & Barres, B.A. (2008) A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. *J. Neurosci.*, **28**, 264–278.
- Calandra, T. & Roger, T. (2003) Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, **3**, 791–800.
- Campbell, S.J., Perry, V.H., Pitossi, F.J., Butchart, A.G., Chertoff, M., Waters, S., Dempster, R., & Anthony, D.C. (2005) Central nervous system injury triggers hepatic CC and CXC chemokine expression that is associated with leukocyte mobilization and recruitment to both the central nervous system and the liver. *Am. J. Pathol.*, **166**, 1487–1497.
- Canatelli-Mallat, M., Chiavellini, P., Lehmann, M., Goya, R.G., & Morel, G.R. (2022) Age-related loss of recognition memory and its correlation with hippocampal and perirhinal cortex changes in female Sprague Dawley rats. *Behav. Brain Res.*, **435**, 114026.
- Cao, Q.L., Zhang, Y.P., Howard, R.M., Walters, W.M., Tsoulfas, P., & Whittemore, S.R. (2001) Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. *Exp. Neurol.*, **167**, 48–58.
- Capirossi, R., Piunti, B., Fernández, M., Maietti, E., Rucci, P., Negrini, S., Giovannini, T., Kiekens, C., & Calzà, L. (2020) Early CSF Biomarkers and Late Functional Outcomes in Spinal Cord Injury. A Pilot Study. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 9037.
- Capuz, A., Karnoub, M.-A., Osien, S., Rose, M., Mériaux, C., Fournier, I., Devos, D., Vanden Abeele, F., Rodet, F., Cizkova, D., & Salzet, M. (2022) The Antibody Dependant Neurite Outgrowth Modulation Response Involvement in Spinal Cord Injury. *Front. Immunol.*, **13**, 882830.
- Carare, R.O., Bernardes-Silva, M., Newman, T.A., Page, A.M., Nicoll, J. a. R., Perry, V.H., & Weller, R.O. (2008) Solutes, but not cells, drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries: significance for cerebral amyloid angiopathy and neuroimmunology. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **34**, 131–144.
- Carulli, D., Rhodes, K.E., Brown, D.J., Bonnert, T.P., Pollack, S.J., Oliver, K., Strata, P., & Fawcett, J.W. (2006) Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *J. Comp. Neurol.*, **494**, 559–577.
- Casha, S., Zygun, D., McGowan, M.D., Bains, I., Yong, V.W., & John Hurlbert, R. (2012) Results of a phase II placebo-controlled randomized trial of minocycline in acute spinal cord injury. *Brain*, **135**, 1224–1236.
- Castillo, C., Saez-Orellana, F., Godoy, P.A., & Fuentealba, J. (2022) Microglial Activation Modulated by P2X4R in Ischemia and Repercussions in Alzheimer’s Disease. *Front. Physiol.*, **13**, 814999.
- Chalfouh, C., Guillou, C., Hardouin, J., Delarue, Q., Li, X., Duclos, C., Schapman, D., Marie, J.-P., Cosette, P., & Guérout, N. (2020) The Regenerative Effect of Trans-spinal Magnetic Stimulation After Spinal Cord Injury: Mechanisms and Pathways Underlying the Effect. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.*, **17**, 2069–2088.
- Chedly, J., Soares, S., Montembault, A., von Boxberg, Y., Veron-Ravaille, M., Mouffle, C., Benassy, M.-N., Taxi, J., David, L., & Nothias, F. (2017) Physical chitosan microhydrogels as scaffolds for spinal cord injury restoration and axon regeneration. *Biomaterials*, **138**, 91–107.
- Chen, D., Xi, H., Tan, K., & Huang, H. (2022) Recovering Voiding and Sex Function in a Patient with Chronic Complete Spinal Cord Injury by Olfactory Ensheathing Cell Transplantation. *Case Rep. Neurol. Med.*, **2022**, 9496652.
- Chen, K., Zhang, L., Tan, M., Lai, C.S.W., Li, A., Ren, C., & So, K.-F. (2017) Treadmill exercise suppressed stress-induced dendritic spine elimination in mouse barrel cortex and improved working memory via BDNF/TrkB pathway. *Transl. Psychiatry*, **7**, e1069.

- Chen, Y., Dai, Z., Fan, R., Mikulis, D.J., Qiu, J., Shen, Z., Wang, R., Lai, L., Tang, Y., Li, Y., Jia, Y., Yan, G., & Wu, R. (2020) Glymphatic System Visualized by Chemical-Exchange-Saturation-Transfer Magnetic Resonance Imaging. *ACS Chem. Neurosci.*, **11**, 1978–1984.
- Chernousov, M.A. & Carey, D.J. (2000) Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors. *Histol. Histopathol.*, **15**, 593–601.
- Chevreau, R., Ghazale, H., Ripoll, C., Chalfouh, C., Delarue, Q., Hemonnot-Girard, A.L., Mamaeva, D., Hirbec, H., Rothhut, B., Wahane, S., Perrin, F.E., Noristani, H.N., Guerout, N., & Hugnot, J.P. (2021) RNA Profiling of Mouse Ependymal Cells after Spinal Cord Injury Identifies the Oncostatin Pathway as a Potential Key Regulator of Spinal Cord Stem Cell Fate. *Cells*, **10**, 3332.
- Chhabra, H.S., Lima, C., Sachdeva, S., Mittal, A., Nigam, V., Chaturvedi, D., Arora, M., Aggarwal, A., Kapur, R., & Khan, T. a. H. (2009) Autologous olfactory [corrected] mucosal transplant in chronic spinal cord injury: an Indian Pilot Study. *Spinal Cord*, **47**, 887–895.
- Chhor, V., Le Charpentier, T., Lebon, S., Oré, M.-V., Celador, I.L., Jossierand, J., Degos, V., Jacotot, E., Hagberg, H., Sävmán, K., Mallard, C., Gressens, P., & Fleiss, B. (2013) Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain. Behav. Immun.*, **32**, 70–85.
- Cho, T.A. (2015) Spinal cord functional anatomy. *Contin. Minneap. Minn*, **21**, 13–35.
- Cho, Y., Sloutsky, R., Naegle, K.M., & Cavalli, V. (2013) Injury-induced HDAC5 nuclear export is essential for axon regeneration. *Cell*, **155**, 894–908.
- Chojnacki, A., Mak, G., & Weiss, S. (2011) PDGFR α Expression Distinguishes GFAP-Expressing Neural Stem Cells from PDGF-Responsive Neural Precursors in the Adult Periventricular Area. *J. Neurosci.*, **31**, 9503–9512.
- Christopherson, K.S., Ullian, E.M., Stokes, C.C.A., Mallowney, C.E., Hell, J.W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D.F., Bornstein, P., & Barres, B.A. (2005) Thrombospondins Are Astrocyte-Secreted Proteins that Promote CNS Synaptogenesis. *Cell*, **120**, 421–433.
- Chung, W.-S., Clarke, L.E., Wang, G.X., Stafford, B.K., Sher, A., Chakraborty, C., Joung, J., Foo, L.C., Thompson, A., Chen, C., Smith, S.J., & Barres, B.A. (2013) Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*, **504**, 394–400.
- Coles, J.A., Myburgh, E., Brewer, J.M., & McMenamin, P.G. (2017) Where are we? The anatomy of the murine cortical meninges revisited for intravital imaging, immunology, and clearance of waste from the brain. *Prog. Neurobiol.*, **156**, 107–148.
- Conley, B.J., Young, J.C., Trounson, A.O., & Mollard, R. (2004) Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 555–567.
- Craig, A., Guest, R., Tran, Y., & Middleton, J. (2017) Cognitive Impairment and Mood States after Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma*, **34**, 1156–1163.
- Cramer, G.D. & Darby, S.A. (2003) Clinical Anatomy of the Spine, Spinal Cord, and ANS - 3rd Edition
- Crowe, M.J., Sun, Z.-P., Battocletti, J.H., Macias, M.Y., Pintar, F.A., & Maiman, D.J. (2003) Exposure to pulsed magnetic fields enhances motor recovery in cats after spinal cord injury. *Spine*, **28**, 2660–2666.
- Cruse, J.M., Keith, J.C., Bryant, M.L., & Lewis, R.E. (1996) Immune system-neuroendocrine dysregulation in spinal cord injury. *Immunol. Res.*, **15**, 306–314.
- Cuadros, M.A., Martin, C., Coltey, P., Almendros, A., & Navascués, J. (1993) First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, **330**, 113–129.

- Cuevas, M.E., Carrasco, M.A., Fuentes, Y., Castro, P., Nualart, F., Roa, J., & Aguayo, L.G. (2005) The presence of glia stimulates the appearance of glycinergic synaptic transmission in spinal cord neurons. *Mol. Cell. Neurosci.*, **28**, 770–778.
- Curcio, M. & Bradke, F. (2018) Axon Regeneration in the Central Nervous System: Facing the Challenges from the Inside. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **34**, 495–521.
- Dai, J. (2020) The growth and development of Biomedical Materials. *Biomed. Mater. Bristol Engl.*, **15**, 040201.
- Daneman, R. (2012) The blood–brain barrier in health and disease. *Ann. Neurol.*, **72**, 648–672.
- Daneman, R., Zhou, L., Agalliu, D., Cahoy, J.D., Kaushal, A., & Barres, B.A. (2010) The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS One*, **5**, e13741.
- David, S. & Kroner, A. (2011) Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci.*, **12**, 388–399.
- Davies, A.L., Hayes, K.C., & Dekaban, G.A. (2007) Clinical Correlates of Elevated Serum Concentrations of Cytokines and Autoantibodies in Patients With Spinal Cord Injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, **88**, 1384–1393.
- De Miguel, Z., Haditsch, U., Palmer, T.D., Azpiroz, A., & Sapolsky, R.M. (2019) Adult-generated neurons born during chronic social stress are uniquely adapted to respond to subsequent chronic social stress. *Mol. Psychiatry*, **24**, 1178–1188.
- de Oliveira-Souza, R. (2012) The human extrapyramidal system. *Med. Hypotheses*, **79**, 843–852.
- Deda, H., Inci, M.C., Kürekçi, A.E., Kayihan, K., Özgün, E., Ustünsoy, G.E., & Kocabay, S. (2008) Treatment of chronic spinal cord injured patients with autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell transplantation: 1-year follow-up. *Cytotherapy*, **10**, 565–574.
- DeFelipe, J., Alonso-Nanclares, L., & Arellano, J.I. (2002) Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *J. Neurocytol.*, **31**, 299–316.
- Delgado, A.C., Ferrón, S.R., Vicente, D., Porlan, E., Perez-Villalba, A., Trujillo, C.M., D’Ocón, P., & Fariñas, I. (2014) Endothelial NT-3 delivered by vasculature and CSF promotes quiescence of subependymal neural stem cells through nitric oxide induction. *Neuron*, **83**, 572–585.
- Deng, W., Aimone, J.B., & Gage, F.H. (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci.*, **11**, 339–350.
- Dennis, C., Suh, L., Rodriguez, M., Kril, J., & Sutherland, G. (2016) Human adult neurogenesis across the ages: An immunohistochemical study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **42**, 621–638.
- Dias, D.O., Kim, H., Holl, D., Werne Solnestam, B., Lundberg, J., Carlén, M., Göritz, C., & Frisén, J. (2018) Reducing Pericyte-Derived Scarring Promotes Recovery after Spinal Cord Injury. *Cell*, **173**, 153–165.e22.
- Diaz, E. & Morales, H. (2016) Spinal Cord Anatomy and Clinical Syndromes. *Semin. Ultrasound. CT MR*, **37**, 360–371.
- Dibaj, P., Nadrigny, F., Steffens, H., Scheller, A., Hirrlinger, J., Schomburg, E.D., Neusch, C., & Kirchhoff, F. (2010) NO mediates microglial response to acute spinal cord injury under ATP control in vivo. *Glia*, **58**, 1133–1144.
- Dietschy, J.M. & Turley, S.D. (2004) Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.*, **45**, 1375–1397.
- Dionísio, A., Duarte, I.C., Patrício, M., & Castelo-Branco, M. (2018) The Use of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation for Stroke Rehabilitation: A Systematic Review. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc.*, **27**, 1–31.

- Dobkin, B.H., Curt, A., & Guest, J. (2006) Cellular transplants in China: observational study from the largest human experiment in chronic spinal cord injury. *Neurorehabil. Neural Repair*, **20**, 5–13.
- Doetsch, F., García-Verdugo, J.M., & Alvarez-Buylla, A. (1997) Cellular Composition and Three-Dimensional Organization of the Subventricular Germinal Zone in the Adult Mammalian Brain. *J. Neurosci.*, **17**, 5046–5061.
- Dohgu, S., Yamauchi, A., Takata, F., Naito, M., Tsuruo, T., Higuchi, S., Sawada, Y., & Kataoka, Y. (2004) Transforming growth factor-beta1 upregulates the tight junction and P-glycoprotein of brain microvascular endothelial cells. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **24**, 491–497.
- Donati, A.R.C., Shokur, S., Morya, E., Campos, D.S.F., Moiola, R.C., Gitti, C.M., Augusto, P.B., Tripodi, S., Pires, C.G., Pereira, G.A., Brasil, F.L., Gallo, S., Lin, A.A., Takigami, A.K., Aratana, M.A., Joshi, S., Bleuler, H., Cheng, G., Rudolph, A., & Nicolelis, M.A.L. (2016) Long-Term Training with a Brain-Machine Interface-Based Gait Protocol Induces Partial Neurological Recovery in Paraplegic Patients. *Sci. Rep.*, **6**, 30383.
- Doncel-Pérez, E., Caballero-Chacón, S., & Nieto-Sampedro, M. (2009) Neurosphere cell differentiation to aldynoglia promoted by olfactory ensheathing cell conditioned medium. *Glia*, **57**, 1393–1409.
- Donnelly, D.J., Longbrake, E.E., Shawler, T.M., Kigerl, K.A., Lai, W., Tovar, C.A., Ransohoff, R.M., & Popovich, P.G. (2011) Deficient CX3CR1 Signaling Promotes Recovery after Mouse Spinal Cord Injury by Limiting the Recruitment and Activation of Ly6Clo/iNOS+ Macrophages. *J. Neurosci.*, **31**, 9910–9922.
- Doucette, R. (1990) Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia*, **3**, 433–449.
- Drew, L.J., Kheirbek, M.A., Luna, V.M., Denny, C.A., Clويدt, M.A., Wu, M.V., Jain, S., Scharfman, H.E., & Hen, R. (2016) Activation of local inhibitory circuits in the dentate gyrus by adult-born neurons. *Hippocampus*, **26**, 763–778.
- Dufor, T., Grehl, S., Tang, A.D., Doulazmi, M., Traoré, M., Debray, N., Dubacq, C., Deng, Z.-D., Mariani, J., Lohof, A.M., & Sherrard, R.M. (2019) Neural circuit repair by low-intensity magnetic stimulation requires cellular magnetoreceptors and specific stimulation patterns. *Sci. Adv.*, **5**, eaav9847.
- Dulin, J.N., Karoly, E.D., Wang, Y., Strobel, H.W., & Grill, R.J. (2013) Licofelone modulates neuroinflammation and attenuates mechanical hypersensitivity in the chronic phase of spinal cord injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, **33**, 652–664.
- Duncan, I.D., Aguayo, A.J., Bunge, R.P., & Wood, P.M. (1981) Transplantation of rat Schwann cells grown in tissue culture into the mouse spinal cord. *J. Neurol. Sci.*, **49**, 241–252.
- Durafourt, B.A., Moore, C.S., Zammit, D.A., Johnson, T.A., Zaguia, F., Guiot, M.-C., Bar-Or, A., & Antel, J.P. (2012) Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia*, **60**, 717–727.
- Edgar, J.M. & Garbern, J. (2004) The myelinated axon is dependent on the myelinating cell for support and maintenance: molecules involved. *J. Neurosci. Res.*, **76**, 593–598.
- Edgar, J.M. & Nave, K.-A. (2009) The role of CNS glia in preserving axon function. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **19**, 498–504.
- Elmariah, S.B., Oh, E.J., Hughes, E.G., & Balice-Gordon, R.J. (2005) Astrocytes Regulate Inhibitory Synapse Formation via Trk-Mediated Modulation of Postsynaptic GABAA Receptors. *J. Neurosci.*, **25**, 3638–3650.
- Endo, T., Tominaga, T., & Olson, L. (2009) Cortical changes following spinal cord injury with emphasis on the Nogo signaling system. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry*, **15**, 291–299.

- Engelhardt, B. (2008) Immune cell entry into the central nervous system: Involvement of adhesion molecules and chemokines. *J. Neurol. Sci.*, **274**, 23–26.
- Erez, H., Malkinson, G., Prager-Khoutorsky, M., De Zeeuw, C.I., Hoogenraad, C.C., & Spira, M.E. (2007) Formation of microtubule-based traps controls the sorting and concentration of vesicles to restricted sites of regenerating neurons after axotomy. *J. Cell Biol.*, **176**, 497–507.
- Espósito, M.S., Piatti, V.C., Laplagne, D.A., Morgenstern, N.A., Ferrari, C.C., Pitossi, F.J., & Schinder, A.F. (2005) Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, **25**, 10074–10086.
- Ethier, C., Oby, E.R., Bauman, M.J., & Miller, L.E. (2012) Restoration of grasp following paralysis through brain-controlled stimulation of muscles. *Nature*, **485**, 368–371.
- Farkas, G.J. & Gater, D.R. (2018) Neurogenic obesity and systemic inflammation following spinal cord injury: A review. *J. Spinal Cord Med.*, **41**, 378–387.
- Fehlings, M.G., Kim, K.D., Aarabi, B., Rizzo, M., Bond, L.M., McKerracher, L., Vaccaro, A.R., & Okonkwo, D.O. (2018) Rho Inhibitor VX-210 in Acute Traumatic Subaxial Cervical Spinal Cord Injury: Design of the SPinal Cord Injury Rho INhibition InvestiGation (SPRING) Clinical Trial. *J. Neurotrauma*, **35**, 1049–1056.
- Fehlings, M.G., Nakashima, H., Nagoshi, N., Chow, D.S.L., Grossman, R.G., & Kopjar, B. (2016) Rationale, design and critical end points for the Riluzole in Acute Spinal Cord Injury Study (RISCIS): a randomized, double-blinded, placebo-controlled parallel multi-center trial. *Spinal Cord*, **54**, 8–15.
- Fehlings, M.G., Vaccaro, A., Wilson, J.R., Singh, A., W Cadotte, D., Harrop, J.S., Aarabi, B., Shaffrey, C., Dvorak, M., Fisher, C., Arnold, P., Massicotte, E.M., Lewis, S., & Rampersaud, R. (2012) Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury: results of the Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study (STASCIS). *PloS One*, **7**, e32037.
- Felderhoff-Mueser, U., Schmidt, O.I., Oberholzer, A., Bührer, C., & Stahel, P.F. (2005) IL-18: a key player in neuroinflammation and neurodegeneration? *Trends Neurosci.*, **28**, 487–493.
- Felix, M.-S., Popa, N., Djelloul, M., Boucraut, J., Gauthier, P., Bauer, S., & Matarazzo, V.A. (2012) Alteration of forebrain neurogenesis after cervical spinal cord injury in the adult rat. *Front. Neurosci.*, **6**, 45.
- Féron, F., Perry, C., Cochrane, J., Licina, P., Nowitzke, A., Urquhart, S., Geraghty, T., & Mackay-Sim, A. (2005) Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. *Brain*, **128**, 2951–2960.
- Festoff, B.W., Ameenuddin, S., Arnold, P.M., Wong, A., Santacruz, K.S., & Citron, B.A. (2006) Minocycline neuroprotects, reduces microgliosis, and inhibits caspase protease expression early after spinal cord injury. *J. Neurochem.*, **97**, 1314–1326.
- Fiani, B., Kondilis, A., Soula, M., Tao, A., & Alvi, M.A. (2021) Novel Methods of Necroptosis Inhibition for Spinal Cord Injury Using Translational Research to Limit Secondary Injury and Enhance Endogenous Repair and Regeneration. *Neurospine*, **18**, 261–270.
- Fidelin, K., Djenoune, L., Stokes, C., Prendergast, A., Gomez, J., Baradel, A., Del Bene, F., & Wyart, C. (2015) State-Dependent Modulation of Locomotion by GABAergic Spinal Sensory Neurons. *Curr. Biol. CB*, **25**, 3035–3047.
- Filardy, A.A., Pires, D.R., Nunes, M.P., Takiya, C.M., Freire-de-Lima, C.G., Ribeiro-Gomes, F.L., & DosReis, G.A. (2010) Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, **185**, 2044–2050.
- Fiorelli, R., Cebrian-Silla, A., Garcia-Verdugo, J.-M., & Raineteau, O. (2013) The adult spinal cord harbors a population of GFAP-positive progenitors with limited self-renewal potential. *Glia*, **61**, 2100–2113.

- Fleming, J.C., Norenberg, M.D., Ramsay, D.A., Dekaban, G.A., Marcillo, A.E., Saenz, A.D., Pasquale-Styles, M., Dietrich, W.D., & Weaver, L.C. (2006) The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain J. Neurol.*, **129**, 3249–3269.
- Fonseca, M.I., Chu, S.-H., Hernandez, M.X., Fang, M.J., Modarresi, L., Selvan, P., MacGregor, G.R., & Tenner, A.J. (2017) Cell-specific deletion of C1qa identifies microglia as the dominant source of C1q in mouse brain. *J. Neuroinflammation*, **14**, 48.
- Foo, L.C., Allen, N.J., Bushong, E.A., Ventura, P.B., Chung, W.-S., Zhou, L., Cahoy, J.D., Daneman, R., Zong, H., Ellisman, M.H., & Barres, B.A. (2011) Development of a Novel Method for the Purification and Culture of Rodent Astrocytes. *Neuron*, **71**, 799–811.
- Ford, J.W. & McVicar, D.W. (2009) TREM and TREM-like Receptors in Inflammation and Disease. *Curr. Opin. Immunol.*, **21**, 38–46.
- Forgione, N. & Fehlings, M.G. (2014) Rho-ROCK inhibition in the treatment of spinal cord injury. *World Neurosurg.*, **82**, e535-539.
- Forni, P.E., Taylor-Burds, C., Melvin, V.S., Williams, T., & Wray, S. (2011) Neural Crest and Ectodermal Cells Intermix in the Nasal Placode to Give Rise to GnRH-1 Neurons, Sensory Neurons, and Olfactory Ensheathing Cells. *J. Neurosci.*, **31**, 6915–6927.
- Fouad, K., Schnell, L., Bunge, M.B., Schwab, M.E., Liebscher, T., & Pearse, D.D. (2005) Combining Schwann Cell Bridges and Olfactory-Ensheathing Glia Grafts with Chondroitinase Promotes Locomotor Recovery after Complete Transection of the Spinal Cord. *J. Neurosci.*, **25**, 1169–1178.
- Frade, J.M. & Barde, Y.-A. (1998) Microglia-Derived Nerve Growth Factor Causes Cell Death in the Developing Retina. *Neuron*, **20**, 35–41.
- Freeman, M.R. (2015) Drosophila Central Nervous System Glia. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **7**.
- Frisén, J., Johansson, C.B., Török, C., Risling, M., & Lendahl, U. (1995) Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J. Cell Biol.*, **131**, 453–464.
- Fu, H., Zhao, Y., Hu, D., Wang, S., Yu, T., & Zhang, L. (2020) Depletion of microglia exacerbates injury and impairs function recovery after spinal cord injury in mice. *Cell Death Dis.*, **11**, 528.
- Furuse, M. (2010) Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a002907.
- García-Cáceres, C., Baland, E., Prevot, V., Luquet, S., Woods, S.C., Koch, M., Horvath, T.L., Yi, C.-X., Chowen, J.A., Verkhratsky, A., Araque, A., Bechmann, I., & Tschöp, M.H. (2019) Role of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism. *Nat. Neurosci.*, **22**, 7–14.
- García-Verdugo, J.M., Doetsch, F., Wichterle, H., Lim, D.A., & Alvarez-Buylla, A. (1998) Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J. Neurobiol.*, **36**, 234–248.
- Garton, K.J., Gough, P.J., Blobel, C.P., Murphy, G., Greaves, D.R., Dempsey, P.J., & Raines, E.W. (2001) Tumor Necrosis Factor- α -converting Enzyme (ADAM17) Mediates the Cleavage and Shedding of Fractalkine (CX3CL1) *. *J. Biol. Chem.*, **276**, 37993–38001.
- Gault, N. & Szele, F.G. (2021) Immunohistochemical evidence for adult human neurogenesis in health and disease. *WIREs Mech. Dis.*, **13**, e1526.
- Ge, S., Goh, E.L.K., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G., & Song, H. (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, **439**, 589–593.
- Gensel, J.C. & Zhang, B. (2015) Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res.*, **1619**, 1–11.

- Gerasimenko, Y.P., Avelev, V.D., Nikitin, O.A., & Lavrov, I.A. (2003) Initiation of locomotor activity in spinal cats by epidural stimulation of the spinal cord. *Neurosci. Behav. Physiol.*, **33**, 247–254.
- Gerasimenko, Y.P., Lu, D.C., Modaber, M., Zdunowski, S., Gad, P., Sayenko, D.G., Morikawa, E., Haakana, P., Ferguson, A.R., Roy, R.R., & Edgerton, V.R. (2015) Noninvasive Reactivation of Motor Descending Control after Paralysis. *J. Neurotrauma*, **32**, 1968–1980.
- Gerasimenko, Y.P., Makarovskii, A.N., & Nikitin, O.A. (2002) Control of locomotor activity in humans and animals in the absence of supraspinal influences. *Neurosci. Behav. Physiol.*, **32**, 417–423.
- Giaume, C. (2010) Astroglial Wiring is Adding Complexity to Neuroglial Networking. *Front. Neuroenergetics*, **2**, 129.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., Samokhvalov, I.M., & Merad, M. (2010) Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science*, **330**, 841–845.
- Givogri, M.I., de Planell, M., Galbiati, F., Superchi, D., Gritti, A., Vescovi, A., de Vellis, J., & Bongarzone, E.R. (2006) Notch signaling in astrocytes and neuroblasts of the adult subventricular zone in health and after cortical injury. *Dev. Neurosci.*, **28**, 81–91.
- Golestani, A., Shobeiri, P., Sadeghi-Naini, M., Jazayeri, S.B., Maroufi, S.F., Ghodsi, Z., Ohadi, M.A.D., Mohammadi, E., Rahimi-Movaghar, V., & Ghodsi, S.M. (2022) Epidemiology of Traumatic Spinal Cord Injury in Developing Countries from 2009 to 2020: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology*, **56**, 219–239.
- Golia, M.T., Poggini, S., Alboni, S., Garofalo, S., Ciano Albanese, N., Viglione, A., Ajmone-Cat, M.A., St-Pierre, A., Brunello, N., Limatola, C., Branchi, I., & Maggi, L. (2019) Interplay between inflammation and neural plasticity: Both immune activation and suppression impair LTP and BDNF expression. *Brain. Behav. Immun.*, **81**, 484–494.
- Gómez, R.M., Sánchez, M.Y., Portela-Lomba, M., Ghotme, K., Barreto, G.E., Sierra, J., & Moreno-Flores, M.T. (2018) Cell therapy for spinal cord injury with olfactory ensheathing glia cells (OECs). *Glia*, **66**, 1267–1301.
- Goodus, M.T. & McTigue, D.M. (2020) Hepatic dysfunction after spinal cord injury: A vicious cycle of central and peripheral pathology? *Exp. Neurol.*, **325**, 113160.
- Goodus, M.T., Sauerbeck, A.D., Popovich, P.G., Bruno, R.S., & McTigue, D.M. (2018) Dietary Green Tea Extract Prior to Spinal Cord Injury Prevents Hepatic Iron Overload but Does Not Improve Chronic Hepatic and Spinal Cord Pathology in Rats. *J. Neurotrauma*, **35**, 2872–2882.
- Göriz, C., Dias, D.O., Tomilin, N., Barbacid, M., Shupliakov, O., & Frisén, J. (2011) A Pericyte Origin of Spinal Cord Scar Tissue. *Science*, **333**, 238–242.
- Goritz, C., Mauch, D.H., & Pfrieger, F.W. (2005) Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol. Cell. Neurosci.*, **29**, 190–201.
- Gravel, M., Peterson, J., Yong, V.W., Kottis, V., Trapp, B., & Braun, P.E. (1996) Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination. *Mol. Cell. Neurosci.*, **7**, 453–466.
- Graziadei, P.P. & Graziadei, G.A. (1979) Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J. Neurocytol.*, **8**, 1–18.
- Gregg, L. & Gailloud, P. (2021) Neurovascular anatomy: Spine. *Handb. Clin. Neurol.*, **176**, 33–47.
- Grégoire, C.-A., Goldenstein, B.L., Floriddia, E.M., Barnabé-Heider, F., & Fernandes, K.J.L. (2015) Endogenous neural stem cell responses to stroke and spinal cord injury. *Glia*, **63**, 1469–1482.

- Greter, M. & Merad, M. (2013) Regulation of microglia development and homeostasis. *Glia*, **61**, 121–127.
- Griffin, L., Decker, M.J., Hwang, J.Y., Wang, B., Kitchen, K., Ding, Z., & Ivy, J.L. (2009) Functional electrical stimulation cycling improves body composition, metabolic and neural factors in persons with spinal cord injury. *J. Electromyogr. Kinesiol.*, **19**, 614–622.
- Grillner, S. & Zangger, P. (1979) On the central generation of locomotion in the low spinal cat. *Exp. Brain Res.*, **34**, 241–261.
- Gris, D., Hamilton, E.F., & Weaver, L.C. (2008) The systemic inflammatory response after spinal cord injury damages lungs and kidneys. *Exp. Neurol.*, **211**, 259–270.
- Grossman, R.G., Fehlings, M.G., Frankowski, R.F., Burau, K.D., Chow, D.S.L., Tator, C., Teng, A., Toups, E.G., Harrop, J.S., Aarabi, B., Shaffrey, C.I., Johnson, M.M., Harkema, S.J., Boakye, M., Guest, J.D., & Wilson, J.R. (2014) A prospective, multicenter, phase I matched-comparison group trial of safety, pharmacokinetics, and preliminary efficacy of riluzole in patients with traumatic spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, **31**, 239–255.
- Grycz, K., Głowacka, A., Ji, B., Krzywdzińska, K., Charzyńska, A., Czarkowska-Bauch, J., Gajewska-Woźniak, O., & Skup, M. (2022) Regulation of perineuronal net components in the synaptic bouton vicinity on lumbar α -motoneurons in the rat after spinalization and locomotor training: New insights from spatio-temporal changes in gene, protein expression and WFA labeling. *Exp. Neurol.*, **354**, 114098.
- Guérout, N., Derambure, C., Drouot, L., Bon-Mardion, N., Duclos, C., Boyer, O., & Marie, J.-P. (2010) Comparative gene expression profiling of olfactory ensheathing cells from olfactory bulb and olfactory mucosa. *Glia*, **58**, 1570–1580.
- Gueye, Y., Ferhat, L., Sbai, O., Bianco, J., Ould-Yahoui, A., Bernard, A., Charrat, E., Chauvin, J.-P., Risso, J.-J., Féron, F., Rivera, S., & Khrestchatisky, M. (2011) Trafficking and secretion of matrix metalloproteinase-2 in olfactory ensheathing glial cells: A role in cell migration? *Glia*, **59**, 750–770.
- Gupta, D. & Morley, J.E. (2014) Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and aging. *Compr. Physiol.*, **4**, 1495–1510.
- Gutierrez, E.G., Banks, W.A., & Kastin, A.J. (1994) Blood-borne interleukin-1 receptor antagonist crosses the blood-brain barrier. *J. Neuroimmunol.*, **55**, 153–160.
- Ha, S.N., Hochman, J., & Sheridan, R.P. (2007) Mini review on molecular modeling of P-glycoprotein (Pgp). *Curr. Top. Med. Chem.*, **7**, 1525–1529.
- Haggerty, A.E., Maldonado-Lasunción, I., Nitobe, Y., Yamane, K., Marlow, M.M., You, H., Zhang, C., Cho, B., Li, X., Reddy, S., Mao, H.-Q., & Oudega, M. (2022) The Effects of the Combination of Mesenchymal Stromal Cells and Nanofiber-Hydrogel Composite on Repair of the Contused Spinal Cord. *Cells*, **11**, 1137.
- Haim, L.B. & Rowitch, D.H. (2017) Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat. Rev. Neurosci.*, **18**, 31–41.
- Hall, P.A. & Watt, F.M. (1989) Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Dev. Camb. Engl.*, **106**, 619–633.
- Hamilton, L.K., Truong, M.K.V., Bednarczyk, M.R., Aumont, A., & Fernandes, K.J.L. (2009) Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord. *Neuroscience*, **164**, 1044–1056.
- Hao, D.-J., Liu, C., Zhang, L., Chen, B., Zhang, Q., Zhang, R., An, J., Zhao, J., Wu, M., Wang, Y., Simental, A., He, B., & Yang, H. (2017) Lipopolysaccharide and Curcumin Co-Stimulation Potentiates Olfactory Ensheathing Cell Phagocytosis Via Enhancing Their Activation. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.*, **14**, 502–518.

- Hao, J., Li, B., Duan, H., Zhao, C., Zhang, Y., Sun, C., Pan, B., Liu, C., Kong, X., Yao, X., & Feng, S. (2017) Mechanisms underlying the promotion of functional recovery by deferoxamine after spinal cord injury in rats. *Neural Regen. Res.*, **12**, 959–968.
- Harkema, S., Gerasimenko, Y., Hodes, J., Burdick, J., Angeli, C., Chen, Y., Ferreira, C., Willhite, A., Rejc, E., Grossman, R.G., & Edgerton, V.R. (2011) Effect of epidural stimulation of the lumbosacral spinal cord on voluntary movement, standing, and assisted stepping after motor complete paraplegia: a case study. *Lancet Lond. Engl.*, **377**, 1938–1947.
- Hashimoto, M., Nitta, A., Fukumitsu, H., Nomoto, H., Shen, L., & Furukawa, S. (2005) Inflammation-induced GDNF improves locomotor function after spinal cord injury. *Neuroreport*, **16**, 99–102.
- Hatami, M., Mehrjardi, N.Z., Kiani, S., Hemmesi, K., Azizi, H., Shahverdi, A., & Baharvand, H. (2009) Human embryonic stem cell-derived neural precursor transplants in collagen scaffolds promote recovery in injured rat spinal cord. *Cytotherapy*, **11**, 618–630.
- Hawryluk, G.W.J., Spano, S., Chew, D., Wang, S., Erwin, M., Chamankhah, M., Forgione, N., & Fehlings, M.G. (2014) An examination of the mechanisms by which neural precursors augment recovery following spinal cord injury: a key role for remyelination. *Cell Transplant.*, **23**, 365–380.
- He, Y., Yao, X., Taylor, N., Bai, Y., Lovenberg, T., & Bhattacharya, A. (2018) RNA sequencing analysis reveals quiescent microglia isolation methods from postnatal mouse brains and limitations of BV2 cells. *J. Neuroinflammation*, **15**, 153.
- Hellwig, S., Brioschi, S., Dieni, S., Frings, L., Masuch, A., Blank, T., & Biber, K. (2016) Altered microglia morphology and higher resilience to stress-induced depression-like behavior in CX3CR1-deficient mice. *Brain. Behav. Immun.*, **55**, 126–137.
- Hendricks, W.A., Pak, E.S., Owensby, J.P., Menta, K.J., Glazova, M., Moretto, J., Hollis, S., Brewer, K.L., & Murashov, A.K. (2006) Predifferentiated Embryonic Stem Cells Prevent Chronic Pain Behaviors and Restore Sensory Function Following Spinal Cord Injury in Mice. *Mol. Med.*, **12**, 34–46.
- Henke, A.M., Billington, Z.J., & Gater, D.R. (2022) Autonomic Dysfunction and Management after Spinal Cord Injury: A Narrative Review. *J. Pers. Med.*, **12**, 1110.
- Hitti, F.L. & Siegelbaum, S.A. (2014) The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature*, **508**, 88–92.
- Hofstetter, C.P., Holmström, N.A.V., Lilja, J.A., Schweinhardt, P., Hao, J., Spenger, C., Wiesenfeld-Hallin, Z., Kurpad, S.N., Frisén, J., & Olson, L. (2005) Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat. Neurosci.*, **8**, 346–353.
- Honoré, A., Le corre, S., Derambure, C., Normand, R., Duclos, C., Boyer, O., Marie, J.-P., & Guérout, N. (2012) Isolation, characterization, and genetic profiling of subpopulations of olfactory ensheathing cells from the olfactory bulb. *Glia*, **60**, 404–413.
- Horner, P.J., Power, A.E., Kempermann, G., Kuhn, H.G., Palmer, T.D., Winkler, J., Thal, L.J., & Gage, F.H. (2000) Proliferation and Differentiation of Progenitor Cells Throughout the Intact Adult Rat Spinal Cord. *J. Neurosci.*, **20**, 2218–2228.
- Hsieh, C.L., Koike, M., Spusta, S., Niemi, E., Yenari, M., Nakamura, M.C., & Seaman, W.E. (2009) A Role for TREM2 Ligands in the Phagocytosis of Apoptotic Neuronal Cells by Microglia. *J. Neurochem.*, **109**, 1144–1156.
- Hsieh, J., Aimone, J.B., Kaspar, B.K., Kuwabara, T., Nakashima, K., & Gage, F.H. (2004) IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. *J. Cell Biol.*, **164**, 111–122.

- Hu, H.-H., Chen, D.-Q., Wang, Y.-N., Feng, Y.-L., Cao, G., Vaziri, N.D., & Zhao, Y.-Y. (2018) New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis. *Chem. Biol. Interact.*, **292**, 76–83.
- Huang, A.L., Chen, X., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Guo, W., Tränkner, D., Ryba, N.J.P., & Zuker, C.S. (2006) The Cells and Logic for Mammalian Sour Taste detection. *Nature*, **442**, 934–938.
- Huang, J., Upadhyay, U.M., & Tamargo, R.J. (2006) Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg. Neurol.*, **66**, 232–245.
- Huang, L., Sun, X., Wang, L., Pei, G., Wang, Y., Zhang, Q., Liang, Z., Wang, D., Fu, C., He, C., & Wei, Q. (2022) Enhanced effect of combining bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) and pulsed electromagnetic fields (PEMF) to promote recovery after spinal cord injury in mice. *MedComm*, **3**, e160.
- Huang, X., Liu, J., Ketova, T., Fleming, J.T., Grover, V.K., Cooper, M.K., Litingtung, Y., & Chiang, C. (2010) Transventricular delivery of Sonic hedgehog is essential to cerebellar ventricular zone development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 8422–8427.
- Huffman, J., Phillips, S., Taylor, G.T., & Paul, R. (2016) The Emerging Field of Perivascular Flow Dynamics: Biological Relevance. *Natl. Acad. Invent.*, **18**, 63–74.
- Hughes, E.G., Elmariah, S.B., & Balice-Gordon, R.J. (2010) Astrocyte secreted proteins selectively increase hippocampal GABAergic axon length, branching, and synaptogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.*, **43**, 136.
- Hugnot, J.-P. (2012) *The Spinal Cord Neural Stem Cell Niche*. IntechOpen.
- Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T.A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., Kallen, K.-J., Rose-John, S., & Ludwig, A. (2003) The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood*, **102**, 1186–1195.
- Hwang, I., Hahm, S.-C., Choi, K.-A., Park, S.-H., Jeong, H., Yea, J.-H., Kim, J., & Hong, S. (2016) Intrathecal Transplantation of Embryonic Stem Cell-Derived Spinal GABAergic Neural Precursor Cells Attenuates Neuropathic Pain in a Spinal Cord Injury Rat Model. *Cell Transplant.*, **25**, 593–607.
- Iliff, J.J. & Nedergaard, M. (2013) Is There a Cerebral Lymphatic System? *Stroke*, **44**, S93–S95.
- Irvine, S.F. & Kwok, J.C.F. (2018) Perineuronal Nets in Spinal Motoneurons: Chondroitin Sulphate Proteoglycan around Alpha Motoneurons. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 1172.
- Ishii, H., Tanabe, S., Ueno, M., Kubo, T., Kayama, H., Serada, S., Fujimoto, M., Takeda, K., Naka, T., & Yamashita, T. (2013) $\text{ifn-}\gamma$ -dependent secretion of IL-10 from Th1 cells and microglia/macrophages contributes to functional recovery after spinal cord injury. *Cell Death Dis.*, **4**, e710.
- Iwahara, T., Atsuta, Y., Garcia-Rill, E., & Skinner, R.D. (1992) Spinal cord stimulation-induced locomotion in the adult cat. *Brain Res. Bull.*, **28**, 99–105.
- Iwai, H., Shimada, H., Nishimura, S., Kobayashi, Y., Itakura, G., Hori, K., Hikishima, K., Ebise, H., Negishi, N., Shibata, S., Habu, S., Toyama, Y., Nakamura, M., & Okano, H. (2015) Allogeneic Neural Stem/Progenitor Cells Derived From Embryonic Stem Cells Promote Functional Recovery After Transplantation Into Injured Spinal Cord of Nonhuman Primates. *Stem Cells Transl. Med.*, **4**, 708–719.
- Jackman, N., Ishii, A., & Bansal, R. (2009) Oligodendrocyte development and myelin biogenesis: parsing out the roles of glycosphingolipids. *Physiol. Bethesda Md*, **24**, 290–297.
- Jeffries, M.A. & Tom, V.J. (2021) Peripheral Immune Dysfunction: A Problem of Central Importance after Spinal Cord Injury. *Biology*, **10**, 928.

- Jessen, N.A., Munk, A.S.F., Lundgaard, I., & Nedergaard, M. (2015) The Glymphatic System – A Beginner’s Guide. *Neurochem. Res.*, **40**, 2583–2599.
- Jiang, C., Wang, X., Jiang, Y., Chen, Z., Zhang, Y., Hao, D., & Yang, H. (2022) The Anti-inflammation Property of Olfactory Ensheathing Cells in Neural Regeneration After Spinal Cord Injury. *Mol. Neurobiol.*, **59**, 6447–6459.
- Jiang, Y., Guo, J., Tang, X., Wang, X., Hao, D., & Yang, H. (2022) The Immunological Roles of Olfactory Ensheathing Cells in the Treatment of Spinal Cord Injury. *Front. Immunol.*, **13**, 881162.
- Jiménez, A.J., Domínguez-Pinos, M.-D., Guerra, M.M., Fernández-Llebrez, P., & Pérez-Figares, J.-M. (2014) Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers*, **2**, e28426.
- Jones, E.V., Bernardinelli, Y., Tse, Y.C., Chierzi, S., Wong, T.P., & Murai, K.K. (2011) Astrocytes Control Glutamate Receptor Levels at Developing Synapses through SPARC- β -Integrin Interactions. *J. Neurosci.*, **31**, 4154–4165.
- Jones, T.B., Hart, R.P., & Popovich, P.G. (2005) Molecular Control of Physiological and Pathological T-Cell Recruitment after Mouse Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.*, **25**, 6576–6583.
- Kakulas, B.A. (1999) The applied neuropathology of human spinal cord injury. *Spinal Cord*, **37**, 79–88.
- Kamiya, K., Koda, M., Furuya, T., Kato, K., Takahashi, H., Sakuma, T., Inada, T., Ota, M., Maki, S., Okawa, A., Ito, Y., Takahashi, K., & Yamazaki, M. (2015) Neuroprotective therapy with granulocyte colony-stimulating factor in acute spinal cord injury: a comparison with high-dose methylprednisolone as a historical control. *Eur. Spine J. Off. Publ. Eur. Spine Soc. Eur. Spinal Deform. Soc. Eur. Sect. Cerv. Spine Res. Soc.*, **24**, 963–967.
- Kanno, H., Pressman, Y., Moody, A., Berg, R., Muir, E.M., Rogers, J.H., Ozawa, H., Itoi, E., Pearse, D.D., & Bunge, M.B. (2014) Combination of Engineered Schwann Cell Grafts to Secrete Neurotrophin and Chondroitinase Promotes Axonal Regeneration and Locomotion after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.*, **34**, 1838–1855.
- Karimi-Abdolrezaee, S., Eftekharpour, E., Wang, J., Schut, D., & Fehlings, M.G. (2010) Synergistic Effects of Transplanted Adult Neural Stem/Progenitor Cells, Chondroitinase, and Growth Factors Promote Functional Repair and Plasticity of the Chronically Injured Spinal Cord. *J. Neurosci.*, **30**, 1657–1676.
- Kastin, A.J., Akerstrom, V., & Pan, W. (2003) Circulating TGF- β 1 does not cross the intact blood-brain barrier. *J. Mol. Neurosci.*, **21**, 43–48.
- Kawasaki, Y., Xu, Z.-Z., Wang, X., Park, J.-Y., Zhuang, Z.-Y., Tan, P.-H., Gao, Y.-J., Roy, K., Corfas, G., Lo, E.H., & Ji, R.-R. (2008) Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. *Nat. Med.*, **14**, 331–336.
- Keirstead, H.S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu, M., Cloutier, F., Sharp, K., & Steward, O. (2005) Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cell Transplants Remyelinate and Restore Locomotion after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.*, **25**, 4694–4705.
- Kemp, W.J., Tubbs, R.S., & Cohen-Gadol, A.A. (2012) The innervation of the cranial dura mater: neurosurgical case correlates and a review of the literature. *World Neurosurg.*, **78**, 505–510.
- Khankan, R.R., Griffis, K.G., Haggerty-Skeans, J.R., Zhong, H., Roy, R.R., Edgerton, V.R., & 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.
- Khankan, R.R., Wanner, I.B., & Phelps, P.E. (2015) Olfactory ensheathing cell-neurite alignment enhances neurite outgrowth in scar-like cultures. *Exp. Neurol.*, **269**, 93–101.

- Kheirbek, M.A., Drew, L.J., Burghardt, N.S., Costantini, D.O., Tannenholz, L., Ahmari, S.E., Zeng, H., Fenton, A.A., & Hen, R. (2013) Differential control of learning and anxiety along the dorso-ventral axis of the dentate gyrus. *Neuron*, **77**, 955–968.
- Kim, R.Y., Hoffman, A.S., Itoh, N., Ao, Y., Spence, R., Sofroniew, M.V., & Voskuhl, R.R. (2014) Astrocyte CCL2 sustains immune cell infiltration in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.*, **274**, 53–61.
- Kim, Y.S. & Joh, T.H. (2006) Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp. Mol. Med.*, **38**, 333–347.
- Kipnis, J., Cohen, H., Cardon, M., Ziv, Y., & Schwartz, M. (2004) T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 8180–8185.
- Kishk, N.A., Gabr, H., Hamdy, S., Afifi, L., Abokresha, N., Mahmoud, H., Wafaie, A., & Bilal, D. (2010) Case control series of intrathecal autologous bone marrow mesenchymal stem cell therapy for chronic spinal cord injury. *Neurorehabil. Neural Repair*, **24**, 702–708.
- Korin, B., Ben-Shaan, T.L., Schiller, M., Dubovik, T., Azulay-Debby, H., Boshnak, N.T., Koren, T., & Rolls, A. (2017) High-dimensional, single-cell characterization of the brain's immune compartment. *Nat. Neurosci.*, **20**, 1300–1309.
- Korzh, V. (2018) Development of brain ventricular system. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, **75**, 375–383.
- Kraus, B.J., Robinson, R.J., White, J.A., Eichenbaum, H., & Hasselmo, M.E. (2013) Hippocampal “time cells”: time versus path integration. *Neuron*, **78**, 1090–1101.
- Kroner, A., Greenhalgh, A.D., Zarruk, J.G., Passos Dos Santos, R., Gaestel, M., & David, S. (2014) TNF and increased intracellular iron alter macrophage polarization to a detrimental M1 phenotype in the injured spinal cord. *Neuron*, **83**, 1098–1116.
- Kucher, K., Johns, D., Maier, D., Abel, R., Badke, A., Baron, H., Thietje, R., Casha, S., Meindl, R., Gomez-Mancilla, B., Pfister, C., Rupp, R., Weidner, N., Mir, A., Schwab, M.E., & Curt, A. (2018) First-in-Man Intrathecal Application of Neurite Growth-Promoting Anti-Nogo-A Antibodies in Acute Spinal Cord Injury. *Neurorehabil. Neural Repair*, **32**, 578–589.
- Kucukdereli, H., Allen, N.J., Lee, A.T., Feng, A., Ozlu, M.I., Conatser, L.M., Chakraborty, C., Workman, G., Weaver, M., Sage, E.H., Barres, B.A., & Eroglu, C. (2011) Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, E440–E449.
- Kunzelmann, P., Schröder, W., Traub, O., Steinhäuser, C., Dermietzel, R., & Willecke, K. (1999) Late onset and increasing expression of the gap junction protein connexin30 in adult murine brain and long-term cultured astrocytes. *Glia*, **25**, 111–119.
- Kuppuswamy, A., Balasubramaniam, A.V., Maksimovic, R., Mathias, C.J., Gall, A., Craggs, M.D., & Ellaway, P.H. (2011) Action of 5 Hz repetitive transcranial magnetic stimulation on sensory, motor and autonomic function in human spinal cord injury. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.*, **122**, 2452–2461.
- Lan, Y.-X., Yang, P., Zeng, Z., Yadav, N., Zhang, L.-J., Wang, L.-B., & Xia, H.-C. (2021) Gene and protein expression profiles of olfactory ensheathing cells from olfactory bulb versus olfactory mucosa. *Neural Regen. Res.*, **17**, 440–449.
- Langman, J. & Sadler, D.W. (2008) Atlas d'embryologie médicale de Langman. In Pradel. edn. Wolters Kluwer France.
- Laursen, L.S., Chan, C.W., & Ffrench-Constant, C. (2011) Translation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes is regulated by integrin activation and hnRNP-K. *J. Cell Biol.*, **192**, 797–811.

- Lee, J., Hamanaka, G., Lo, E.H., & Arai, K. (2019) Heterogeneity of microglia and their differential roles in white matter pathology. *CNS Neurosci. Ther.*, **25**, 1290–1298.
- Lee, S., Chen, T.T., Barber, C.L., Jordan, M.C., Murdock, J., Desai, S., Ferrara, N., Nagy, A., Roos, K.P., & Iruela-Arispe, M.L. (2007) Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell*, **130**, 691–703.
- Lee, S.-W., Kim, W.J., Choi, Y.K., Song, H.S., Son, M.J., Gelman, I.H., Kim, Y.-J., & Kim, K.-W. (2003) SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat. Med.*, **9**, 900–906.
- Lehrman, E.K., Wilton, D.K., Litvina, E.Y., Welsh, C.A., Chang, S.T., Frouin, A., Walker, A.J., Heller, M.D., Umemori, H., Chen, C., & Stevens, B. (2018) CD47 protects synapses from excess microglia-mediated pruning during development. *Neuron*, **100**, 120–134.e6.
- Lehtinen, M.K. & Walsh, C.A. (2011) Neurogenesis at the Brain–Cerebrospinal Fluid Interface. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **27**, 653–679.
- Lehtinen, M.K., Zappaterra, M.W., Chen, X., Yang, Y.J., Hill, A., Lun, M., Maynard, T., Gonzalez, D., Kim, S., Ye, P., D’Ercole, A.J., Wong, E.T., LaMantia, A.S., & Walsh, C.A. (2011) The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron*, **69**, 893–905.
- Lemarchant, S., Pomeschchik, Y., Kidin, I., Kärkkäinen, V., Valonen, P., Lehtonen, S., Goldsteins, G., Malm, T., Kanninen, K., & Koistinaho, J. (2016) ADAMTS-4 promotes neurodegeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurodegener.*, **11**, 10.
- Lenz, A., Franklin, G.A., & Cheadle, W.G. (2007) Systemic inflammation after trauma. *Injury*, **38**, 1336–1345.
- Leutgeb, J.K., Leutgeb, S., Moser, M.-B., & Moser, E.I. (2007) Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science*, **315**, 961–966.
- Li, B.C., Xu, C., Zhang, J.Y., Li, Y., & Duan, Z.X. (2012) Differing Schwann Cells and Olfactory Ensheathing Cells Behaviors, from Interacting with Astrocyte, Produce Similar Improvements in Contused Rat Spinal Cord’s Motor Function. *J. Mol. Neurosci.*, **48**, 35–44.
- Li, H., Xue, X., Li, L., Li, Y., Wang, Y., Huang, T., Wang, Y., Meng, H., Pan, B., & Niu, Q. (2020) Aluminum-Induced Synaptic Plasticity Impairment via PI3K-Akt-mTOR Signaling Pathway. *Neurotox. Res.*, **37**, 996–1008.
- Li, J.-Y., Christophersen, N.S., Hall, V., Soulet, D., & Brundin, P. (2008) Critical issues of clinical human embryonic stem cell therapy for brain repair. *Trends Neurosci.*, **31**, 146–153.
- Li, X., Floriddia, E.M., Toskas, K., Chalfouh, C., Honore, A., Aumont, A., Vallières, N., Lacroix, S., Fernandes, K.J.L., Guérout, N., & 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., & Barnabé-Heider, F. (2016) Regenerative Potential of Ependymal Cells for Spinal Cord Injuries Over Time. *EBioMedicine*, **13**, 55–65.
- Li, X., Li, J., Xiao, Z., & Dai, J. (2018) [The role of glial scar on axonal regeneration after spinal cord injury]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi Chin. J. Reparative Reconstr. Surg.*, **32**, 973–978.
- Li, Y., Field, P.M., & Raisman, G. (1997) Repair of Adult Rat Corticospinal Tract by Transplants of Olfactory Ensheathing Cells. *Science*, **277**, 2000–2002.
- Li, Y., Ritzel, R.M., Khan, N., Cao, T., He, J., Lei, Z., Matyas, J.J., Sabirzhanov, B., Liu, S., Li, H., Stoica, B.A., Loane, D.J., Faden, A.I., & Wu, J. (2020) Delayed microglial depletion after

- spinal cord injury reduces chronic inflammation and neurodegeneration in the brain and improves neurological recovery in male mice. *Theranostics*, **10**, 11376–11403.
- Li, Y., Zou, T., Xue, L., Yin, Z.Q., Huo, S., & Xu, H. (2017) TGF- β 1 enhances phagocytic removal of neuron debris and neuronal survival by olfactory ensheathing cells via integrin/MFG-E8 signaling pathway. *Mol. Cell. Neurosci.*, **85**, 45–56.
- Lima, C., Escada, P., Pratas-Vital, J., Branco, C., Arcangeli, C.A., Lazzeri, G., Maia, C.A.S., Capucho, C., Hasse-Ferreira, A., & Peduzzi, J.D. (2010) Olfactory mucosal autografts and rehabilitation for chronic traumatic spinal cord injury. *Neurorehabil. Neural Repair*, **24**, 10–22.
- Lima, C., Pratas-Vital, J., Escada, P., Hasse-Ferreira, A., Capucho, C., & Peduzzi, J.D. (2006) Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study. *J. Spinal Cord Med.*, **29**, 191-203; discussion 204-206.
- Lipson, A.C., Widenfalk, J., Lindqvist, E., Ebendal, T., & Olson, L. (2003) Neurotrophic properties of olfactory ensheathing glia. *Exp. Neurol.*, **180**, 167–171.
- Llorens-Martín, M., Jurado-Arjona, J., Avila, J., & Hernández, F. (2015) Novel connection between newborn granule neurons and the hippocampal CA2 field. *Exp. Neurol.*, **263**, 285–292.
- Llorens-Martín, M., Jurado-Arjona, J., Bolós, M., Pallas-Bazarra, N., & Ávila, J. (2016) Forced swimming sabotages the morphological and synaptic maturation of newborn granule neurons and triggers a unique pro-inflammatory milieu in the hippocampus. *Brain. Behav. Immun.*, **53**, 242–254.
- Lodish, H.F., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Bretscher, A., Ploegh, H., & Matsudaira, p (2008) Molecular Cell Biology, 6th edition. W. H. Freeman and Company, N.Y.
- Lohof, A.M., Dufor, T., & Sherrard, R.M. (2022) Neural Circuit Repair by Low-Intensity rTMS. *The Cerebellum*, **21**, 750–754.
- Lois, C. & Alvarez-Buylla, A. (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, **264**, 1145–1148.
- Lois, C., García-Verdugo, J.M., & Alvarez-Buylla, A. (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science*, **271**, 978–981.
- Lotte, F., Bougrain, L., Cichocki, A., Clerc, M., Congedo, M., Rakotomamonjy, A., & Yger, F. (2018) A review of classification algorithms for EEG-based brain-computer interfaces: a 10 year update. *J. Neural Eng.*, **15**, 031005.
- Louissaint, A., Rao, S., Leventhal, C., & Goldman, S.A. (2002) Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron*, **34**, 945–960.
- Louveau, A., Harris, T.H., & Kipnis, J. (2015) Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends Immunol.*, **36**, 569–577.
- Lovatt, D., Sonnewald, U., Waagepetersen, H.S., Schousboe, A., He, W., Lin, J.H.-C., Han, X., Takano, T., Wang, S., Sim, F.J., Goldman, S.A., & Nedergaard, M. (2007) The Transcriptome and Metabolic Gene Signature of Protoplasmic Astrocytes in the Adult Murine Cortex. *J. Neurosci.*, **27**, 12255–12266.
- Lovatt, D., Xu, Q., Liu, W., Takano, T., Smith, N.A., Schnermann, J., Tieu, K., & Nedergaard, M. (2012) Neuronal adenosine release, and not astrocytic ATP release, mediates feedback inhibition of excitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 6265–6270.
- Lu, P., Freria, C.M., Graham, L., Tran, A.N., Villarta, A., Yassin, D., Huie, J.R., Ferguson, A.R., & Tuszynski, M.H. (2022) Rehabilitation combined with neural progenitor cell grafts enables functional recovery in chronic spinal cord injury. *JCI Insight*, **7**, e158000.

- Lu, P., Jones, L.L., Snyder, E.Y., & Tuszynski, M.H. (2003) Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, **181**, 115–129.
- Lu, P., Wang, Y., Graham, L., McHale, K., Gao, M., Wu, D., Brock, J., Blesch, A., Rosenzweig, E.S., Havton, L.A., Zheng, B., Conner, J.M., Marsala, M., & Tuszynski, M.H. (2012) Long-Distance Growth and Connectivity of Neural Stem Cells After Severe Spinal Cord Injury. *Cell*, **150**, 1264–1273.
- Lucin, K.M., Sanders, V.M., Jones, T.B., Malarkey, W.B., & Popovich, P.G. (2007) Impaired Antibody Synthesis after Spinal Cord Injury is Level-Dependent and is Due to Sympathetic Nervous System Dysregulation. *Exp. Neurol.*, **207**, 75–84.
- Lukovic, D., Stojkovic, M., Moreno-Manzano, V., Jendelova, P., Sykova, E., Bhattacharya, S.S., & Erceg, S. (2015) Concise review: reactive astrocytes and stem cells in spinal cord injury: good guys or bad guys? *Stem Cells Dayt. Ohio*, **33**, 1036–1041.
- Ma, Y., Deng, M., Zhao, X., & Liu, M. (2020) Alternatively Polarized Macrophages Regulate the Growth and Differentiation of Ependymal Stem Cells through the SIRT2 Pathway. *Exp. Neurobiol.*, **29**, 150–163.
- MacDonald, C.J., Carrow, S., Place, R., & Eichenbaum, H. (2013) Distinct hippocampal time cell sequences represent odor memories in immobilized rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, **33**, 14607–14616.
- Macedo-Ramos, H., Campos, F.S.O., Carvalho, L.A., Ramos, I.B., Teixeira, L.M., De Souza, W., Cavalcante, L.A., & Baetas-da-Cruz, W. (2011) Olfactory ensheathing cells as putative host cells for *Streptococcus pneumoniae*: evidence of bacterial invasion via mannose receptor-mediated endocytosis. *Neurosci. Res.*, **69**, 308–313.
- Maday, S., Twelvetrees, A.E., Moughamian, A.J., & Holzbaur, E.L.F. (2014) Axonal transport: cargo-specific mechanisms of motility and regulation. *Neuron*, **84**, 292–309.
- Mai, J. & George, P. (2011) The Human Nervous System - 3rd Edition. [https://www.elsevier.com/books-Hum.-Nerv.-Syst.-0-12-374236-0](https://www.elsevier.com/books/Hum.-Nerv.-Syst.-0-12-374236-0), URL <https://www.elsevier.com/books/the-human-nervous-system/mai/978-0-12-374236-0>
- Maldonado-Bouchard, S., Peters, K., Woller, S.A., Madahian, B., Faghihi, U., Patel, S., Bake, S., & Hook, M.A. (2016) Inflammation is increased with anxiety- and depression-like signs in a rat model of spinal cord injury. *Brain. Behav. Immun.*, **51**, 176–195.
- Malenka, R.C. & Bear, M.F. (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, **44**, 5–21.
- Malgieri, A., Kantzari, E., Patrizi, M.P., & Gambardella, S. (2010) Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **3**, 248–269.
- Mandolesi, G., Gentile, A., Musella, A., Fresegna, D., De Vito, F., Bullitta, S., Sepman, H., Marfia, G.A., & Centonze, D. (2015) Synaptopathy connects inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.*, **11**, 711–724.
- Marichal, N., García, G., Radmilovich, M., Trujillo-Cenóz, O., & Russo, R.E. (2009) Enigmatic Central Canal Contacting Cells: Immature Neurons in “Standby Mode”? *J. Neurosci.*, **29**, 10010–10024.
- Marín-Teva, J.L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., Rooijen, N. van, & Mallat, M. (2004) Microglia Promote the Death of Developing Purkinje Cells. *Neuron*, **41**, 535–547.
- Martens, D.J., Seaberg, R.M., & van der Kooy, D. (2002) In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord. *Eur. J. Neurosci.*, **16**, 1045–1057.

- McCandless, E.E., Piccio, L., Woerner, B.M., Schmidt, R.E., Rubin, J.B., Cross, A.H., & Klein, R.S. (2008) Pathological Expression of CXCL12 at the Blood-Brain Barrier Correlates with Severity of Multiple Sclerosis. *Am. J. Pathol.*, **172**, 799–808.
- McDonald, J.W., Becker, D., Sadowsky, C.L., Jane, J.A., Conturo, T.E., & Schultz, L.M. (2002) Late recovery following spinal cord injury. Case report and review of the literature. *J. Neurosurg.*, **97**, 252–265.
- McTigue, D.M., Wei, P., & Stokes, B.T. (2001) Proliferation of NG2-Positive Cells and Altered Oligodendrocyte Numbers in the Contused Rat Spinal Cord. *J. Neurosci.*, **21**, 3392–3400.
- M'Dahoma, S., Bourgoïn, S., Kayser, V., Barthélémy, S., Chevarin, C., Chali, F., Orsal, D., & Hamon, M. (2014) Spinal cord transection-induced allodynia in rats--behavioral, physiopathological and pharmacological characterization. *PLoS One*, **9**, e102027.
- Mecca, C., Giambanco, I., Donato, R., & Arcuri, C. (2018) Microglia and Aging: The Role of the TREM2-DAP12 and CX3CL1-CX3CR1 Axes. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 318.
- Meletis, K., Barnabé-Heider, F., Carlén, M., Evergren, E., Tomilin, N., Shupliakov, O., & Frisén, J. (2008) Spinal Cord Injury Reveals Multilineage Differentiation of Ependymal Cells. *PLoS Biol.*, **6**, e182.
- Menn, B., Garcia-Verdugo, J.M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., & Alvarez-Buylla, A. (2006) Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, **26**, 7907–7918.
- Mi, H., Haerberle, H., & Barres, B.A. (2001) Induction of Astrocyte Differentiation by Endothelial Cells. *J. Neurosci.*, **21**, 1538–1547.
- Miele, V.J., Panjabi, M.M., & Benzel, E.C. (2012) Chapter 2 - Anatomy and biomechanics of the spinal column and cord. In Verhaagen, J. & McDonald, J.W. (eds), *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, pp. 31–43.
- Milior, G., Lecours, C., Samson, L., Bisht, K., Poggini, S., Pagani, F., Deflorio, C., Lauro, C., Alboni, S., Limatola, C., Banchi, I., Tremblay, M., & Maggi, L. (2016) Fractalkine receptor deficiency impairs microglial and neuronal responsiveness to chronic stress. *Brain. Behav. Immun.*, **55**, 114–125.
- Mirsky, R., Jessen, K.R., Brennan, A., Parkinson, D., Dong, Z., Meier, C., Parmantier, E., & Lawson, D. (2002) Schwann cells as regulators of nerve development. *J. Physiol. Paris*, **96**, 17–24.
- Mizuno, T., Kawanokuchi, J., Numata, K., & Suzumura, A. (2003) Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. *Brain Res.*, **979**, 65–70.
- Moalem, G., Gdalyahu, A., Shani, Y., Otten, U., Lazarovici, P., Cohen, I.R., & Schwartz, M. (2000) Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *J. Autoimmun.*, **15**, 331–345.
- Morel, L., Chiang, M.S.R., Higashimori, H., Shoneye, T., Iyer, L.K., Yelick, J., Tai, A., & Yang, Y. (2017) Molecular and Functional Properties of Regional Astrocytes in the Adult Brain. *J. Neurosci.*, **37**, 8706–8717.
- Morganti, J.M., Nash, K.R., Grimmig, B.A., Ranjit, S., Small, B., Bickford, P.C., & Gemma, C. (2012) The Soluble Isoform of CX3CL1 Is Necessary for Neuroprotection in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *J. Neurosci.*, **32**, 14592–14601.
- Mortazavi, M.M., Verma, K., Harmon, O.A., Griessenauer, C.J., Adeeb, N., Theodore, N., & Tubbs, R.S. (2015) The microanatomy of spinal cord injury: a review. *Clin. Anat. N. Y. N.*, **28**, 27–36.
- Mothe, A. & Tator, C. (2005) Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in the adult rat. *Neuroscience*, **131**, 177–187.

- Nagayama, S., Homma, R., & Imamura, F. (2014) Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front. Neural Circuits*, **8**.
- Nagoshi, N., Shibata, S., Hamanoue, M., Mabuchi, Y., Matsuzaki, Y., Toyama, Y., Nakamura, M., & Okano, H. (2011) Schwann cell plasticity after spinal cord injury shown by neural crest lineage tracing. *Glia*, **59**, 771–784.
- Nagy, J.I. & Rash, J.E. (2003) Astrocyte and Oligodendrocyte Connexins of the Glial Syncytium in Relation to Astrocyte Anatomical Domains and Spatial Buffering. *Cell Commun. Adhes.*, **10**, 401–406.
- Nakajima, K., Honda, S., Tohyama, Y., Imai, Y., Kohsaka, S., & Kurihara, T. (2001) Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J. Neurosci. Res.*, **65**, 322–331.
- Nakashiba, T., Cushman, J.D., Pelkey, K.A., Renaudineau, S., Buhl, D.L., McHugh, T.J., Barrera, V.R., Chittajallu, R., Iwamoto, K.S., McBain, C.J., Fanselow, M.S., & Tonegawa, S. (2012) Young Dentate Granule Cells Mediate Pattern Separation whereas Old Granule Cells Contribute to Pattern Completion. *Cell*, **149**, 188–201.
- Nakazawa, K., Quirk, M.C., Chitwood, R.A., Watanabe, M., Yeckel, M.F., Sun, L.D., Kato, A., Carr, C.A., Johnston, D., Wilson, M.A., & Tonegawa, S. (2002) Requirement for Hippocampal CA3 NMDA Receptors in Associative Memory Recall. *Science*, **297**, 211–218.
- Nakhjavan-Shahraki, B., Yousefifard, M., Rahimi-Movaghar, V., Baikpour, M., Nasirinezhad, F., Safari, S., Yaseri, M., Moghadas Jafari, A., Ghelichkhani, P., Tafakhori, A., & Hosseini, M. (2018) Transplantation of olfactory ensheathing cells on functional recovery and neuropathic pain after spinal cord injury; systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.*, **8**, 325.
- Nash, H.H., Borke, R.C., & Anders, J.J. (2001) New method of purification for establishing primary cultures of ensheathing cells from the adult olfactory bulb. *Glia*, **34**, 81–87.
- Nayak, D., Zinselmeyer, B.H., Corps, K.N., & McGavern, D.B. (2012) In vivo dynamics of innate immune sentinels in the CNS. *Intravital*, **1**, 95–106.
- Nedergaard, M., Ransom, B., & Goldman, S.A. (2003) New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.*, **26**, 523–530.
- Nelson, C.M., Lennon, V.A., Lee, H., Krug, R.G., Kamalova, A., Madigan, N.N., Clark, K.J., Windebank, A.J., & Henley, J.R. (2019) Glucocorticoids Target Ependymal Glia and Inhibit Repair of the Injured Spinal Cord. *Front. Cell Dev. Biol.*, **7**, 56.
- Ness, J.K. & Wood, T.L. (2002) Insulin-like Growth Factor I, but Not Neurotrophin-3, Sustains Akt Activation and Provides Long-Term Protection of Immature Oligodendrocytes from Glutamate-Mediated Apoptosis. *Mol. Cell. Neurosci.*, **20**, 476–488.
- Netter, F.H. (2014) *Atlas of Human Anatomy, Professional Edition E-Book: Including NetterReference.com Access with Full Downloadable Image Bank*. Elsevier Health Sciences.
- Neumann, H. (2001) Control of glial immune function by neurons. *Glia*, **36**, 191–199.
- Nishio, Y., Koda, M., Kamada, T., Someya, Y., Kadota, R., Mannoji, C., Miyashita, T., Okada, S., Okawa, A., Moriya, H., & Yamazaki, M. (2007) Granulocyte colony-stimulating factor attenuates neuronal death and promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **66**, 724–731.
- Noda, M., Doi, Y., Liang, J., Kawanokuchi, J., Sonobe, Y., Takeuchi, H., Mizuno, T., & Suzumura, A. (2011) Fractalkine Attenuates Excito-neurotoxicity via Microglial Clearance of Damaged Neurons and Antioxidant Enzyme Heme Oxygenase-1 Expression. *J. Biol. Chem.*, **286**, 2308–2319.
- Noell, S., Wolburg-Buchholz, K., Mack, A.F., Beedle, A.M., Satz, J.S., Campbell, K.P., Wolburg, H., & Fallier-Becker, P. (2011) Evidence for a role of dystroglycan regulating the membrane architecture of astroglial endfeet. *Eur. J. Neurosci.*, **33**, 2179–2186.

- Nógrádi, A., Pajer, K., & Márton, G. (2011) The role of embryonic motoneuron transplants to restore the lost motor function of the injured spinal cord. *Ann. Anat. Anat. Anz. Off. Organ Anat. Ges.*, **193**, 362–370.
- Nogueira, A.B., Hoshino, H.S.R., Ortega, N.C., dos Santos, B.G.S., & Teixeira, M.J. (2022) Adult human neurogenesis: early studies clarify recent controversies and go further. *Metab. Brain Dis.*, **37**, 153–172.
- Nürnberg, E., Horschitz, S., Schloss, P., & Meyer-Lindenberg, A. (2018) Basal glucocorticoid receptor activation induces proliferation and inhibits neuronal differentiation of human induced pluripotent stem cell-derived neuronal precursor cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **182**, 119–126.
- Nutt, S.E., Chang, E.-A., Suhr, S.T., Schlosser, L.O., Mondello, S.E., Moritz, C.T., Cibelli, J.B., & Horner, P.J. (2013) Caudalized human iPSC-derived neural progenitor cells produce neurons and glia but fail to restore function in an early chronic spinal cord injury model. *Exp. Neurol.*, **248**, 491–503.
- Oberheim, N.A., Goldman, S.A., & Nedergaard, M. (2012) Heterogeneity of Astrocytic Form and Function. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, **814**, 23–45.
- Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H.C., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J.D., Pilcher, W., Ojemann, J.G., Ransom, B.R., Goldman, S.A., & Nedergaard, M. (2009) Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes. *J. Neurosci.*, **29**, 3276–3287.
- Ogata, K. & Kosaka, T. (2002) Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience*, **113**, 221–233.
- O’Keefe, J. & Dostrovsky, J. (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.*, **34**, 171–175.
- Osburg, B., Peiser, C., Dömling, D., Schomburg, L., Ko, Y.T., Voigt, K., & Bickel, U. (2002) Effect of endotoxin on expression of TNF receptors and transport of TNF-alpha at the blood-brain barrier of the rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **283**, E899-908.
- Ottone, C., Krusche, B., Whitby, A., Clements, M., Quadrato, G., Pitulescu, M.E., Adams, R.H., & Parrinello, S. (2014) Direct cell-cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells. *Nat. Cell Biol.*, **16**, 1045–1056.
- Oudega, M. & Xu, X.-M. (2006) Schwann Cell Transplantation for Repair of the Adult Spinal Cord. *J. Neurotrauma*, **23**, 453–467.
- Ousman, S.S. & Kubes, P. (2012) Immune surveillance in the central nervous system. *Nat. Neurosci.*, **15**, 1096–1101.
- Owler, B.K., Pitham, T., & Wang, D. (2010) Aquaporins: relevance to cerebrospinal fluid physiology and therapeutic potential in hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res.*, **7**, 15.
- Palmer, T.D., Willhoite, A.R., & Gage, F.H. (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J. Comp. Neurol.*, **425**, 479–494.
- Pan, W. & Kastin, A.J. (2007) ADIPOKINES AND THE BLOOD-BRAIN BARRIER. *Peptides*, **28**, 1317–1330.
- Pan, W. & Kastin, A.J. (2016) Spinal Cord Injury Changes Cytokine Transport. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **15**, 1139–1150.
- Pan, W., Kastin, A.J., & Brennan, J.M. (2000) Saturable entry of leukemia inhibitory factor from blood to the central nervous system. *J. Neuroimmunol.*, **106**, 172–180.
- Panattoni, G., Amoriello, R., Memo, C., Thalhammer, A., Ballerini, C., & Ballerini, L. (2021) Diverse inflammatory threats modulate astrocytes Ca²⁺ signaling via connexin43 hemichannels in organotypic spinal slices. *Mol. Brain*, **14**, 159.

- Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., & Gross, C.T. (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, **333**, 1456–1458.
- Park, H.-W., Lim, M.-J., Jung, H., Lee, S.-P., Paik, K.-S., & Chang, M.-S. (2010) Human mesenchymal stem cell-derived Schwann cell-like cells exhibit neurotrophic effects, via distinct growth factor production, in a model of spinal cord injury. *Glia*, **58**, 1118–1132.
- Pasinelli, P. & Brown, R.H. (2006) Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat. Rev. Neurosci.*, **7**, 710–723.
- Pekny, M. & Nilsson, M. (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, **50**, 427–434.
- Pellitteri, R., Spatuzza, M., Russo, A., Zaccheo, D., & Stanzani, S. (2009) Olfactory ensheathing cells represent an optimal substrate for hippocampal neurons: an in vitro study. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **27**, 453–458.
- Peng, J., Liu, Y., Umpierre, A.D., Xie, M., Tian, D.-S., Richardson, J.R., & Wu, L.-J. (2019) Microglial P2Y12 receptor regulates ventral hippocampal CA1 neuronal excitability and innate fear in mice. *Mol. Brain*, **12**, 71.
- Peschl, P., Bradl, M., Höftberger, R., Berger, T., & Reindl, M. (2017) Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein: Deciphering a Target in Inflammatory Demyelinating Diseases. *Front. Immunol.*, **8**, 529.
- Pettigrew, L.C., Kryscio, R.J., & Norris, C.M. (2016) The TNF α -Transgenic Rat: Hippocampal Synaptic Integrity, Cognition, Function, and Post-Ischemic Cell Loss. *PLoS One*, **11**, e0154721.
- Phillips, A.A. & Krassioukov, A.V. (2015) Contemporary Cardiovascular Concerns after Spinal Cord Injury: Mechanisms, Maladaptations, and Management. *J. Neurotrauma*, **32**, 1927–1942.
- Picard-Riera, N., Decker, L., Delarasse, C., Goude, K., Nait-Oumesmar, B., Liblau, R., Pham-Dinh, D., & Evercooren, A.B.-V. (2002) Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 13211–13216.
- Pineau, I. & Lacroix, S. (2007) Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *J. Comp. Neurol.*, **500**, 267–285.
- Plemel, J.R., Keough, M.B., Duncan, G.J., Sparling, J.S., Yong, V.W., Stys, P.K., & Tetzlaff, W. (2014) Remyelination after spinal cord injury: is it a target for repair? *Prog. Neurobiol.*, **117**, 54–72.
- Poirrier, A.-L., Nyssen, Y., Scholtes, F., Multon, S., Rinkin, C., Weber, G., Bouhy, D., Brook, G., Franzen, R., & Schoenen, J. (2004) Repetitive transcranial magnetic stimulation improves open field locomotor recovery after low but not high thoracic spinal cord compression-injury in adult rats. *J. Neurosci. Res.*, **75**, 253–261.
- Poliak, S., Salomon, D., Elhanany, H., Sabanay, H., Kiernan, B., Pevny, L., Stewart, C.L., Xu, X., Chiu, S.-Y., Shrager, P., Furley, A.J.W., & Peles, E. (2003) Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K⁺ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *J. Cell Biol.*, **162**, 1149–1160.
- Popa, C., Popa, F., Grigorean, V.T., Onose, G., Sandu, A.M., Popescu, M., Burnei, G., Strambu, V., & Sinescu, C. (2010) Vascular dysfunctions following spinal cord injury. *J. Med. Life*, **3**, 275–285.
- Popovich, P.G., Wei, P., & Stokes, B.T. (1997) Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J. Comp. Neurol.*, **377**, 443–464.

- Prevot, V., Dehouck, B., Sharif, A., Ciofi, P., Giacobini, P., & Clasadonte, J. (2018) The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism. *Endocr. Rev.*, **39**, 333–368.
- Prieto, G.A., Tong, L., Smith, E.D., & Cotman, C.W. (2019) TNF α and IL-1 β but not IL-18 suppresses hippocampal long-term potentiation directly at the synapse. *Neurochem. Res.*, **44**, 49–60.
- Puigdellívol, M., Milde, S., Vilalta, A., Cockram, T.O.J., Allendorf, D.H., Lee, J.Y., Dundee, J.M., Pampušenko, K., Borutaite, V., Nuthall, H.N., Brelstaff, J.H., Spillantini, M.G., & Brown, G.C. (2021) The microglial P2Y6 receptor mediates neuronal loss and memory deficits in neurodegeneration. *Cell Rep.*, **37**, 110148.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A.-Sa., & White, L.E. (2015) *Neurosciences 5e édition*, 5e édition. edn, Neuroscience et cognition. De Boeck supérieur.
- Rabey, J.M. & Dobronevsky, E. (2016) 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. Vienna Austria 1996*, **123**, 1449–1455.
- Radjavi, A., Smirnov, I., Derecki, N., & Kipnis, J. (2014) Dynamics of the Meningeal CD4+ T-cell repertoire are defined by the cervical lymph nodes and facilitate cognitive task performance in mice. *Mol. Psychiatry*, **19**, 531–533.
- Radtke, C., Akiyama, Y., Brokaw, J., Lankford, K.L., Wewetzer, K., Fodor, W.L., & Kocsis, J.D. (2004) Remyelination of the nonhuman primate spinal cord by transplantation of H-transferase transgenic adult pig olfactory ensheathing cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **18**, 335–337.
- Ragnarsson, K.T. (2008) Functional electrical stimulation after spinal cord injury: current use, therapeutic effects and future directions. *Spinal Cord*, **46**, 255–274.
- Ramón-Cueto, A. & Nieto-Sampedro, M. (1992) Glial cells from adult rat olfactory bulb: immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells. *Neuroscience*, **47**, 213–220.
- Ramón-Cueto, A. & Nieto-Sampedro, M. (1994) Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants. *Exp. Neurol.*, **127**, 232–244.
- Ramón-Cueto, A., Plant, G.W., Avila, J., & Bunge, M.B. (1998) Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, **18**, 3803–3815.
- Raper, D., Louveau, A., & Kipnis, J. (2016) How Do Meningeal Lymphatic Vessels Drain the CNS? *Trends Neurosci.*, **39**, 581–586.
- Rauti, R., Cellot, G., D'Andrea, P., Colliva, A., Scaini, D., Tongiorgi, E., & Ballerini, L. (2020) BDNF impact on synaptic dynamics: extra or intracellular long-term release differently regulates cultured hippocampal synapses. *Mol. Brain*, **13**, 43.
- Reiber, H. (2003) Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restor. Neurol. Neurosci.*, **21**, 79–96.
- Repovic, P. & Benveniste, E.N. (2002) Prostaglandin E2 Is a Novel Inducer of Oncostatin-M Expression in Macrophages and Microglia. *J. Neurosci.*, **22**, 5334–5343.
- Resnick, D.K. (2013) Updated Guidelines for the Management of Acute Cervical Spine and Spinal Cord Injury. *Neurosurgery*, **72 Suppl 2**, 1.
- Restivo, L., Niibori, Y., Mercaldo, V., Josselyn, S.A., & Frankland, P.W. (2015) Development of Adult-Generated Cell Connectivity with Excitatory and Inhibitory Cell Populations in the Hippocampus. *J. Neurosci.*, **35**, 10600–10612.

- Rexed, B. (1954) A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.*, **100**, 297–379.
- Robac, A., Neveu, P., Hugede, A., Garrido, E., Nicol, L., Delarue, Q., & Guérout, N. (2021) Repetitive Trans Spinal Magnetic Stimulation Improves Functional Recovery and Tissue Repair in Contusive and Penetrating Spinal Cord Injury Models in Rats. *Biomedicines*, **9**, 1827.
- Rodríguez-Gómez, J.A., Kavanagh, E., Engskog-Vlachos, P., Engskog, M.K.R., Herrera, A.J., Espinosa-Oliva, A.M., Joseph, B., Hajji, N., Venero, J.L., & Burguillos, M.A. (2020) Microglia: Agents of the CNS Pro-Inflammatory Response. *Cells*, **9**, 1717.
- Rogers, J.T., Morganti, J.M., Bachstetter, A.D., Hudson, C.E., Peters, M.M., Grimmig, B.A., Weeber, E.J., Bickford, P.C., & Gemma, C. (2011) CX3CR1 Deficiency Leads to Impairment of Hippocampal Cognitive Function and Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.*, **31**, 16241–16250.
- Rosin, J.M., Sinha, S., Biernaskie, J., & Kurrasch, D.M. (2021) A subpopulation of embryonic microglia respond to maternal stress and influence nearby neural progenitors. *Dev. Cell*, **56**, 1326–1345.e6.
- Rossi, S.L., Nistor, G., Wyatt, T., Yin, H.Z., Poole, A.J., Weiss, J.H., Gardener, M.J., Dijkstra, S., Fischer, D.F., & Keirstead, H.S. (2010) Histological and functional benefit following transplantation of motor neuron progenitors to the injured rat spinal cord. *PLoS One*, **5**, e11852.
- Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., & Kuncl, R.W. (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, **13**, 713–725.
- Roy, C.S. & Sherrington, C.S. (1890) On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *J. Physiol.*, **11**, 85–158.17.
- Rua, R. & McGavern, D.B. (2018) Advances in Meningeal Immunity. *Trends Mol. Med.*, **24**, 542–559.
- Ruggieri, A., Anticoli, S., D’Ambrosio, A., Giordani, L., & Viora, M. (2016) The influence of sex and gender on immunity, infection and vaccination. *Ann. Ist. Super. Sanita*, **52**, 198–204.
- Runyan, S.A. & Phelps, P.E. (2009) Mouse olfactory ensheathing glia enhance axon outgrowth on a myelin substrate in vitro. *Exp. Neurol.*, **216**, 95–104.
- Ruschel, J., Hellal, F., Flynn, K.C., Dupraz, S., Elliott, D.A., Tedeschi, A., Bates, M., Sliwinski, C., Brook, G., Dobrindt, K., Peitz, M., Brüstle, O., Norenberg, M.D., Blesch, A., Weidner, N., Bunge, M.B., Bixby, J.L., & Bradke, F. (2015) Axonal regeneration. Systemic administration of ephothilone B promotes axon regeneration after spinal cord injury. *Science*, **348**, 347–352.
- Sabelström, H., Stenudd, M., Réu, P., Dias, D.O., Elfineh, M., Zdunek, S., Damberg, P., Göritz, C., & Frisé, J. (2013) Resident Neural Stem Cells Restrict Tissue Damage and Neuronal Loss After Spinal Cord Injury in Mice. *Science*, **342**, 637–640.
- Saberi, H., Firouzi, M., Habibi, Z., Moshayedi, P., Aghayan, H.R., Arjmand, B., Hosseini, K., Razavi, H.E., & Yekaninejad, M.S. (2011) Safety of intramedullary Schwann cell transplantation for postrehabilitation spinal cord injuries: 2-year follow-up of 33 cases: Clinical article. *J. Neurosurg. Spine*, **15**, 515–525.
- Sabourin, J.-C., Ackema, K.B., Ohayon, D., Guichet, P.-O., Perrin, F.E., Garces, A., Ripoll, C., Charité, J., Simonneau, L., Kettenmann, H., Zine, A., Privat, A., Valmier, J., Pattyn, A., & Hugnot, J.-P. (2009) A Mesenchymal-Like ZEB1+ Niche Harbors Dorsal Radial Glial Fibrillary Acidic Protein-Positive Stem Cells in the Spinal Cord. *Stem Cells*, **27**, 2722–2733.
- Sahay, A., Scobie, K.N., Hill, A.S., O’Carroll, C.M., Kheirbek, M.A., Burghardt, N.S., Fenton, A.A., Dranovsky, A., & Hen, R. (2011) Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, **472**, 466–470.

- Saher, G., Brügger, B., Lappe-Siefke, C., Möbius, W., Tozawa, R., Wehr, M.C., Wieland, F., Ishibashi, S., & Nave, K.-A. (2005) High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat. Neurosci.*, **8**, 468–475.
- Sakka, L., Coll, G., & Chazal, J. (2011) Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head Neck Dis.*, **128**, 309–316.
- Salewski, R.P., Buttigieg, J., Mitchell, R.A., van der Kooy, D., Nagy, A., & Fehlings, M.G. (2013) The Generation of Definitive Neural Stem Cells from PiggyBac Transposon-Induced Pluripotent Stem Cells Can Be Enhanced by Induction of the NOTCH Signaling Pathway. *Stem Cells Dev.*, **22**, 383–396.
- Santillan, A., Nacarino, V., Greenberg, E., Riina, H.A., Gobin, Y.P., & Patsalides, A. (2012) Vascular anatomy of the spinal cord. *J. Neurointerventional Surg.*, **4**, 67–74.
- Sas, A.R., Carbajal, K.S., Jerome, A.D., Menon, R., Yoon, C., Kalinski, A.L., Giger, R.J., & Segal, B.M. (2020) A novel neutrophil subset promotes CNS neuron survival and axon regeneration. *Nat. Immunol.*, **21**, 1496–1505.
- Sato-Hashimoto, M., Nozu, T., Toriba, R., Horikoshi, A., Akaike, M., Kawamoto, K., Hirose, A., Hayashi, Y., Nagai, H., Shimizu, W., Saiki, A., Ishikawa, T., Elhanbly, R., Kotani, T., Murata, Y., Saito, Y., Naruse, M., Shibasaki, K., Oldenburg, P.-A., Jung, S., Matozaki, T., Fukazawa, Y., & Ohnishi, H. (2019) Microglial SIRP α regulates the emergence of CD11c⁺ microglia and demyelination damage in white matter. *eLife*, **8**, e42025.
- Satzer, D., Miller, C., Maxon, J., Voth, J., DiBartolomeo, C., Mahoney, R., Dutton, J.R., Low, W.C., & Parr, A.M. (2015) T cell deficiency in spinal cord injury: altered locomotor recovery and whole-genome transcriptional analysis. *BMC Neurosci.*, **16**, 74.
- Saw, G., Krishna, K., Gupta, N., Soong, T.W., Mallilankaraman, K., Sajikumar, S., & Dheen, S.T. (2020) Epigenetic regulation of microglial phosphatidylinositol 3-kinase pathway involved in long-term potentiation and synaptic plasticity in rats. *Glia*, **68**, 656–669.
- Schley, D., Carare-Nnadi, R., Please, C.P., Perry, V.H., & Weller, R.O. (2006) Mechanisms to explain the reverse perivascular transport of solutes out of the brain. *J. Theor. Biol.*, **238**, 962–974.
- Schneider, M.P., Sartori, A.M., Ineichen, B.V., Moors, S., Engmann, A.K., Hofer, A.-S., Weinmann, O., Kessler, T.M., & Schwab, M.E. (2019) Anti-Nogo-A Antibodies As a Potential Causal Therapy for Lower Urinary Tract Dysfunction after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.*, **39**, 4066–4076.
- Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., Frampton, J., Liu, K.J., & Geissmann, F. (2012) A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*, **336**, 86–90.
- Sellner, S., Paricio-Montesinos, R., Spieß, A., Masuch, A., Erny, D., Harsan, L.A., Elverfeldt, D.V., Schwabenland, M., Biber, K., Staszewski, O., Lira, S., Jung, S., Prinz, M., & Blank, T. (2016) Microglial CX3CR1 promotes adult neurogenesis by inhibiting Sirt 1/p65 signaling independent of CX3CL1. *Acta Neuropathol. Commun.*, **4**, 102.
- Shaked, I., Tchoresh, D., Gersner, R., Meiri, G., Mordechai, S., Xiao, X., Hart, R.P., & Schwartz, M. (2005) Protective autoimmunity: interferon-gamma enables microglia to remove glutamate without evoking inflammatory mediators. *J. Neurochem.*, **92**, 997–1009.
- Shechter, R. & Schwartz, M. (2013) CNS sterile injury: just another wound healing? *Trends Mol. Med.*, **19**, 135–143.
- Sheerin, F. (2004) Spinal cord injury: anatomy and physiology of the spinal cord. *Emerg. Nurse J. RCN Accid. Emerg. Nurs. Assoc.*, **12**, 30–36.
- Shen, F., Walker, E.J., Jiang, L., Degos, V., Li, J., Sun, B., Heriyanto, F., Young, W.L., & Su, H. (2011) Coexpression of angiopoietin-1 with VEGF increases the structural integrity of the

- blood–brain barrier and reduces atrophy volume. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **31**, 2343–2351.
- Shen, H., Fan, C., You, Z., Xiao, Z., Zhao, Y., & Dai, J. (2022) Advances in Biomaterial-Based Spinal Cord Injury Repair. *Adv. Funct. Mater.*, **32**, 2110628.
- Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S.-M., Goderie, S.K., Roysam, B., & Temple, S. (2008) Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: A quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell*, **3**, 289–300.
- Shen, Y., Tenney, A.P., Busch, S.A., Horn, K.P., Cuascut, F.X., Liu, K., He, Z., Silver, J., & Flanagan, J.G. (2009) PTP σ Is a Receptor for Chondroitin Sulfate Proteoglycan, an Inhibitor of Neural Regeneration. *Science*, **326**, 592–596.
- Shepro, D. & Morel, N.M.L. (1993) Pericyte physiology. *FASEB J.*, **7**, 1031–1038.
- Shihabuddin, L.S., Horner, P.J., Ray, J., & Gage, F.H. (2000) Adult Spinal Cord Stem Cells Generate Neurons after Transplantation in the Adult Dentate Gyrus. *J. Neurosci.*, **20**, 8727–8735.
- Shinozaki, M., Iwanami, A., Fujiyoshi, K., Tashiro, S., Kitamura, K., Shibata, S., Fujita, H., Nakamura, M., & Okano, H. (2016) Combined treatment with chondroitinase ABC and treadmill rehabilitation for chronic severe spinal cord injury in adult rats. *Neurosci. Res.*, **113**, 37–47.
- Sibille, J., Pannasch, U., & Rouach, N. (2014) Astroglial potassium clearance contributes to short-term plasticity of synaptically evoked currents at the tripartite synapse. *J. Physiol.*, **592**, 87–102.
- Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M.G., Rimoldi, M., Biswas, S.K., Allavena, P., & Mantovani, A. (2008) Macrophage polarization in tumour progression. *Semin. Cancer Biol.*, **18**, 349–355.
- Siddiqui, A.M., Khazaei, M., & Fehlings, M.G. (2015) Translating mechanisms of neuroprotection, regeneration, and repair to treatment of spinal cord injury. *Prog. Brain Res.*, **218**, 15–54.
- Silva, N.A., Sousa, N., Reis, R.L., & Salgado, A.J. (2014) From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. *Prog. Neurobiol.*, **114**, 25–57.
- Silver, J. & Miller, J.H. (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 146–156.
- Sinopoulou, E., Spejo, A.B., Roopnarine, N., Burnside, E.R., Bartus, K., De Winter, F., McMahon, S.B., & Bradbury, E.J. (2022) Chronic muscle recordings reveal recovery of forelimb function in spinal injured female rats after cortical epidural stimulation combined with rehabilitation and chondroitinase ABC. *J. Neurosci. Res.*, **100**, 2055–2076.
- Sipe, G.O., Lowery, R.L., Tremblay, M.-È., Kelly, E.A., Lamantia, C.E., & Majewska, A.K. (2016) Microglial P2Y₁₂ is necessary for synaptic plasticity in mouse visual cortex. *Nat. Commun.*, **7**, 10905.
- Siyahhan, B., Knobloch, V., de Zélicourt, D., Asgari, M., Schmid Daners, M., Poulikakos, D., & Kurtcuoglu, V. (2014) Flow induced by ependymal cilia dominates near-wall cerebrospinal fluid dynamics in the lateral ventricles. *J. R. Soc. Interface*, **11**, 20131189.
- Sloan, S.A. & Barres, B.A. (2014) Looks Can Be Deceiving: Reconsidering the Evidence for Gliotransmission. *Neuron*, **84**, 1112–1115.
- Sofroniew, M.V. (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.*, **32**, 638–647.
- Sofroniew, M.V. (2018) Dissecting spinal cord regeneration. *Nature*, **557**, 343–350.
- Sofroniew, M.V. (2020) Astrocyte reactivity: Subtypes, states and functions in CNS innate immunity. *Trends Immunol.*, **41**, 758–770.
- Sofroniew, M.V. & Vinters, H.V. (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **119**, 7–35.

- Sosale, A., Robson, J.A., & Stelzner, D.J. (1988) Laminin distribution during corticospinal tract development and after spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, **102**, 14–22.
- Soto-Rodriguez, G., Gonzalez-Barrrios, J.-A., Martinez-Fong, D., Blanco-Alvarez, V.-M., Eguibar, J.R., Ugarte, A., Martinez-Perez, F., Brambila, E., Peña, L.M.-P., Pazos-Salazar, N.-G., Torres-Soto, M., Garcia-Robles, G., Tomas-Sanchez, C., & Leon-Chavez, B.A. (2015) Analysis of chemokines and receptors expression profile in the myelin mutant taiep rat. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2015**, 397310.
- Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., Possnert, G., Mash, D.C., Druid, H., & Frisén, J. (2013) Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, **153**, 1219–1227.
- Spampinato, S.F., Costantino, G., Merlo, S., Canonico, P.L., & Sortino, M.A. (2022) Microglia Contributes to BAF-312 Effects on Blood-Brain Barrier Stability. *Biomolecules*, **12**, 1174.
- Spira, M.E., Benbassat, D., & Dormann, A. (1993) Resealing of the proximal and distal cut ends of transected axons: electrophysiological and ultrastructural analysis. *J. Neurobiol.*, **24**, 300–316.
- Squire, L.R. (2004) Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **82**, 171–177.
- Squire, L.R. & Zola-Morgan, J. (2011) The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annu. Rev. Neurosci.*, **34**, 259–288.
- Staniland, A.A., Clark, A.K., Wodarski, R., Sasso, O., Maione, F., D'Acquisto, F., & Malcangio, M. (2010) Reduced inflammatory and neuropathic pain and decreased spinal microglial response in fractalkine receptor (CX3CR1) knockout mice. *J. Neurochem.*, **114**, 1143–1157.
- Stefano, L., Racchetti, G., Bianco, F., Passini, N., Gupta, R.S., Panina Bordignon, P., & Meldolesi, J. (2009) The surface-exposed chaperone, Hsp60, is an agonist of the microglial TREM2 receptor. *J. Neurochem.*, **110**, 284–294.
- Stellwagen, D., Beattie, E.C., Seo, J.Y., & Malenka, R.C. (2005) Differential Regulation of AMPA Receptor and GABA Receptor Trafficking by Tumor Necrosis Factor- α . *J. Neurosci.*, **25**, 3219–3228.
- Stellwagen, D. & Malenka, R.C. (2006) Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature*, **440**, 1054–1059.
- Stenudd, M., Sabelström, H., & Frisén, J. (2015) Role of endogenous neural stem cells in spinal cord injury and repair. *JAMA Neurol.*, **72**, 235–237.
- Stenudd, M., Sabelström, H., Llorens-Bobadilla, E., Zamboni, M., Blom, H., Brismar, H., Zhang, S., Basak, O., Clevers, H., Göritz, C., Barnabé-Heider, F., & Frisén, J. (2022) Identification of a discrete subpopulation of spinal cord ependymal cells with neural stem cell properties. *Cell Rep.*, **38**, 110440.
- Stephan, J., Eitelmann, S., & Zhou, M. (2021) Approaches to Study Gap Junctional Coupling. *Front. Cell. Neurosci.*, **15**, 640406.
- Stillman, M.D., Barber, J., Burns, S., Williams, S., & Hoffman, J.M. (2017) Complications of Spinal Cord Injury Over the First Year After Discharge From Inpatient Rehabilitation. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, **98**, 1800–1805.
- Stirling, D.P. & Yong, V.W. (2008) Dynamics of the inflammatory response after murine spinal cord injury revealed by flow cytometry. *J. Neurosci. Res.*, **86**, 1944–1958.
- Stratchko, L., Filatova, I., Agarwal, A., & Kanekar, S. (2016) The Ventricular System of the Brain: Anatomy and Normal Variations. *Semin. Ultrasound. CT MR*, **37**, 72–83.
- Su, Z., Chen, J., Qiu, Y., Yuan, Y., Zhu, F., Zhu, Y., Liu, X., Pu, Y., & He, C. (2013) Olfactory ensheathing cells: the primary innate immunocytes in the olfactory pathway to engulf apoptotic olfactory nerve debris. *Glia*, **61**, 490–503.

- Sugai, K., Sumida, M., Shofuda, T., Yamaguchi, R., Tamura, T., Kohzuki, T., Abe, T., Shibata, R., Kamata, Y., Ito, S., Okubo, T., Tsuji, O., Nori, S., Nagoshi, N., Yamanaka, S., Kawamata, S., Kanemura, Y., Nakamura, M., & Okano, H. (2021) First-in-human clinical trial of transplantation of iPSC-derived NS/PCs in subacute complete spinal cord injury: Study protocol. *Regen. Ther.*, **18**, 321–333.
- Sun, B.-L., Wang, L.-H., Yang, T., Sun, J.-Y., Mao, L.-L., Yang, M.-F., Yuan, H., Colvin, R.A., & Yang, X.-Y. (2018) Lymphatic drainage system of the brain: A novel target for intervention of neurological diseases. *Prog. Neurobiol.*, **163–164**, 118–143.
- Sun, H., He, X., Tao, X., Hou, T., Chen, M., He, M., & Liao, H. (2020) The CD200/CD200R signaling pathway contributes to spontaneous functional recovery by enhancing synaptic plasticity after stroke. *J. Neuroinflammation*, **17**, 171.
- Syková, E., Homola, A., Mazanec, R., Lachmann, H., Konrádová, S.L., Kobylka, P., Pádr, R., Neuwirth, J., Komrská, V., Vávra, V., Stulík, J., & Bojar, M. (2006) Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplant.*, **15**, 675–687.
- Tabakow, P., Jarmundowicz, W., Czapiga, B., Fortuna, W., Miedzybrodzki, R., Czyz, M., Huber, J., Szarek, D., Okurowski, S., Szewczyk, P., Gorski, A., & Raisman, G. (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., Salomon, B., Halon, A., Li, Y., Lipiec, J., Kulczyk, A., & 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.
- Takahashi, H., Yamazaki, M., Okawa, A., Sakuma, T., Kato, K., Hashimoto, M., Hayashi, K., Furuya, T., Fujiyoshi, T., Kawabe, J., Yamauchi, T., Mannoji, C., Miyashita, T., Kadota, R., Hashimoto, M., Ito, Y., Takahashi, K., & Koda, M. (2012) Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor for acute spinal cord injury: a phase I/IIa clinical trial. *Eur. Spine J. Off. Publ. Eur. Spine Soc. Eur. Spinal Deform. Soc. Eur. Sect. Cerv. Spine Res. Soc.*, **21**, 2580–2587.
- Takahashi, K., Rochford, C.D.P., & Neumann, H. (2005) Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J. Exp. Med.*, **201**, 647–657.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007) Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, **131**, 861–872.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, **126**, 663–676.
- Tani, H., Dulla, C.G., Farzampour, Z., Taylor-Weiner, A., Huguenard, J.R., & Reimer, R.J. (2014) A local glutamate-glutamine cycle sustains synaptic excitatory transmitter release. *Neuron*, **81**, 888–900.
- Tansley, S., Gu, N., Guzmán, A.U., Cai, W., Wong, C., Lister, K.C., Muñoz-Pino, E., Yousefpour, N., Roome, R.B., Heal, J., Wu, N., Castonguay, A., Lean, G., Muir, E.M., Kania, A., Prager-Khoutorsky, M., Zhang, J., Gkogkas, C.G., Fawcett, J.W., Diatchenko, L., Ribeiro-da-Silva, A., De Koninck, Y., Mogil, J.S., & Khoutorsky, A. (2022) Microglia-mediated degradation of perineuronal nets promotes pain. *Science*, **377**, 80–86.
- Tashiro, A., Makino, H., & Gage, F.H. (2007) Experience-Specific Functional Modification of the Dentate Gyrus through Adult Neurogenesis: A Critical Period during an Immature Stage. *J. Neurosci.*, **27**, 3252–3259.

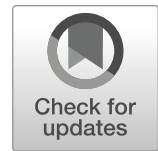
- Tazoe, T. & Perez, M.A. (2015) Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on recovery of function after spinal cord injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, **96**, S145-155.
- Tetzlaff, W., Okon, E.B., Karimi-Abdolrezaee, S., Hill, C.E., Sparling, J.S., Plemel, J.R., Plunet, W.T., Tsai, E.C., Baptiste, D., Smithson, L.J., Kawaja, M.D., Fehlings, M.G., & Kwon, B.K. (2011) A Systematic Review of Cellular Transplantation Therapies for Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma*, **28**, 1611–1682.
- Timmerman, R., Burm, S.M., & Bajramovic, J.J. (2018) An Overview of in vitro Methods to Study Microglia. *Front. Cell. Neurosci.*, **12**, 242.
- Tobin, M.K., Musaraca, K., Disouky, A., Shetti, A., Bheri, A., Honer, W.G., Kim, N., Dawe, R.J., Bennett, D.A., Arfanakis, K., & Lazarov, O. (2019) Human Hippocampal Neurogenesis Persists in Aged Adults and Alzheimer’s Disease Patients. *Cell Stem Cell*, **24**, 974–982.e3.
- Toni, N., Laplagne, D.A., Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C.E., Gage, F.H., & Schinder, A.F. (2008) Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat. Neurosci.*, **11**, 901–907.
- Torres, F., Villalon, E., Poblete, P., Moraga-Amaro, R., Linsambarth, S., Riquelme, R., Zangen, A., & Stehberg, J. (2015) Retrospective Evaluation of Deep Transcranial Magnetic Stimulation as Add-On Treatment for Parkinson’s Disease. *Front. Neurol.*, **6**, 210.
- Torrillas de la Cal, A., Paniagua-Torija, B., Arevalo-Martin, A., Faulkes, C.G., Jiménez, A.J., Ferrer, I., Molina-Holgado, E., & Garcia-Ovejero, D. (2021) The Structure of the Spinal Cord Ependymal Region in Adult Humans Is a Distinctive Trait among Mammals. *Cells*, **10**, 2235.
- Trang, T., Beggs, S., & Salter, M.W. (2011) Brain-Derived Neurotrophic Factor from Microglia: A Molecular Substrate for Neuropathic Pain. *Neuron Glia Biol.*, **7**, 99–108.
- Trapp, B.D. (1990) Myelin-associated glycoprotein. Location and potential functions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **605**, 29–43.
- Trebst, C., König, F., Ransohoff, R., Brück, W., & Stangel, M. (2008) CCR5 expression on macrophages/microglia is associated with early remyelination in multiple sclerosis lesions. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.*, **14**, 728–733.
- Tysseling, V.M., Mithal, D.S., Sahni, V., Birch, D., Jung, H., Belmadani, A., Miller, R.J., & Kessler, J.A. (2011) SDF1 in the dorsal corticospinal tract promotes CXCR4+ cell migration after spinal cord injury. *J. Neuroinflammation*, **8**, 16.
- Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., & Yamashita, T. (2013) Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat. Neurosci.*, **16**, 543–551.
- Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S., & Barres, B.A. (2001) Control of synapse number by glia. *Science*, **291**, 657–661.
- van Deijk, A.-L.F., Camargo, N., Timmerman, J., Heistek, T., Brouwers, J.F., Mogavero, F., Mansvelder, H.D., Smit, A.B., & Verheijen, M.H.G. (2017) Astrocyte lipid metabolism is critical for synapse development and function in vivo. *Glia*, **65**, 670–682.
- Van Itallie, C.M. & Anderson, J.M. (2013) Claudin interactions in and out of the tight junction. *Tissue Barriers*, **1**, e25247.
- Varga, I. & Mravec, B. (2015) Nerve Fiber Types. In *Nerves and Nerve Injuries*. Elsevier, pp. 107–113.
- Vawda, R., Wilcox, J., & Fehlings, M. (2012) Current stem cell treatments for spinal cord injury. *Indian J. Orthop.*, **46**, 10–18.
- Verdú, E., Navarro, X., Gudiño-Cabrera, G., Rodríguez, F.J., Ceballos, D., Valero, A., & Nieto-Sampedro, M. (1999) Olfactory bulb ensheathing cells enhance peripheral nerve regeneration. *Neuroreport*, **10**, 1097–1101.

- Verkhratsky, A. & Butt, A. (2013) *Oligodendrocytes*. In *Glial Physiology and Pathophysiology*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Verrier, J.D., Jackson, T.C., Bansal, R., Kochanek, P.M., Puccio, A.M., Okonkwo, D.O., & Jackson, E.K. (2012) The brain in vivo expresses the 2',3'-cAMP-adenosine pathway. *J. Neurochem.*, **122**, 115–125.
- Voskuhl, R. (2011) Sex differences in autoimmune diseases. *Biol. Sex Differ.*, **2**, 1.
- Wagner, F.B., Mignardot, J.-B., Goff-Mignardot, C.G.L., Demesmaeker, R., Komi, S., Capogrosso, M., Rowald, A., Seáñez, I., Caban, M., Pironcini, E., Vat, M., McCracken, L.A., Heimgartner, R., Fodor, I., Watrin, A., Seguin, P., Paoles, E., Keybus, K.V.D., Eberle, G., Schurch, B., Pralong, E., Becce, F., Prior, J., Buse, N., Buschman, R., Neufeld, E., Kuster, N., Carda, S., Zitzewitz, J. von, Delattre, V., Denison, T., Lambert, H., Minassian, K., Bloch, J., & Courtine, G. (2018) Targeted neurotechnology restores walking in humans with spinal cord injury. *Nature*, **563**, 65–71.
- Wakselman, S., Béchade, C., Roumier, A., Bernard, D., Triller, A., & Bessis, A. (2008) Developmental Neuronal Death in Hippocampus Requires the Microglial CD11b Integrin and DAP12 Immunoreceptor. *J. Neurosci.*, **28**, 8138–8143.
- Wanner, I.B., Anderson, M.A., Song, B., Levine, J., Fernandez, A., Gray-Thompson, Z., Ao, Y., & Sofroniew, M.V. (2013) Glial Scar Borders Are Formed by Newly Proliferated, Elongated Astrocytes That Interact to Corral Inflammatory and Fibrotic Cells via STAT3-Dependent Mechanisms after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.*, **33**, 12870–12886.
- Watson, C. & Kayalioglu, G. (2009) The Organization of the Spinal Cord 1–7.
- Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A.C., & Reynolds, B.A. (1996) Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, **16**, 7599–7609.
- Wenger, N., Moraud, E.M., Gandar, J., Musienko, P., Capogrosso, M., Baud, L., Le Goff, C.G., Barraud, Q., Pavlova, N., Dominici, N., Minev, I.R., Asboth, L., Hirsch, A., Duis, S., Kreider, J., Mortera, A., Haverbeck, O., Kraus, S., Schmitz, F., DiGiovanna, J., van den Brand, R., Bloch, J., Detemple, P., Lacour, S.P., Bézard, E., Micera, S., & Courtine, G. (2016) Spatiotemporal neuromodulation therapies engaging muscle synergies improve motor control after spinal cord injury. *Nat. Med.*, **22**, 138–145.
- Wewetzer, K., Grothe, C., & Claus, P. (2001) In vitro expression and regulation of ciliary neurotrophic factor and its alpha receptor subunit in neonatal rat olfactory ensheathing cells. *Neurosci. Lett.*, **306**, 165–168.
- Wilcox, J.T., Cadotte, D., & Fehlings, M.G. (2012) Spinal cord clinical trials and the role for bioengineering. *Neurosci. Lett.*, **519**, 93–102.
- Williams, P.R., Marincu, B.-N., Sorbara, C.D., Mahler, C.F., Schumacher, A.-M., Griesbeck, O., Kerschensteiner, M., & Misgeld, T. (2014) A recoverable state of axon injury persists for hours after spinal cord contusion in vivo. *Nat. Commun.*, **5**, 5683.
- Wilson, D.H. & Jagadeesh, P. (1976) Experimental regeneration in peripheral nerves and the spinal cord in laboratory animals exposed to a pulsed electromagnetic field. *Paraplegia*, **14**, 12–20.
- Witcher, M.R., Park, Y.D., Lee, M.R., Sharma, S., Harris, K.M., & Kirov, S.A. (2010) Three-Dimensional Relationships Between Perisynaptic Astroglia and Human Hippocampal Synapses. *Glia*, **58**, 572–587.
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Fallier-Becker, P., Noell, S., & Mack, A.F. (2011) Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **287**, 1–41.

- Wright, A.A., Todorovic, M., Murtaza, M., St John, J.A., & Ekberg, J.A. (2020) Macrophage migration inhibitory factor and its binding partner HTRA1 are expressed by olfactory ensheathing cells. *Mol. Cell. Neurosci.*, **102**, 103450.
- Wright, A.A., Todorovic, M., Tello-Velasquez, J., Rayfield, A.J., St John, J.A., & Ekberg, J.A. (2018) Enhancing the Therapeutic Potential of Olfactory Ensheathing Cells in Spinal Cord Repair Using Neurotrophins. *Cell Transplant.*, **27**, 867–878.
- Wu, B., Matic, D., Djogo, N., Szpotowicz, E., Schachner, M., & Jakovcevski, I. (2012) Improved regeneration after spinal cord injury in mice lacking functional T- and B-lymphocytes. *Exp. Neurol.*, **237**, 274–285.
- Wu, J., Stoica, B.A., Luo, T., Sabirzhanov, B., Zhao, Z., Guanciale, K., Nayar, S.K., Foss, C.A., Pomper, M.G., & Faden, A.I. (2014) Isolated spinal cord contusion in rats induces chronic brain neuroinflammation, neurodegeneration, and cognitive impairment. *Cell Cycle*, **13**, 2446–2458.
- Wu, J., Zhao, Z., Kumar, A., Lipinski, M.M., Loane, D.J., Stoica, B.A., & Faden, A.I. (2016) Endoplasmic Reticulum Stress and Disrupted Neurogenesis in the Brain Are Associated with Cognitive Impairment and Depressive-Like Behavior after Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma*, **33**, 1919–1935.
- Wu, J., Zhao, Z., Sabirzhanov, B., Stoica, B.A., Kumar, A., Luo, T., Skovira, J., & Faden, A.I. (2014) Spinal cord injury causes brain inflammation associated with cognitive and affective changes: role of cell cycle pathways. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, **34**, 10989–11006.
- Wu, T., Dejanovic, B., Gandham, V.D., Gogineni, A., Edmonds, R., Schauer, S., Srinivasan, K., Huntley, M.A., Wang, Y., Wang, T.-M., Hedeus, M., Barck, K.H., Stark, M., Ngu, H., Foreman, O., Meilandt, W.J., Elstrott, J., Chang, M.C., Hansen, D.V., Carano, R.A.D., Sheng, M., & Hanson, J.E. (2019) Complement C3 Is Activated in Human AD Brain and Is Required for Neurodegeneration in Mouse Models of Amyloidosis and Tauopathy. *Cell Rep.*, **28**, 2111–2123.e6.
- Wu, Y., Satkunendrarajah, K., Teng, Y., Chow, D.S.-L., Buttigieg, J., & Fehlings, M.G. (2013) Delayed post-injury administration of riluzole is neuroprotective in a preclinical rodent model of cervical spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, **30**, 441–452.
- Wynne, A.M., Henry, C.J., Huang, Y., Cleland, A., & Godbout, J.P. (2010) Protracted downregulation of CX3CR1 on microglia of aged mice after lipopolysaccharide challenge. *Brain. Behav. Immun.*, **24**, 1190–1201.
- Xu, L., Wang, J., Ding, Y., Wang, L., & Zhu, Y.-J. (2021) Current Knowledge of Microglia in Traumatic Spinal Cord Injury. *Front. Neurol.*, **12**, 796704.
- Yamagata, T., Muroya, K., Mukasa, T., Igarashi, H., Momoi, M., Tsukahara, T., Arahata, K., Kumagai, H., & Momoi, T. (1995) Hepatocyte Growth Factor Specifically Expressed in Microglia Activated RAS in the Neurons, Similar to the Action of Neurotrophic Factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **210**, 231–237.
- Yang, Y., Gozen, O., Watkins, A., Lorenzini, I., Lepore, A., Gao, Y., Vidensky, S., Brennan, J., Poulsen, D., Park, J.W., Jeon, N.L., Robinson, M.B., & Rothstein, J.D. (2009) Pre-synaptic regulation of astroglial excitatory neurotransmitter transporter GLT1. *Neuron*, **61**, 880–894.
- Yasui, K., Hashizume, Y., Yoshida, M., Kameyama, T., & Sobue, G. (1999) Age-related morphologic changes of the central canal of the human spinal cord. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **97**, 253–259.
- Ye, J., Qin, Y., Tang, Y., Ma, M., Wang, P., Huang, L., Yang, R., Chen, K., Chai, C., Wu, Y., & Shen, H. (2018) Methylprednisolone inhibits the proliferation of endogenous neural stem cells in nonhuman primates with spinal cord injury. *J. Neurosurg. Spine*, **29**, 199–207.
- Yirmiya, R., Rimmerman, N., & Reshef, R. (2015) Depression as a Microglial Disease. *Trends Neurosci.*, **38**, 637–658.

- Yoon, S.H., Shim, Y.S., Park, Y.H., Chung, J.K., Nam, J.H., Kim, M.O., Park, H.C., Park, S.R., Min, B.-H., Kim, E.Y., Choi, B.H., Park, H., & Ha, Y. (2007) Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial. *Stem Cells Dayt. Ohio*, **25**, 2066–2073.
- Young, K.M., Psachoulia, K., Tripathi, R.B., Dunn, S.-J., Cossell, L., Attwell, D., Tohyama, K., & Richardson, W.D. (2013) Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. *Neuron*, **77**, 873–885.
- Yu, W.R. & Fehlings, M.G. (2011) Fas/FasL-mediated apoptosis and inflammation are key features of acute human spinal cord injury: implications for translational, clinical application. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **122**, 747–761.
- Zarif, H., Nicolas, S., Guyot, M., Hosseiny, S., Lazzari, A., Canali, M.M., Cazareth, J., Brau, F., Golzné, V., Dourneau, E., Maillaut, M., Luci, C., Paquet, A., Lebrigand, K., Arguel, M.-J., Daoudlarian, D., Heurteaux, C., Glaichenhaus, N., Chabry, J., Guyon, A., & Petit-Paitel, A. (2018) CD8+ T cells are essential for the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. *Brain. Behav. Immun.*, **69**, 235–254.
- Zhan, Y., Paolicelli, R.C., Sforzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A.L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., & Gross, C.T. (2014) Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat. Neurosci.*, **17**, 400–406.
- Zhang, L., Berta, T., Xu, Z.-Z., Liu, T., Park, J.Y., & Ji, R.-R. (2011) TNF- α contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: Distinct role of TNF receptor subtype 1 and 2. *Pain*, **152**, 419–427.
- Zhang, L., Zhuang, X., Chen, Y., & Xia, H. (2019) Intravenous transplantation of olfactory bulb ensheathing cells for a spinal cord hemisection injury rat model. *Cell Transplant.*, **28**, 1585–1602.
- Zhang, L., Zhuang, X., Kotitalo, P., Keller, T., Krzyczmonik, A., Haaparanta-Solin, M., Solin, O., Forsback, S., Grönroos, T.J., Han, C., López-Picón, F.R., & Xia, H. (2021) Intravenous transplantation of olfactory ensheathing cells reduces neuroinflammation after spinal cord injury via interleukin-1 receptor antagonist. *Theranostics*, **11**, 1147–1161.
- Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S., & Li, P. (2020) Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *Int. J. Nanomedicine*, **15**, 6917–6934.
- Zhao, M., Choi, Y.-S., Obrietan, K., & Dudek, S.M. (2007) Synaptic Plasticity (and the Lack Thereof) in Hippocampal CA2 Neurons. *J. Neurosci.*, **27**, 12025–12032.
- Zhao, R.-R., Andrews, M.R., Wang, D., Warren, P., Gullo, M., Schnell, L., Schwab, M.E., & Fawcett, J.W. (2013) Combination treatment with anti-Nogo-A and chondroitinase ABC is more effective than single treatments at enhancing functional recovery after spinal cord injury. *Eur. J. Neurosci.*, **38**, 2946–2961.
- Zhou, X., He, X., & Ren, Y. (2014) Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. *Neural Regen. Res.*, **9**, 1787–1795.
- Zhou, X., Shi, G., Fan, B., Cheng, X., Zhang, X., Wang, X., Liu, S., Hao, Y., Wei, Z., Wang, L., & Feng, S. (2018) Polycaprolactone electrospun fiber scaffold loaded with iPSCs-NSCs and ASCs as a novel tissue engineering scaffold for the treatment of spinal cord injury. *Int. J. Nanomedicine*, **13**, 6265–6277.
- Zhou, X.-H., Ning, G.-Z., Feng, S.-Q., Kong, X.-H., Chen, J.-T., Zheng, Y.-F., Ban, D.-X., Liu, T., Li, H., & Wang, P. (2012) Transplantation of autologous activated Schwann cells in the treatment

- of spinal cord injury: six cases, more than five years of follow-up. *Cell Transplant.*, **21 Suppl 1**, S39-47.
- Zhou, Z., Peng, X., Insolera, R., Fink, D.J., & Mata, M. (2009) Interleukin-10 provides direct trophic support to neurons. *J. Neurochem.*, **110**, 1617–1627.
- Zlokovic, B.V. (2008) The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron*, **57**, 178–201.
- Zola-Morgan, S., Squire, L., & Amaral, D. (1986) Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J. Neurosci.*, **6**, 2950–2967.
- Zujovic, V., Benavides, J., Vigé, X., Carter, C., & Taupin, V. (2000) Fractalkine modulates TNF-alpha secretion and neurotoxicity induced by microglial activation. *Glia*, **29**, 305–315.



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}

Published online: 27 August 2020

© 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.

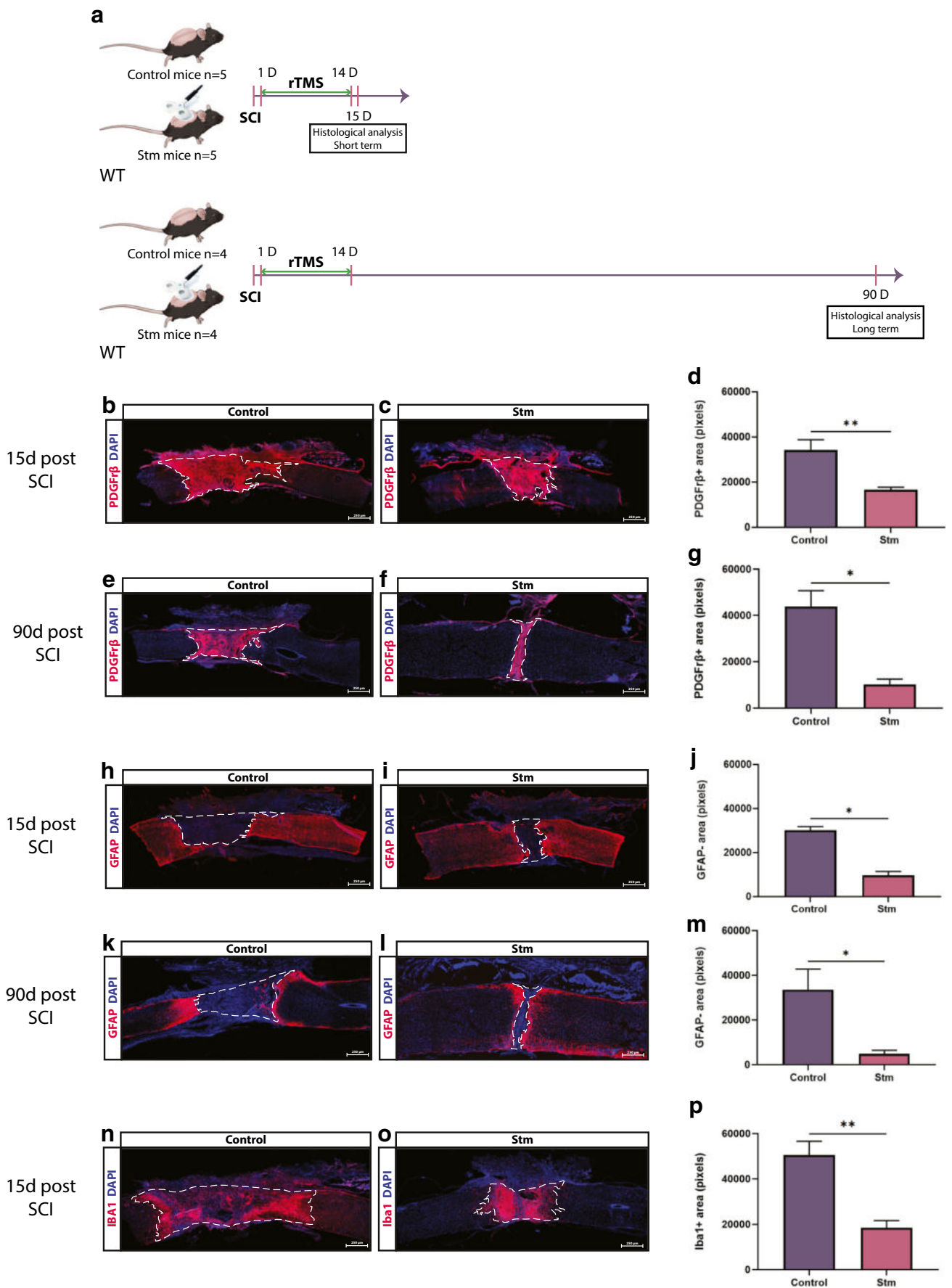
In Fig. 3, at day 15, mice were sacrificed, and proteomic analyses were performed.

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) Stm (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. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$



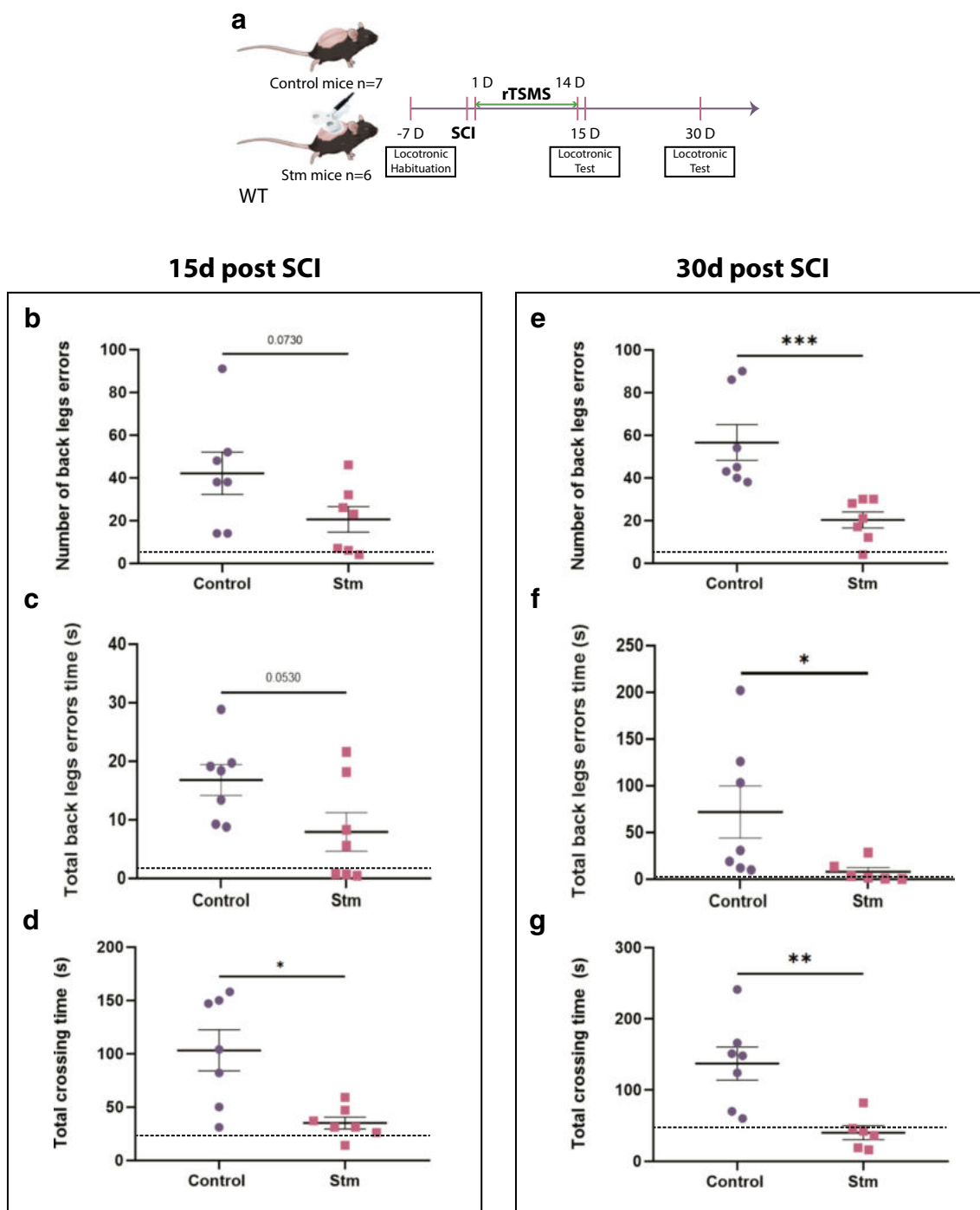


Fig. 2 rTSMs-based treatment enhances functional recovery. (A) Experimental design, SCIs were performed on mice (day 0), then half of the mice has been treated using rTSMs during 2 weeks (from day 1 to day 14). At day 15 and day 30, functional recovery was analyzed using locotronic test. (B–G) At days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

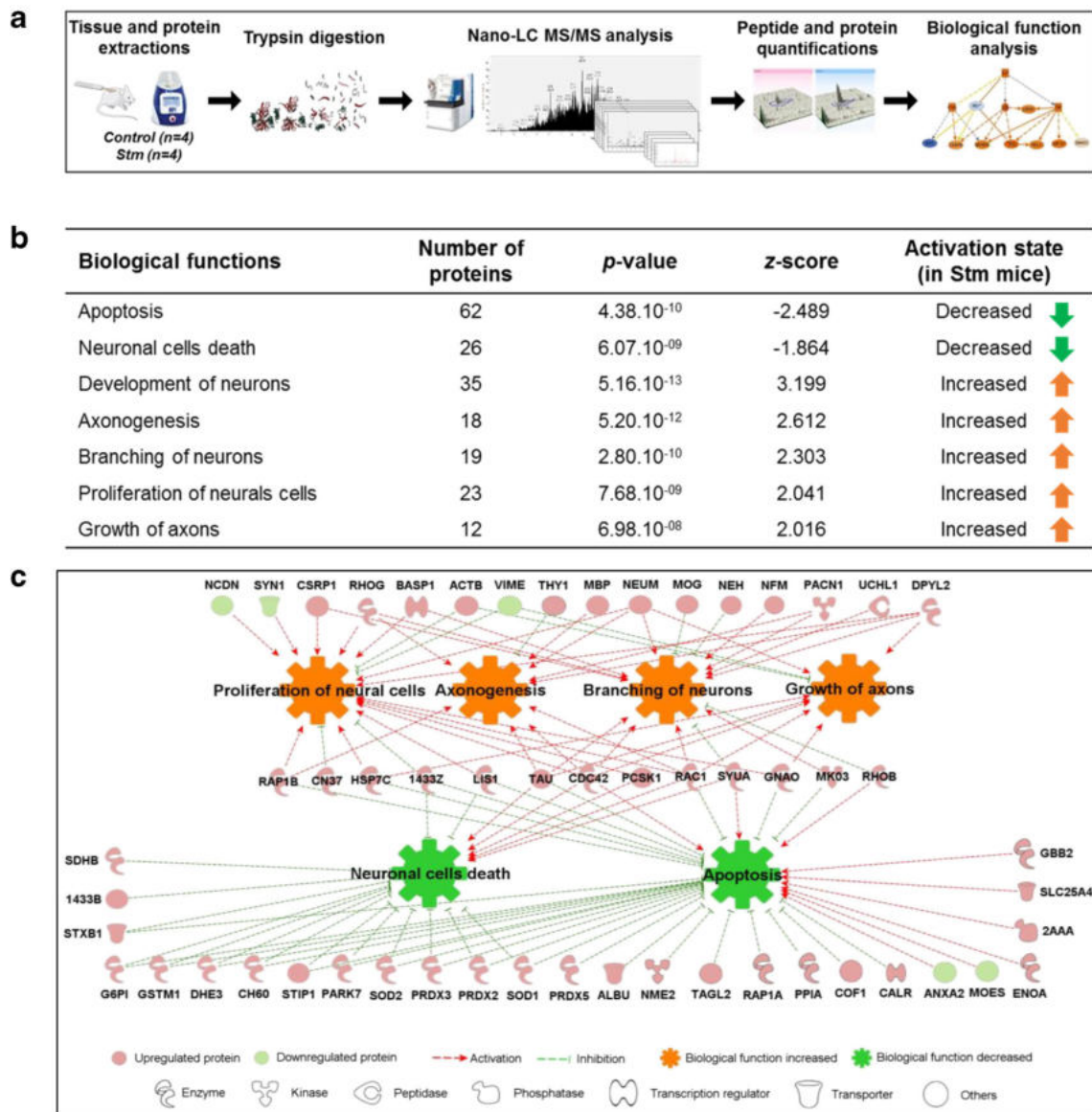


Fig. 3 rTSMS regulates functional protein synthesis and pathways. (A) Workflow for quantitative proteomics and data analyses of spinal cord tissue between stimulated (rTSMS treated) and control (SCI) mice. (B) Modulation of biological functions involved in neural development and cell death from differentially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

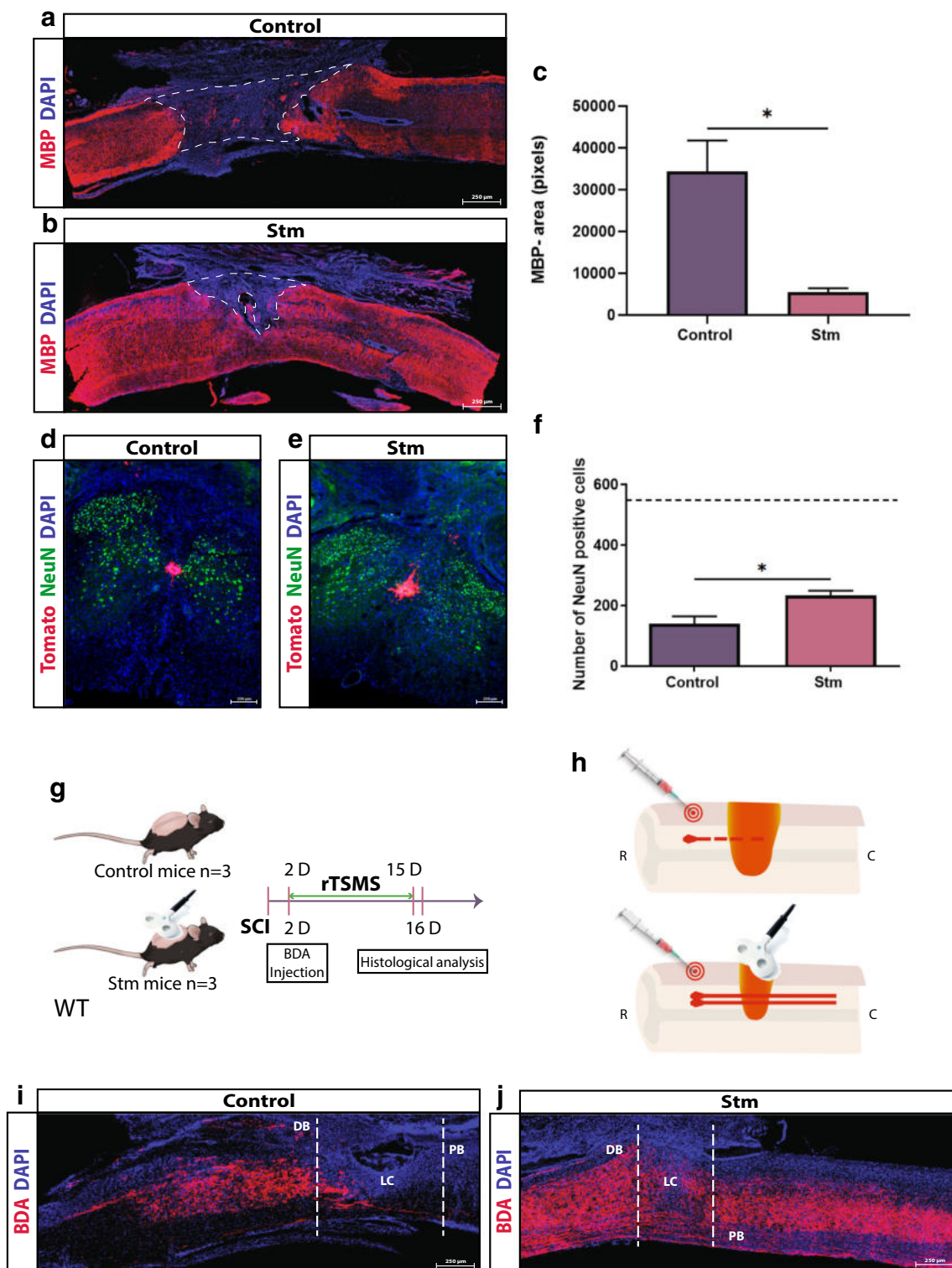
Analysis (IPA, Qiagen). Statistical significance is proposed through the calculation of *p* values and *z*-scores. (C) Functional regulatory effects of upregulated (red) or downregulated (green) proteins belonging to the different pathways associated to neural development and cell death (red arrows: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

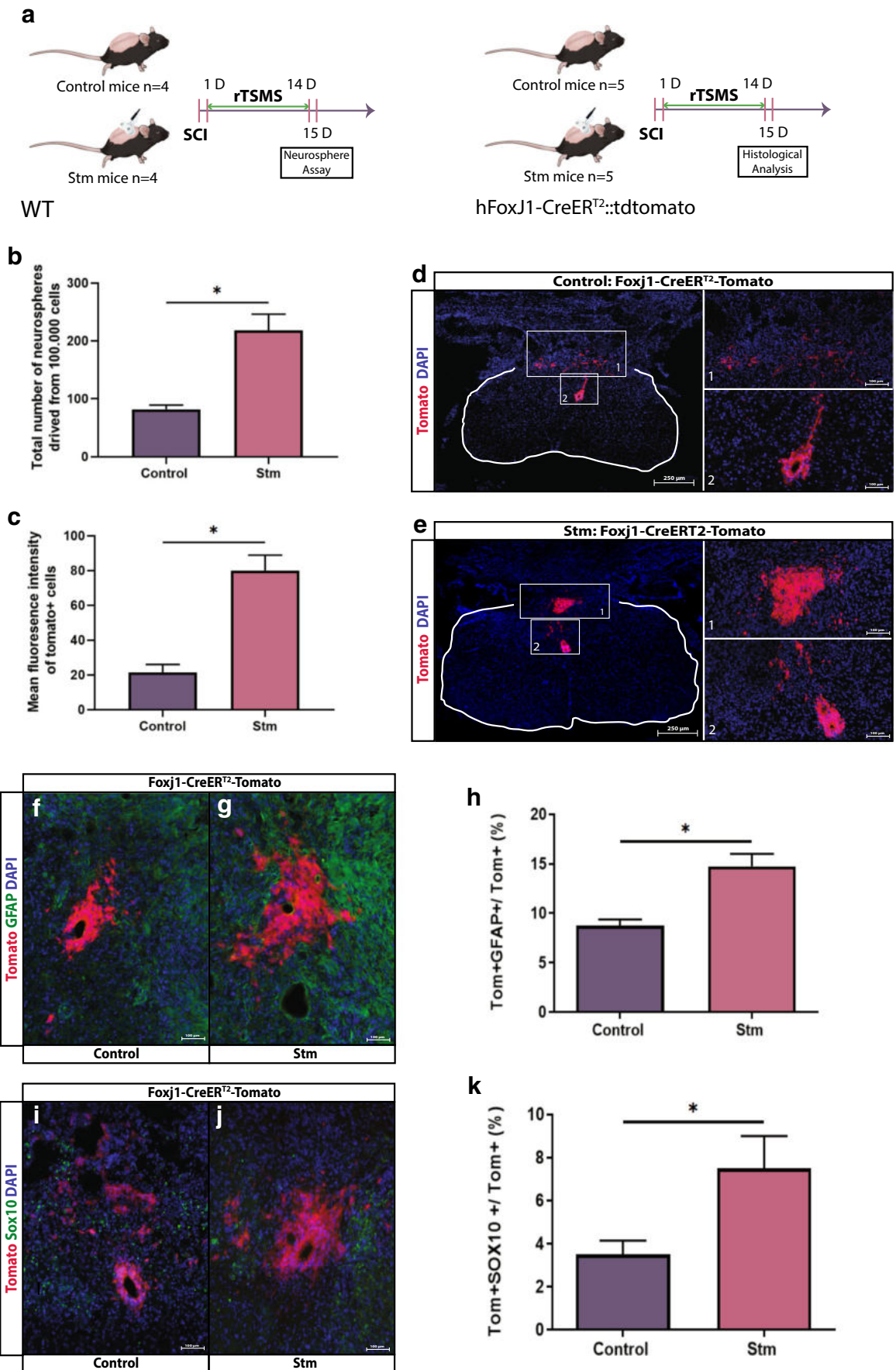
Immunohistochemistry

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

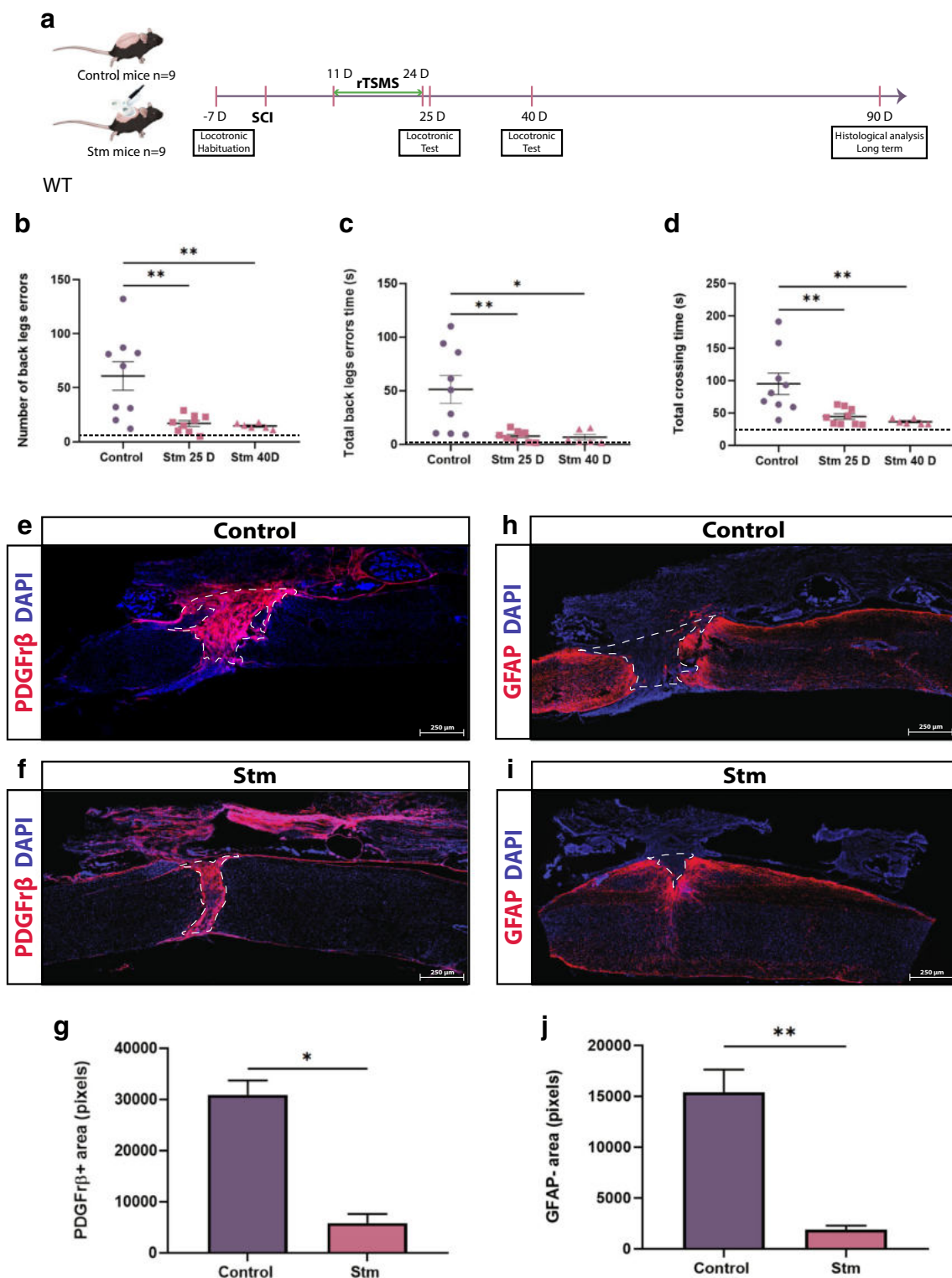
To estimate the injury site protein concentration for each extract, Bradford was performed according to the manufacturer's instructions (Biorad). The linear range for BSA standard was 0.1 to 1 mg/mL. The dilution of all samples was 1:20. Solubilization buffer was used as a negative control. Absorbance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

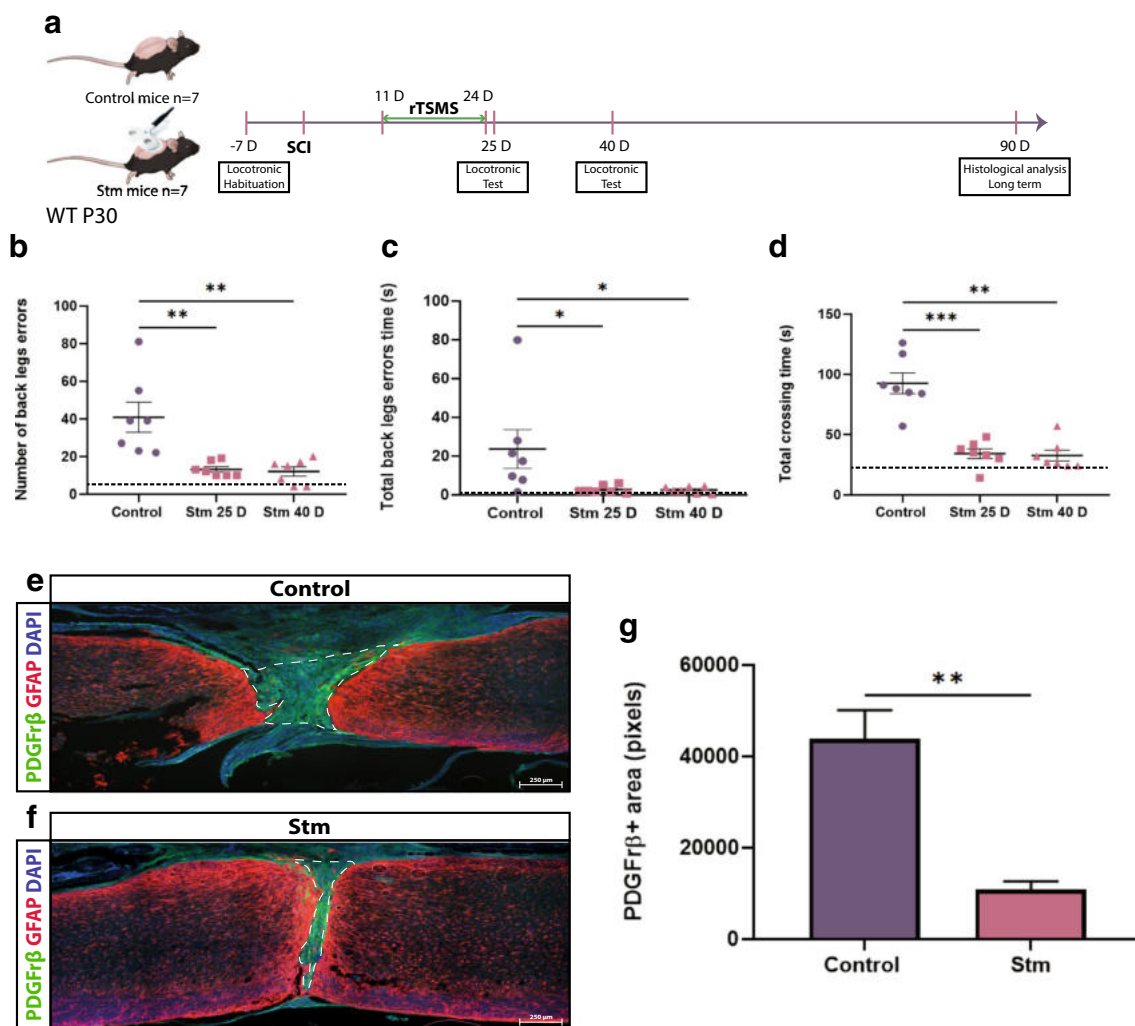


Fig. 7 rTSMs-based treatment enhances functional recovery and modulates scar formation in a chronic condition in juvenile mice. (A) Experimental design, SCIs were performed on mice (day 0), then 11 days after the same mice have been treated using rTSMs during 2 weeks (from day 11 to day 24). At day 25 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,

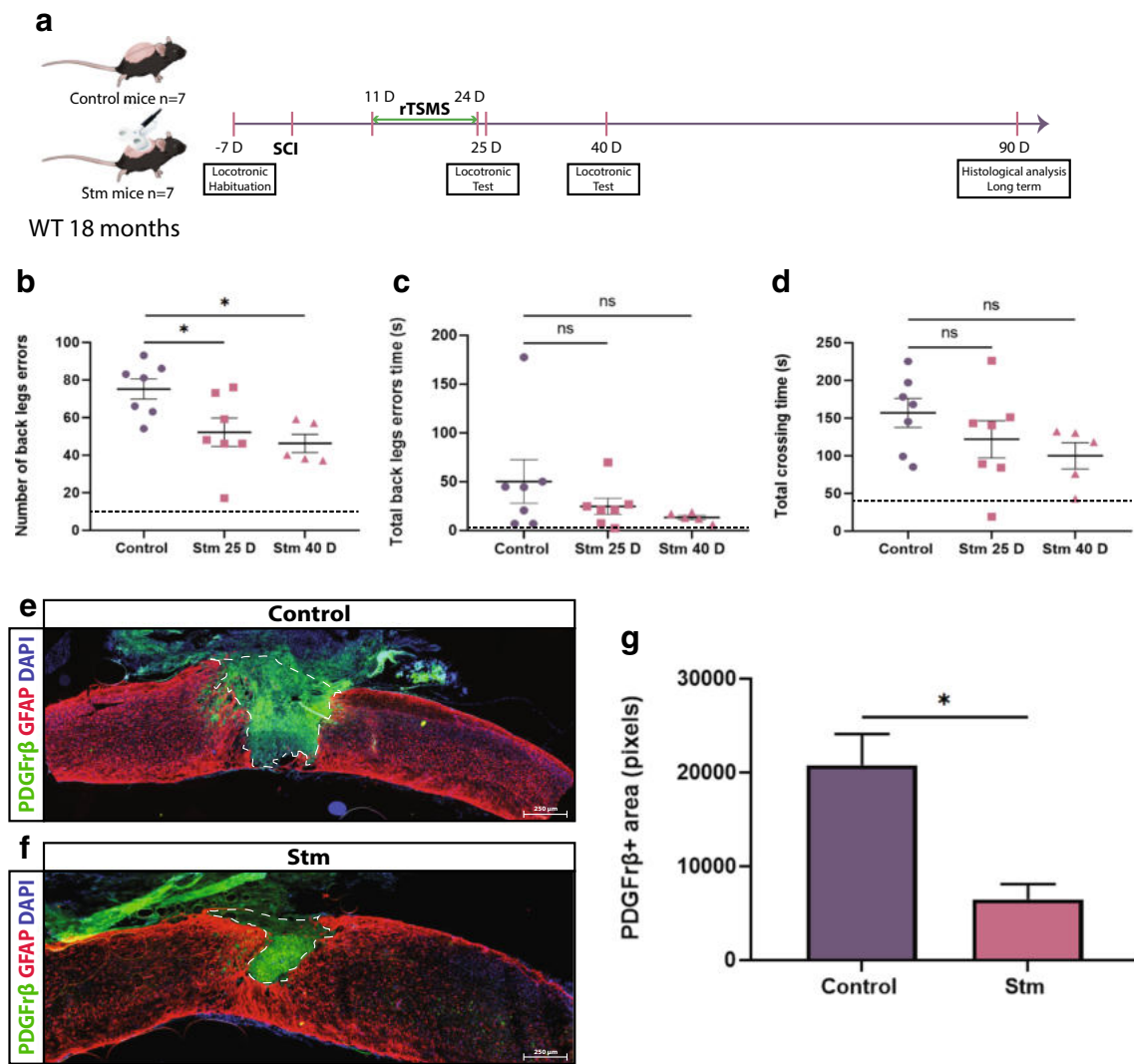


Fig. 8 rTSMs-based treatment enhances functional recovery and modulates scar formation in a chronic condition in aged mice. (A) Experimental design, SCIs were performed on mice (day 0), then 11 days after the same mice have been treated using rTSMs during 2 weeks (from day 11 to day 24). At days 25 and 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, Görz 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, Schwindt 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.

ANNEXE II

Spinal cord injury: can we repair spinal cord non-invasively by using magnetic stimulation?

Quentin Delarue, Chaima Chalfouh, Nicolas Guérout*

Spinal cord injury (SCI) is currently an incurable condition which induces sensorimotor impairments below the injury level. Mainly, SCI are the consequence of physical damages which occur on spinal cord due to traffic accidents or sports and recreation injuries. To date, nor treatment of therapy could be proposed to patients with SCI (Wilson et al., 2012).

Knowledge regarding the sequence of the basic cellular and molecular events which take place after SCI is now well documented. SCI causes axonal disruption, neuronal death, demyelination, release of myelin debris and massive microglial/macrophage reactivity. These primary events induce the formation of a scar which is composed of several cellular populations. Even if there are still some debates or speculations about the precise cellular origin of the main components of the scar, it is now admitted that the scar is composed of a fibrotic core which is surrounded by a glial scar (Sabelström et al., 2014). The fibrotic core exerts an inhibitory effect on axonal regrowth whereas the neighboring glial scar restricts the inflammation and secretes permissive molecules. Thereby, this new knowledge about the opposite and specific properties of the fibrotic and glial components of the scar has allowed considering spinal scar modulation as a potential therapy after SCI (Anderson et al., 2016; Dias et al., 2018).

This is in this context that we proposed to investigate the effects of repetitive magnetic stimulation (RMS) as a non-invasive therapy to modulate the spinal scar after SCI (Chalfouh et al., 2020). Indeed, RMS is a noninvasive form of nervous system stimulation which is already used clinically as treatment for some neuropsychiatric disorders even if the mechanisms behind its effects are still not fully understood. According to the size of the coils used, RMS induces a focal magnetic field allowing selectively stimulating neuronal populations in brain. In our study, we used RMS to specifically stimulate spinal cord at lesion site. To do so, figure of eight double coil was positioned in close contact to the back of the animals to induce trans-spinal magnetic stimulation (rTSMS). Our stimulation protocol was based on a 10-minute stimulation period during 14 consecutive days. First of all, as a proof of concept, we tested rTSMS on scar modulation after SCI. SCI were performed on mice, then, the day after SCI half of the mice were treated using rTSMS. In these mice, 15 days after SCI we performed histological analyses to investigate the spinal scar. In rTSMS treated animals the fibrotic core of

the scar was significantly decreased and at the opposite the glial scar was significantly increased 15 days after SCI. In order to confirm these results, based on the same lesion and stimulation paradigms, we performed histological analyses 90 days after SCI. Our results showed that rTSMS also induces scar modulation 90 days after SCI in decreasing fibrosis and enhancing gliosis (Chalfouh et al., 2020).

As described before, SCI induces sensorimotor impairments leading to the paralysis of the lower body including legs (called paraplegia) and/or the full body including arms and legs (called tetraplegia). That is why we tested the effects of rTSMS on sensorimotor functions. To do so, we used a foot misplacement apparatus which allows visualizing and recording the displacement of the mice into a flat ladder. These experiments reveal that rTSMS increases sensorimotor recovery in mice. Indeed, treated animals were able to cross the corridor faster with less hindlimb misplacements in comparison to the untreated mice (Chalfouh et al., 2020).

Before transferring this treatment to the clinic, it is of primary importance to validate it in a more clinically relevant context. In fact, the main causes of SCI are traumatic accidents. Thereby, rTSMS treatment could not be applied to paraplegic or tetraplegic patients the day after injury. In order to skirt around this issue, we have tested the effects of rTSMS in beginning the treatment 10 days after SCI. Based on this specific context, sensorimotor and histological experiments have been performed as described previously. Our results demonstrate that when rTSMS treatment is applied 10 days after SCI, it enhances functional recovery and modulates the spinal scar.

These promising results encouraged us to validate rTSMS treatment in the two categories of persons which are the more concerned by SCI: teenagers and elderly. SCI were performed on juvenile (post-natal 30 days) and elderly (18 months) mice and 10 days after they were treated using rTSMS. Our results show that rTSMS induces modulation in both juvenile and aged mice. It appears also, that rTSMS enhances strongly functional recovery in juvenile mice but moderately in aged mice (Chalfouh et al., 2020).

The precise mechanisms underlying RMS effects are not fully understood. In fact, it is mainly reported that RMS exerts its effects by stimulating or inhibiting neuronal action potential triggering. However, some recent studies have described that RMS can play

a direct role on other cellular populations (Cullen et al., 2019). That is why to better understand the precise mechanisms which are induced by rTSMS after SCI we performed proteomic analyses. These analyses reveal that rTSMS upregulates a large amount of proteins implicated in axonal regrowth and proliferation of neural cells and downregulates proteins implicated in apoptosis. Firstly, to validate these results, we performed histological analyses and BDA tract-tracing experiments 15 days after SCI. Our results confirm proteomic data by demonstrating that rTSMS increases axonal regrowth and neuronal survival. Secondly, we would to investigate the role that rTSMS could play on neural cell proliferation. To do so, we analyzed the proliferation and the reactivity of the endogenous spinal cord stem cells; ependymal cells, *in vitro* and *in vivo* respectively. Indeed, it has been described by several teams that ependymal cells constituted the endogenous spinal cord stem cell population (Barnabé-Heider et al., 2010). Based on neurosphere assay and fate mapping experiments, our analyses reveal, for the first time, that rTSMS increases stem cell self-renewal potential *in vitro* and enhances ependymal cells proliferation *in vivo* (Chalfouh et al., 2020). The main results of our study are summarized in **Figure 1**.

Nevertheless, even if our results are very promising, several questions remain unanswered. Indeed, it has been recently reported that after SCI, mice present some spontaneous recovery due to differentiation of oligodendrocyte precursors to Schwann cells like PO positive cells (Duncan et al., 2018). To date, this phenomenon has not been documented in humans after SCI.

Moreover, in our study we used a commercial stimulation coil which is already used in clinic. The size of the magnetic field generated is around 1.5 cm², meaning that in mice the anatomical zone stimulated is vertebral segments 3 to 4. Before transferring this therapy to humans, it is of primary importance to design a specific stimulation coil that can generate a magnetic field of 10 cm² allowing stimulating the lesion site and the uninjured neighboring parts of the spinal cord. Furthermore, in our study we did not try several patterns of stimulation. In fact, a recent paper as described the main role played by stimulation frequencies and patterns and demonstrated that these parameters are more important than the number of pulses *per se* (Dufor et al., 2019).

Another limitation of our study is the fact that the precise mechanisms implicated in the roles played by rTSMS in each cellular type are not clearly described. In effect, proteomic analyses revealed molecular pathways upregulated after rTSMS treatment such as axonal regrowth or downregulation such as apoptosis. Nevertheless, we do not know in which cells these pathways are specifically expressed. It could be very interesting to conduct for example single cell analysis to define precisely the molecular mechanisms involved in each cell type

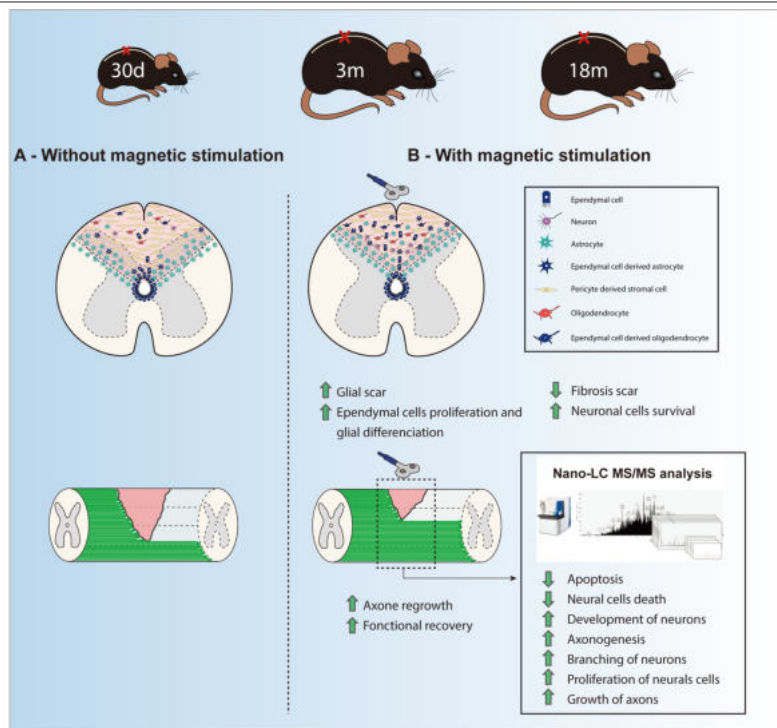


Figure 1 | Summary of the main results of the study of Chalfouh et al. (2020).
m: Month.

following rTSMs. Furthermore, we have conducted axonal tract tracing experiments showing that rTSMs induces a robust infiltration of BDA positive axons. However, our results could not determine if rTSMs promotes axonal regrowth or axonal survival. Further experiments should be conducted to define precisely the exact mechanisms involved during this process.

A last limitation of our work is the fact that we did not find the precise group of proteins or the specific receptor(s) by which rTSMs acts on the cells present into the spinal cord. In fact, in our study, rTSMs non-invasively modulates the spinal scar; however, we did not know precisely how rTSMs plays its role in the different cellular populations such as astrocytes, fibroblasts, oligodendrocyte precursors, neurons, microglia, or ependymal cells. A recent study describes the main role played by the protein cryptochrome as regulator of the effects of magnetic stimulation. Indeed, in a model of brain injury, the authors describe that cryptochrome acts as “cellular magnetoreceptor” and that the effects of magnetic stimulation are cryptochrome dependant (Dufor et al., 2019). It could be of primary interest to confirm the role played by this protein in the effects observed after rTSMs treatment.

Finally, it is important to compare rTSMs treatment and its effects with those described after other therapies. Different strategies have been already applied after SCI: cellular transplantation (Mayeur et al., 2013), virus injections to convert astrocytes into neurons for example (Chen et al., 2020), peripheral nerve grafts or biomaterials depots filled or not with neurotrophic factors (Anderson et al., 2018). It has been proven

that all of these strategies are effective and induce robust axonal regrowth and/or functional recovery. Nevertheless, they are invasive making them difficult to consider as future potential treatments after SCI in humans.

To conclude, recently, increasing knowledge regarding the spinal scar has offered new perspective about the possibility to treat SCI in modulating the endogenous cell populations. In particular, we hypothesized that modulation of specific cells such as, ependymal cells, pericytes or astrocytes, which constitute the different components of the spinal scar after SCI, can be seen respectively as keystones for future treatments. Such treatment opens the way for repairing the spinal cord non-invasively. Taking into account these different considerations, it appears that not only rTSMs but all non-invasive forms of nervous system stimulations constitute very promising strategies which should be further investigated.

This work was supported by ADIR association and IRME association. NG is supported by European Union and Normandie Regional Council. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Funds (ERDF).

Quentin Delarue, Chaima Chalfouh, Nicolas Guérout

Normandie Univ, Rouen, France; Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Rouen, France

*Correspondence to: Nicolas Guérout, PhD, nicolas.guerout@univ-rouen.fr
<https://orcid.org/0000-0003-0237-4981>
(Nicolas Guérout)

Date of submission: October 21, 2020
Date of decision: December 4, 2020
Date of acceptance: February 22, 2021
Date of web publication: April 23, 2021

<https://doi.org/10.4103/1673-5374.313033>

How to cite this article: Delarue Q, Chalfouh C, Guérout N (2021) Spinal cord injury: can we repair spinal cord non-invasively by using magnetic stimulation? *Neural Regen Res* 16(12):2429-2430.

Copyright license agreement: The Copyright License Agreement has been signed by all authors before publication.

Plagiarism check: Checked twice by iThenticate.

Peer review: Externally peer reviewed.

Open access statement: This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

Open peer reviewers: Sachchida Nand Nand Rai, University of Allahabad, India; Shalaka Mulherkar, Washington University in St Louis School of Medicine, USA.

Additional files: Open peer review reports 1 and 2.

References

- Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, O’Shea TM, Kawaguchi R, Coppola G, Khakh BS, Deming TJ, Sofroniew MV (2016) Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 532:195-200.
- Anderson MA, O’Shea TM, Burda JE, Ao Y, Barlately SL, Bernstein AM, Kim JH, James ND, Rogers A, Kato B, Wollenberg AL, Kawaguchi R, Coppola G, Wang C, Deming TJ, He Z, Courtine G, Sofroniew MV (2018) Required growth facilitators propel axon regeneration across complete spinal cord injury. *Nature* 561:396-400.
- Barnabé-Heider F, Göritz C, Sabelström H, Takebayashi H, Pfrieger FW, Meletis K, Frisén J (2010) Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell* 7:470-482.
- Chalfouh C, Guillou C, Hardouin J, Delarue Q, Li X, Duclos C, Schapman D, Marie JP, Cosette P, Guérout N (2020) The regenerative effect of trans-spinal magnetic stimulation after spinal cord injury: mechanisms and pathways underlying the effect. *Neurotherapeutics* 17:2069-2088
- Chen YC, Ma NX, Pei ZF, Wu Z, Do-Monte FH, Keefe S, Yellin E, Chen MS, Yin JC, Lee G, Minier-Toribio A, Hu Y, Bai YT, Lee K, Quirk GJ, Chen G (2020) A NeuroD1 AAV-based gene therapy for functional brain repair after ischemic injury through in vivo astrocyte-to-neuron conversion. *Mol Ther* 28:217-234.
- Cullen CL, Senesi M, Tang AD, Clutterbuck MT, Auderset L, O’Rourke ME, Rodger J, Young KM (2019) Low-intensity transcranial magnetic stimulation promotes the survival and maturation of newborn oligodendrocytes in the adult mouse brain. *Glia* 67:1462-1477.
- Dias DO, Kim H, Holl D, Werne Solnestam B, Lundberg J, Carlén M, Göritz C, Frisén J (2018) Reducing pericyte-derived scarring promotes recovery after spinal cord injury. *Cell* 173:153-165.e122.
- Dufor T, Grehl S, Tang AD, Doulazmi M (2019) Neural circuit repair by low-intensity magnetic stimulation requires cellular magnetoreceptors and specific stimulation patterns. *Sci Adv* 5:eaa99847.
- Duncan GJ, Manesh SB, Hilton BJ, Assinck P (2018) Locomotor recovery following contusive spinal cord injury does not require oligodendrocyte remyelination. *Nat Commun* 9:3066.
- Mayeur A, Duclos C, Honoré A, Gauberti M, Drouot L, do Rego JC, Bon-Mardion N, Jean L, Vêrin E, Emery E, Lemarchant S, Vivien D, Boyer O, Marie JP, Guérout N (2013) Potential of olfactory ensheathing cells from different sources for spinal cord repair. *PLoS One* 8:e62860.
- Sabelström H, Stenudd M, Frisén J (2014) Neural stem cells in the adult spinal cord. *Exp Neurol* 260:44-49.
- Wilson JR, Cadotte DW, Fehlings MG (2012) Clinical predictors of neurological outcome, functional status, and survival after traumatic spinal cord injury: a systematic review. *J Neurosurg Spine* 17:11-26.

P-Reviewers: Rai SNN, Mulherkar S; *C-Editors:* Zhao M, Liu WJ, Wang L; *T-Editor:* Jia Y

ANNEXE III

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.

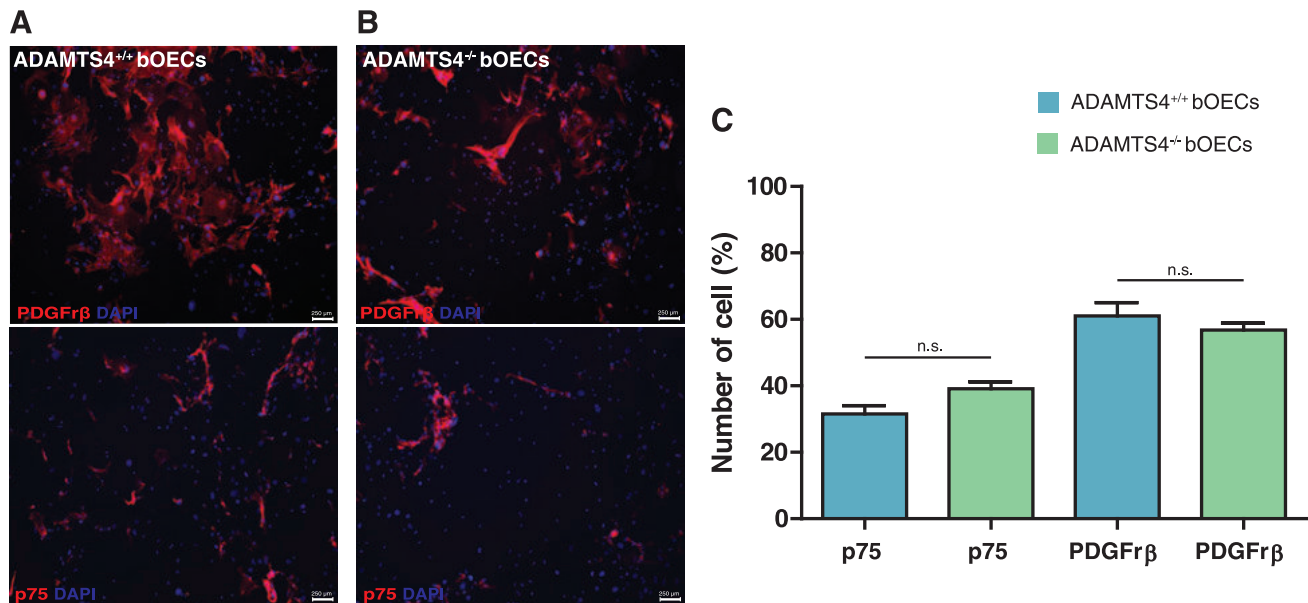


FIG. 1. Deletion of ADAMTS4 does not change the ratio between p75+ olfactory ensheathing cells (OECs) and PDGFRβ+ fibroblasts in primary boEC cultures. Immunohistochemistry of p75+ and PDGFRβ+ cells in (A) ADAMTS4^{+/+} and (B) ADAMTS4^{-/-} boECs primary cultures. (C) Quantification of the percentage 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

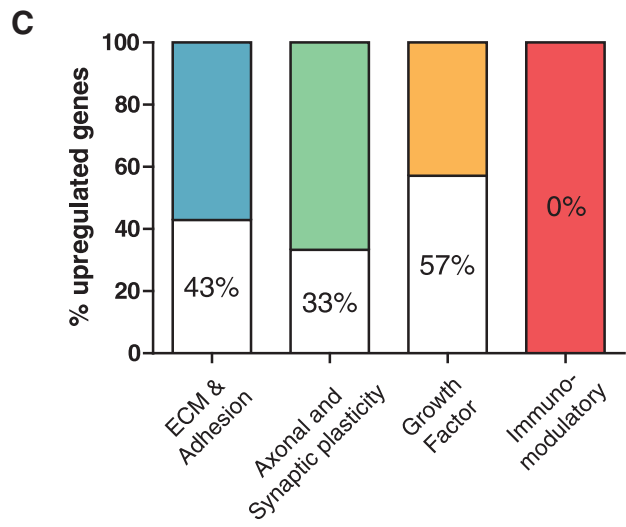
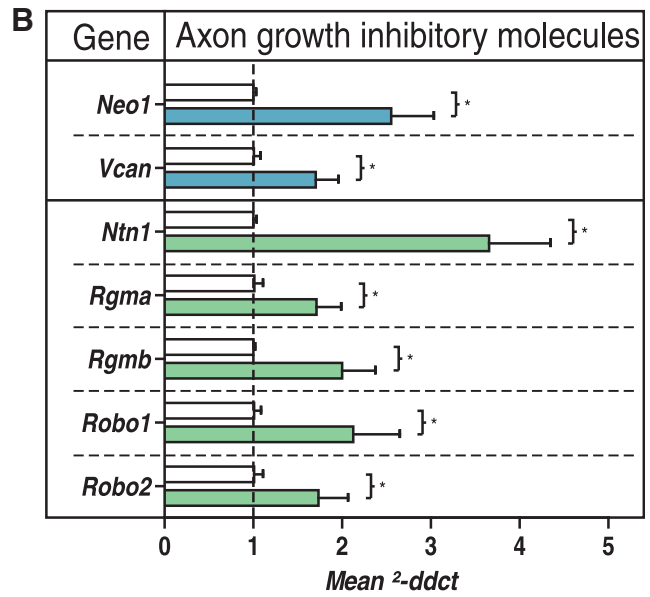
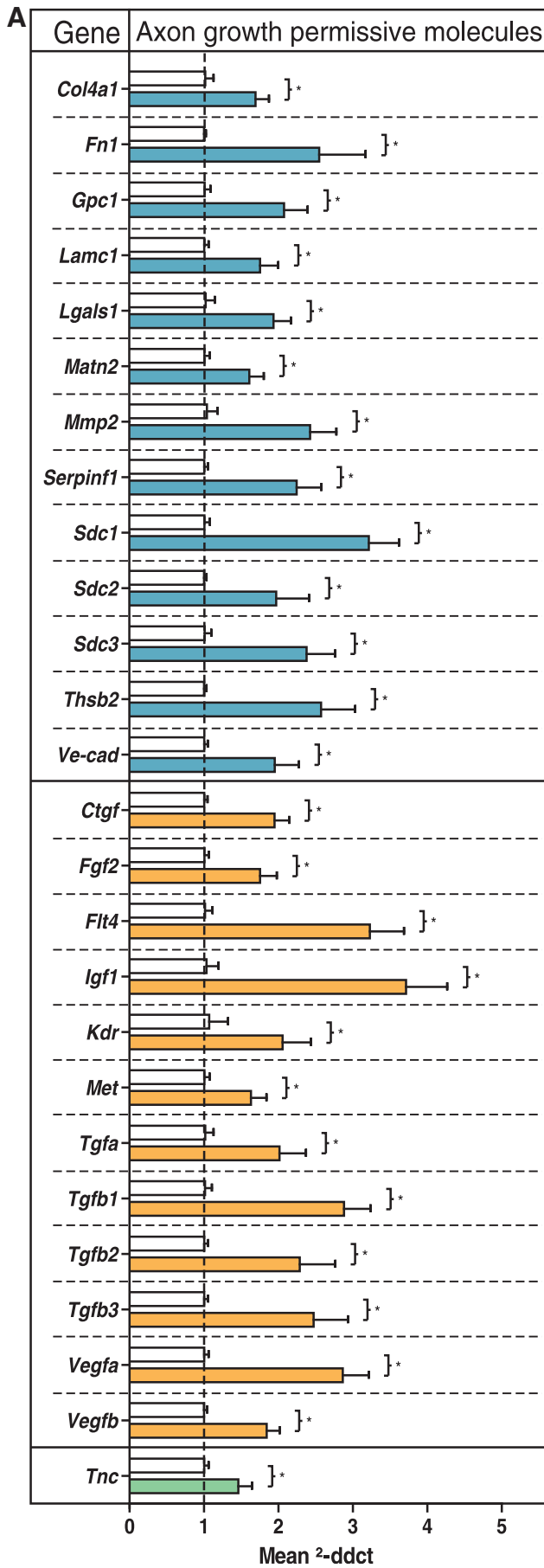
Animals

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.



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).

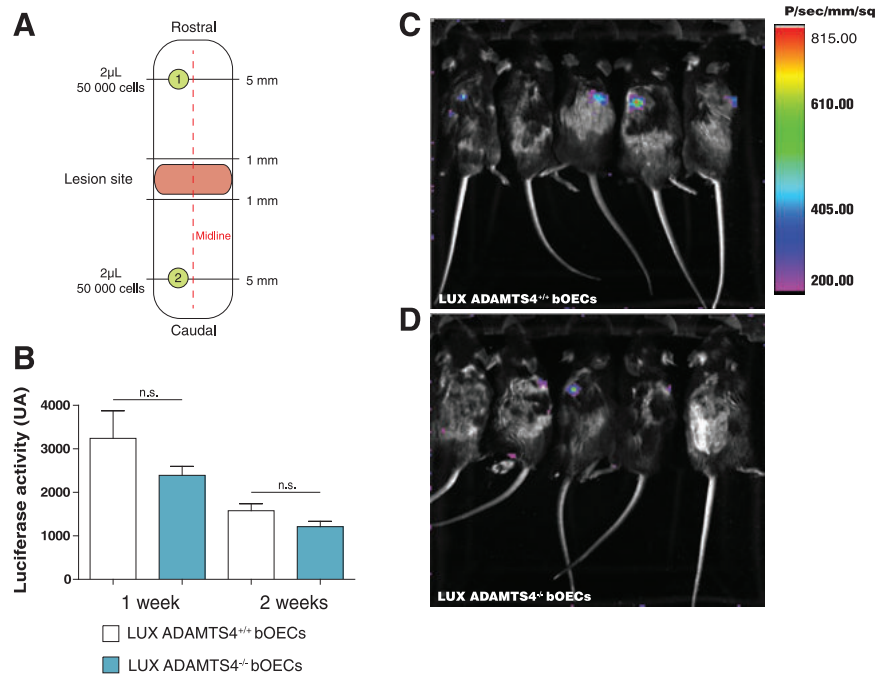


FIG. 3. Deletion of ADAMTS4 does not affect the survival of transplanted primary bOEC cultures cells after spinal cord injury (SCI). (A) Schematic representation of SCI model and bOECs injection protocol. (A) Representative images of (C) luciferase⁺ (LUX) \pm ADAMTS4^{+/+} and (D) luciferase⁺ ADAMTS4^{-/-} 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

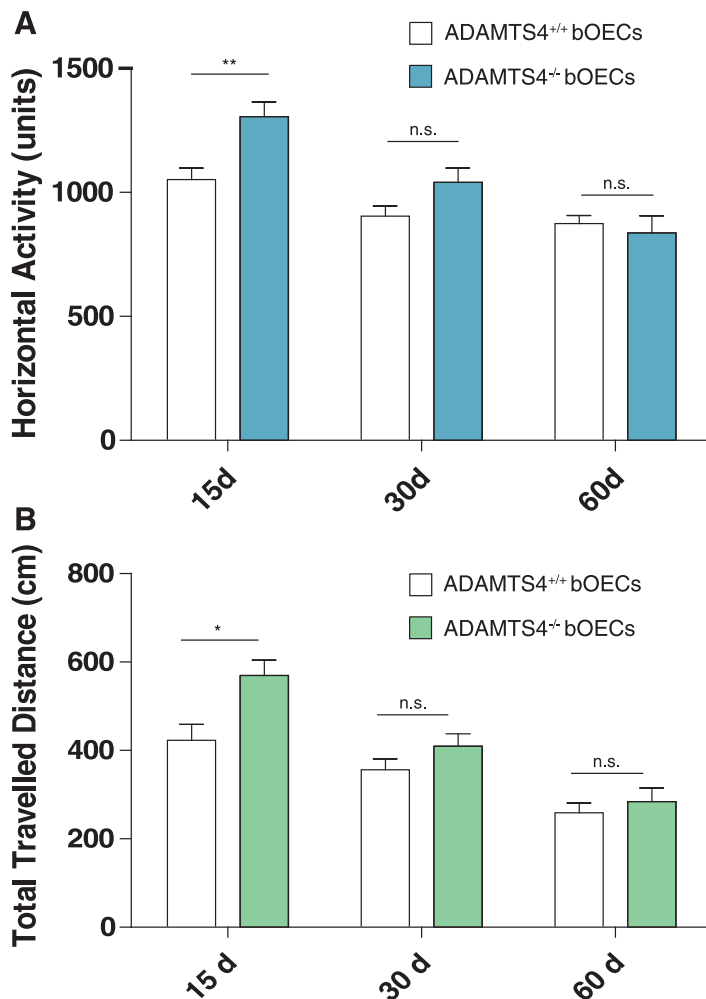
of ADAMTS4^{-/-} primary bOEC cultures induces earlier functional recovery (Fig. 4A, 4B). Indeed, horizontal activity and total distance traveled measurements indicate that 15 days after SCI and transplantation, ADAMTS4^{-/-} bOECs transplanted animals presented a significantly improved of these two 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



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-

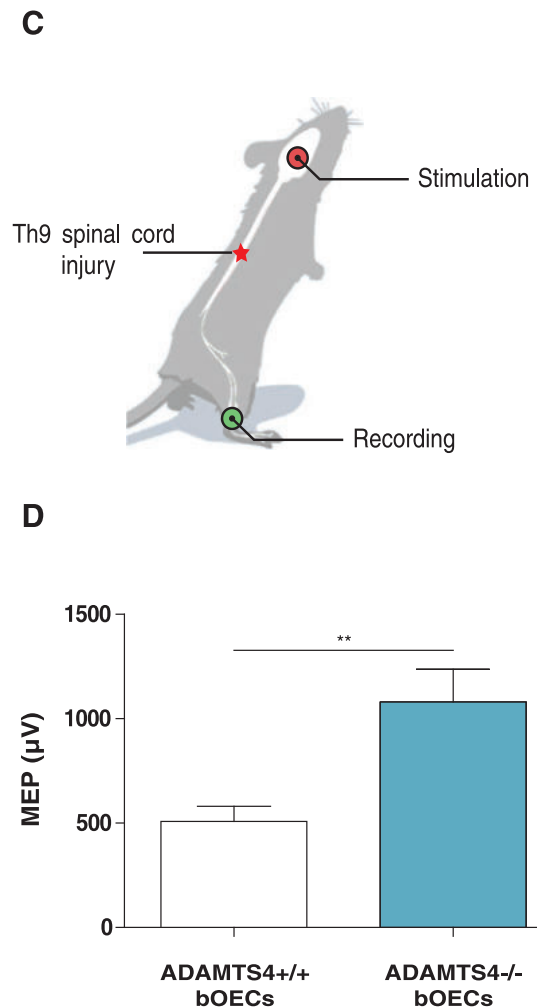


FIG. 4. Deletion of ADAMTS4 in primary bOEC cultures increases functional and electro physiological recoveries following spinal cord injury (SCI). Quantification of locomotor activities: (A) quantification of horizontal activity and (B) total distance traveled, 15, 30, and 60 days after SCI and transplantation 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.

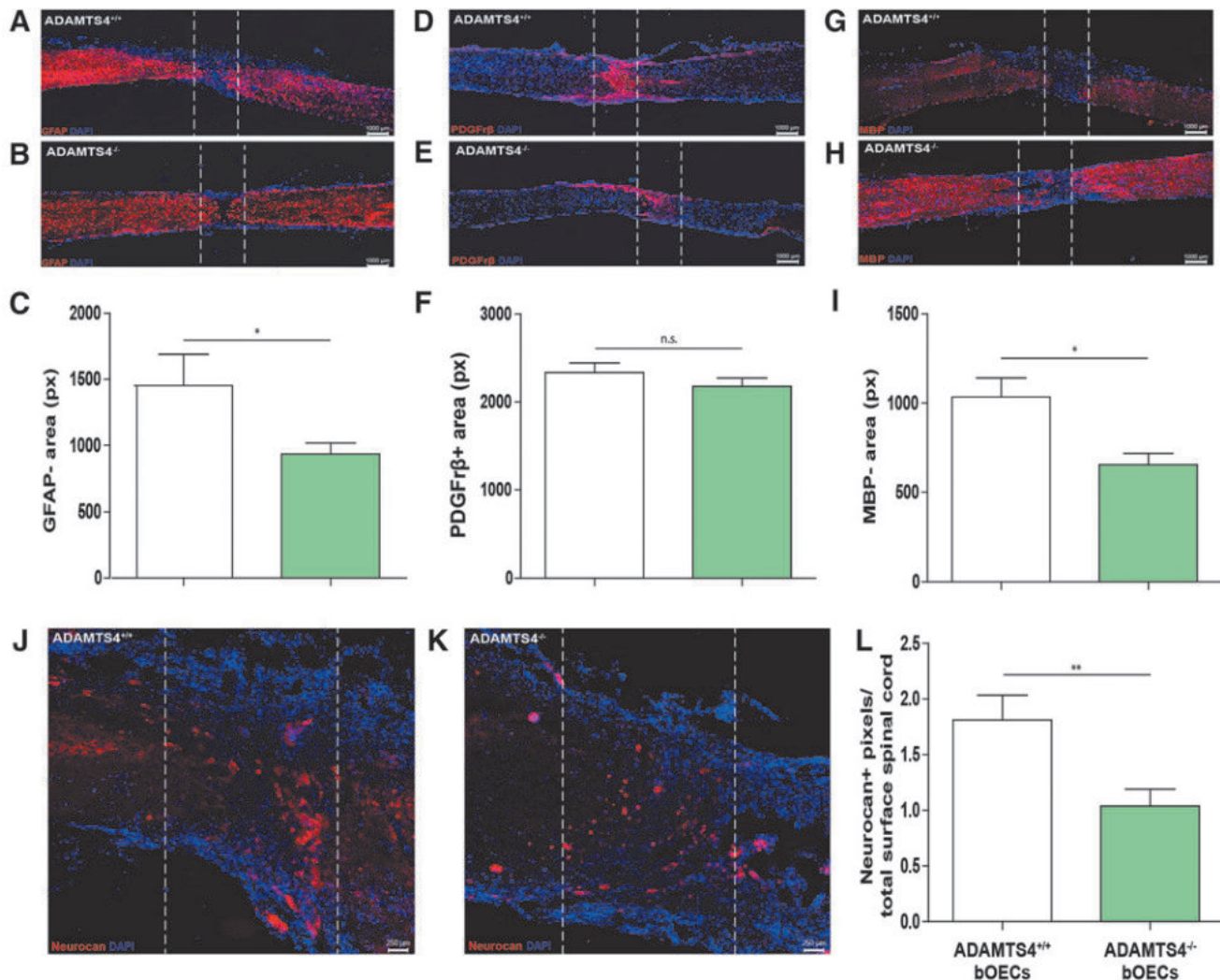


FIG. 5. Deletion of ADAMTS4 in primary bOEC cultures increases tissue repair following spinal cord injury (SCI). Representative pictures of sagittal spinal cord sections of (A, D, G, J) ADAMTS4^{+/+} and (B, E, H, K) ADAMTS4^{-/-} primary bOEC cultures transplanted animals 60 days after SCI and transplantation. 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

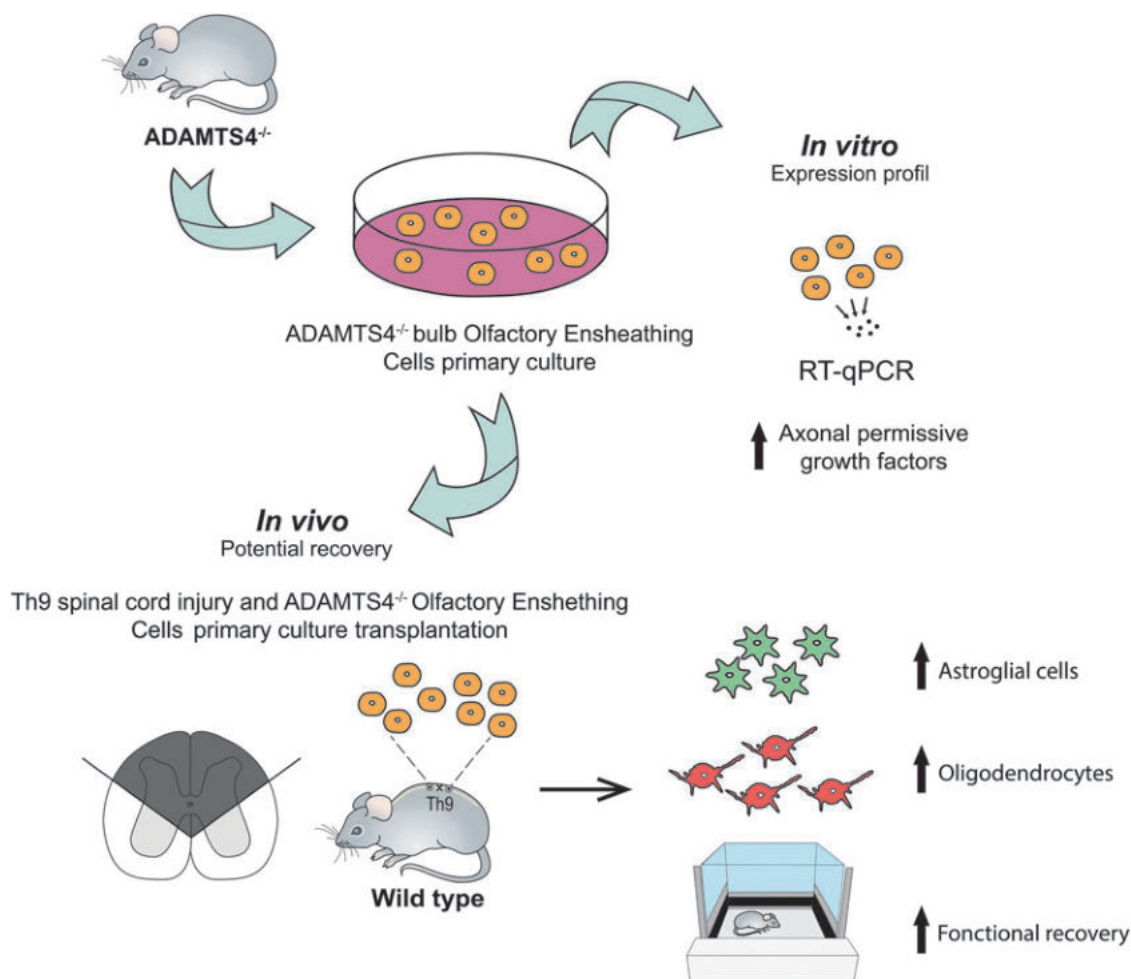


FIG. 6. Summary of the main results of the study. *In vitro*, primary bOEC cultures obtained from ADAMTS4^{-/-} mice express more axonal growth permissive molecules genes. These cells were transplanted into lesioned mice in a model of severe spinal cord injury performed at Th9 level. *In vivo*, transplantation 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., Woltenberg, 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 Guérout, PhD
Normandie University
UNIROUEN, EA3830-GRHV
76000 Rouen
France

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

Traumatic spinal cord injury: Etude of brain modifications and neuro-regenerative properties of olfactory glial cells

Spinal cord injury (SCI) is a devastating injury to the spinal cord that results in sensory-motor deficits in the organs innervated downstream of the injury. Currently, no curative treatment can be proposed to people suffering from SCI. Various approaches have been carried out in basic research, but few have led to a translational application in humans. Some of them are very promising, such as the transplantation of bulbar olfactory ensheathing cells (bOECs). Their study in various animal models of SCI has proven their ability to modulate the lesion environment and the medullary scar by activating ependymal cells. They induce neuronal survival and axonal regeneration by secreting a set of trophic factors and molecules permissive to axonal growth. They are also able to act on microglial cells by reducing their reactivity. However, their use in pre-clinical studies in humans shows heterogeneous effects. This can be explained by genetic and pathophysiological differences between animal and human models, differences in the protocol used or differences in the timing of the injection (acute or chronic phase). It is also possible to highlight an important difference. In animal models, the cells are taken from a healthy donor animal, whereas in humans, transplants are autologous, i.e. the cells are taken from the medullo-injured patient. The characterization of molecular and cellular perturbations in the peripheral organs and in the brain, raised the hypothesis that the cells recovered from a traumatized organism, can modify the therapeutic effects of these cells and reduce the functional recovery of the patients. We therefore performed transplantation of bOECs, from healthy (bOECs H) or medullo-injured (bOECs I) animals, into mice after MTL. Analysis of sensory-motor performance and tissues by immunohistochemistry confirmed the hypothesis. The animals that received bOECs I show a poorer functional recovery, greater medullary scarring, greater microglial reactivity and increased neurodegeneration, associated with the destabilization of PNN in the acute phase. The decrease in therapeutic capacities can be explained by the difference in mRNA expression of trophic factors and molecules involved in the inflammatory response, the modulation of the extracellular matrix or axonal growth, between bOECs H and bOECs I.

A question then arose, can we reduce the cerebral reactivity by applying a medullary therapy?

In order to validate that spinal cord therapy can act on brain tissue, we transplanted H bOECs after SCI and analyzed the cognitive performance and hippocampus of the animals. While SCI decreases neurogenesis, neuronal density and memory of the animals, transplantation of bOECs H limited brain reactivity and improved cognitive recovery. Therefore, the development of an applicable therapy after SCI that allows the harvesting of nonreactive olfactory bulbs a few days after SCI is needed.

The rTSMS is a non-invasive, painless therapy with no known side effects. Applied after SCI it stimulates tissue regeneration and functional recovery in mice and rats. It can be used just after the injury and brings impressive therapeutic effects in animals. Its use beforehand for two weeks, before the removal of the olfactory bulbs, could then allow the provision of an effective therapeutic mixture for both the spinal cord and the brain.

Key words: Traumatic SCI, olfactory ensheathing cells, cognition, microglial cells and inflammation

Lésion médullaire traumatique : Etude des modifications cérébrales et des propriétés neuro-régénératives des cellules gliales olfactives

Les lésions médullaires traumatiques (LMT) sont des atteintes dévastatrices de la moelle spinale entraînant un déficit sensori-moteur des organes innervés en aval de la lésion. Actuellement aucun traitement curatif ne peut être proposé aux personnes souffrant d'une LMT. Diverses approches ont été réalisées en recherche fondamentale mais peu ont permis une application translationnelle chez l'Homme. Certaines suscitent un grand espoir, comme la transplantation de cellules gliales olfactives d'origines bulbaires (bCGOs). Son étude dans divers modèles animaux de LMTs a prouvé leurs capacités à moduler l'environnement lésionnel et la cicatrice médullaire par l'activation des cellules épendymaires. Elles induisent la survie neuronale et la régénération axonale en sécrétant un ensemble de facteurs trophiques et de molécules permissives à la croissance axonale. Elles sont aussi capables d'agir sur les cellules microgliales en réduisant leurs réactivités. Cependant, leurs utilisations dans des études pré-cliniques chez l'Homme, montre des effets hétérogènes. Cela peut être expliqué par les différences génétiques et physiopathologiques entre les modèles animaux et les humains, des différences de protocoles utilisés ou encore par des différences quant au moment de l'injection (phase aiguë ou chronique). Il est aussi possible de mettre en avant une différence importante. Dans les modèles animaux, les cellules sont prélevées sur un animal donneur sain alors que chez l'Homme, les transplantations sont autologues, c'est-à-dire que les cellules sont prélevées sur le patient médullo-lésé. La caractérisation de perturbation moléculaire et cellulaire dans les organes périphériques et dans le cerveau, soulève l'hypothèse que les cellules récupérées sur un organisme traumatisé, peut modifier les effets thérapeutiques de ces cellules et réduire la récupération fonctionnelle des patients. Nous avons donc réalisé des transplantations de bCGOs, provenant d'animaux sains (bCGOs H) ou médullo-lésés (bCGOs I), chez des souris après la LMT. L'analyse des performances sensori-motrices et des tissus par immunohistochimie, confirme l'hypothèse. Les animaux ayant reçu les bOECs I montrent une moins bonne récupération fonctionnelle, une plus grande cicatrice médullaire, une réactivité microgliale plus importante et une neurodégénérescence augmentée, associée à la déstabilisation du PNN en phase aiguë. La diminution des capacités thérapeutiques s'expliquent par la différence de l'expression d'ARNm de facteurs trophiques et de molécules impliquées dans la réponse inflammatoire, la modulation de la matrice extracellulaire ou encore la croissance axonale, entre les bOECs H et les bOECs I.

Une question s'est alors posée, peut-on réduire la réactivité cérébrale en appliquant une thérapie médullaire ?

Afin de valider qu'une thérapie médullaire peut agir sur le tissu cérébral, nous avons transplanté des bCGOs H après la LMT et analysé les performances cognitives ainsi que l'hippocampe des animaux. Alors que la LMT diminue la neurogenèse, la densité neuronale et la mémoire des animaux, la transplantation des bCGOs H a permis de limiter la réactivité cérébrale et d'améliorer la récupération cognitive. Le développement d'une thérapie applicable après la LMT permettant le prélèvement de bulbes olfactifs non réactifs quelques jours après la LMT est donc nécessaire. La rTSMS est une thérapie non invasive, indolore et sans effets secondaires connus. Appliquée après la LMT elle stimule la régénération tissulaire et la récupération fonctionnelle chez la souris et le rat. Utilisable juste après la lésion et apportant des effets thérapeutiques chez l'animal impressionnant, son utilisation préalablement pendant deux semaines, avant le prélèvement des bulbes olfactifs, pourrait alors permettre l'apport d'une thérapie efficace aussi bien pour la moelle spinale que le cerveau.

Mots clés : Lésion médullaire traumatiques, cellules gliales olfactives, cognition, cellules microgliales et inflammation