



HAL
open science

L'épendyme : une nouvelle cible dans les maladies neuroinflammatoires ?

Maxime Bigotte

► **To cite this version:**

Maxime Bigotte. L'épendyme : une nouvelle cible dans les maladies neuroinflammatoires?. Neurosciences. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSE1119 . tel-04167042

HAL Id: tel-04167042

<https://theses.hal.science/tel-04167042>

Submitted on 20 Jul 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.



N°d'ordre NNT : 2022LYSE1119

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 476
Neurosciences et Cognition

Spécialité de doctorat : Neurosciences
Discipline : Neuroimmunologie

Soutenue publiquement le 29/06/2022, par :

Maxime Bigotte

**L'épendyme : une nouvelle cible dans la
Neuromyéélite Optique ?**

Devant le jury composé de :

Spassky, Nathalie, Directrice de Recherche – Université Paris Sciences et Lettres : Rapportrice

Stankoff, Bruno, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université Sorbonne : Rapporteur

Michel, Laure, Maître de Conférence – Praticien Hospitalier, Université de Rennes 1 : Examinatrice

Raineteau, Olivier, Directeur de Recherche, Université Claude Bernard Lyon 1 : Examineur

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

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

Remerciements

Mes remerciements s'adressent tout d'abord aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à Nathalie Spassky et Bruno Stankoff d'avoir accepté d'être rapporteurs et merci aux examinateurs Laure Michel, Olivier Raineteau et Sandra Vukusic. J'aimerais remercier particulièrement Nathalie pour ses conseils pour la dissection et le marquage des wholemounts et Olivier pour m'avoir guidé sur l'analyse transcriptomique.

Mes remerciements s'adressent ensuite au Pr. Romain Marignier qui m'a encadré depuis mon stage de Master 2. Merci de m'avoir guidé avec beaucoup d'enthousiasme sur la construction et la réalisation de ce projet. Merci de m'avoir poussé à présenter régulièrement aux journal club et aux nombreux congrès auquel j'ai participé pendant ma thèse. Merci de m'avoir accordé cette confiance et cette autonomie, j'ai énormément appris durant toutes ces années.

Je voudrais remercier mes collègues de la team NMO. Tout d'abord, merci Chloé pour m'avoir guidé et supporté pendant mon stage de Master 2 et au début de ma thèse, tu as été un exemple à suivre pour moi. Un grand merci à Pascale pour tes précieux conseils, tes idées et ton enthousiasme à toute épreuve. Merci Aseel d'avoir été présente avec moi dans le bureau, pour ces discussions, pour ta bonne humeur et ton aide avec les manipes. C'était génial de partager le bureau avec toi. Merci à Anne Ruiz pour tes conseils et ton aide, c'était stimulant de mettre au point des manipes avec toi. Merci également aux étudiantes Marie et Adamantia que j'ai pris plaisir à encadrer pendant leur stage. Merci à Justine pour ton aide précieuse avec les IRM. Merci à Mathilde et Jade pour votre aide au quotidien et avec les tests. Et merci à Ludivine pour ta disponibilité et ton efficacité.

Ensuite, je voudrais remercier les membres de l'équipe FORGETTING. Merci Paul pour tes idées et ton aide avec le protocole d'ependymal flow assay. Merci Gaël pour ton aide sur les communications scientifiques. Merci à tous les deux pour votre soutien sur les articles et pour vos conseils pour la suite. Un grand merci à Leslie pour ton aide avec les chirurgies, tu as un savoir-faire extraordinaire.

Merci aux membres de mon CSID Olivier Pascual et Olivier Raineteau d'avoir guidé mon travail de thèse, pour vos conseils et vos idées.

Un grand merci aux étudiants de SLEEP/FORGETTING pour ces grands moments de tarots. Merci à toute la team des anciens (et nouveaux) de Laënnec, CLIP et GENDEV avec qui nous

partagions les pauses café, les repas et des afterworks. J'ai vraiment apprécié mon quotidien au laboratoire avec vous. Merci Justine d'avoir relu mon manuscrit et corrigé toutes mes fautes.

Merci à la team Neuro'Apero et Student Club pour ces moments conviviaux entre étudiants et post-docs. J'ai beaucoup aimé organiser ces événements qui sont pour moi essentiels. Mention spéciale pour toi beber !

Merci à mes amis qui sont là depuis le master et avec qui j'ai partagé les galères de thésards. Merci pour toutes ces bières, ces soirées, ces week-ends, etc. (et ces goûters pendant le couvre-feu haha). Merci Jo pour ta maîtrise de l'art du MJ et du beerpong. Merci Valou pour tes bonnes adresses et ta joie de vivre malgré ton handicap. Tu es une véritable source d'inspiration et de motivation ! Merci Ines pour tes talents de poterie. Merci Cam pour tes expressions incroyables et les meilleures crêpes du monde. Merci Sté pour tes anecdotes dignes des plus grands reportages Arte. Merci Kass pour toutes les choses qu'on a partagées ensemble : les bières, les JDR, les Neuro'Apero, le club des cellules gliales, le confinement sur discord, etc. (la liste est longue !). J'espère qu'on continuera de partager nos galères après la thèse et que vous viendrez me voir au Canada. Force et honneur pour vos soutenance !

Merci à mes parents de m'avoir soutenu pendant toutes ces années d'études. J'espère que vous serez fier d'avoir un deuxième docteur Bigotte dans la famille. Merci à la famille et à mes amis du Nord, PM, Antoine et David, car chaque moment passé avec vous m'a permis de me ressourcer pour mieux continuer. Merci à mes cousines préférées Léa et Pauline d'être venues me voir à Lyon.

Et pour finir, il faut que je remercie tous les animaux qui ont participé à mes expériences, car c'est grâce à eux que la recherche avance.

Résumé en français

Mots clés : épendyme, neuromyéélite optique, auto-anticorps, aquaporine 4, cil, zone sous ventriculaire

La neuromyéélite optique (NMO) est une maladie auto-immune démyélinisante du système nerveux central caractérisée par la présence d'autoanticorps (IgG-NMO) ciblant l'aquaporine-4 (AQP4). L'AQP4 est exprimée par les astrocytes et la NMO est maintenant considérée comme une astrocytopathie. Mais l'AQP4 est aussi exprimée par l'épendyme et des patients NMO présentent des lésions périventriculaires. L'épendyme régule les échanges moléculaires entre le parenchyme et le liquide cérébrospinal (LCS), le flux du LCS et est une niche pour les cellules souches sous-ventriculaires.

L'objectif de ma thèse était d'examiner les effets des IgG-NMO sur l'épendyme.

J'ai exposé des cultures primaires de cellules épendymaires de rat et des explants de ventricules latéraux de rats adultes pendant 24 heures à des IgG de patients NMO purifiées (IgG-NMO). J'ai ensuite évalué l'effet du traitement par immunomarquage, analyse du flux épendymaire et séquençage ARN. J'ai utilisé comme contrôle des IgG de donneurs sains et des cellules non traitées.

Comparées aux conditions contrôles, les IgG-NMO ont induit : i) l'agglomération de l'AQP4, l'altération de l'expression de jonctions communicantes et un gonflement des cellules épendymaires ; ii) l'altération de l'orientation des corps basaux des cils et de la motilité ciliaire ; iii) la prolifération des cellules souches sous-ventriculaires ; et iv) l'uprégulation de l'expression de cytokines et chémokines pro-inflammatoires par les épendymocytes.

Les résultats de cette thèse montrent que les IgG-NMO induisent un phénotype réactif rapide et spécifique de l'épendyme et suggèrent un rôle clé de celui-ci dans la phase aiguë de la formation des lésions dans la NMO.

Résumé en anglais

Title: Ependyma: a new target in neuromyelitis optica?

Key words: ependyma, neuromyelitis optica, autoantibodies, aquaporin 4, cilia, subventricular zone

Neuromyelitis Optica (NMO) is an autoimmune demyelinating disease of the central nervous system characterized by the presence of autoantibodies (called NMO-IgG) targeting aquaporin-4 (AQP4). AQP4 is expressed at the perivascular foot processes of astrocytes, in the glia limitans but also at the ependyma. Most studies focused on studying the pathogenicity of NMO-IgG on astrocytes and NMO is now considered an astrocytopathy. However, periventricular lesions are observed in NMO suggesting that ependymal cells could also be targeted by NMO-IgG. Ependymal cells regulate cerebrospinal fluid (CSF)-parenchyma molecular exchanges, CSF flow and is a niche for subventricular neural stem cells.

The aim of my thesis was to examine the effect of antibodies from NMO patients on ependyma.

I exposed primary culture of rat ependymal cells and explant cultures of rat lateral ventricular wall wholemounts, to purified IgG from NMO patients (NMO-IgG) for 24 hours. I then evaluated the treatment effect using immunolabeling, ependymal flow analysis and bulk RNA sequencing. I used as controls purified IgG from healthy donors and non-treated cells.

Compared to control conditions, NMO-IgG induced: i) AQP4 agglomeration, gap junction expression alterations and cell enlargement; ii) ciliary basal bodies orientation and cilia motility impairments; iii) subventricular neural stem cells proliferation; and iv) pro-inflammatory cytokines and chemokines upregulation in the ependymocyte transcriptomic analysis.

The results of this thesis show that NMO-IgG can trigger an early and specific reactive phenotype in ependymal cells, suggesting a key role for ependymal cells in the early phase of NMO lesion formation.

Etablissement d'accueil

Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CRNL), INSERM U1028, CNRS UMR 5292, Université Claude Bernard Lyon 1, équipe FORGETTING, 95 boulevard Pinel, Centre Hospitalier Le Vinatier, Bâtiment 462 Michel Jovet, 69500 BRON.

Ce travail a été financé par une bourse accordée par la fondation ARSEP.



Table des matières

Table des matières	1
Préambule	5
Abréviations	7
INTRODUCTION	9
1. L'épendyme	11
a. Généralités	11
b. Origine et développement des cellules épendymaires	13
c. Rôles de l'épendyme	19
d. L'épendyme en conditions pathologiques	52
2. La neuromyéélite optique (NMO)	57
a. Généralités	57
b. Symptômes et diagnostic : de la maladie de Devic au spectre de la NMO	57
c. Physiopathologie du NMOSD à anti-AQP4	61
d. Origine de l'auto-immunité	69
e. Traitements	71
f. Vers une « épendymocytopathie » ?	72
Questions scientifiques posées et objectifs du projet	75
MATÉRIEL ET MÉTHODES	77
1. Patients et échantillons plasmatiques	79
2. Modèles d'étude de l'épendyme : généralités et présentation des techniques utilisées au laboratoire	81
a. Culture primaire de cellules épendymaires	81
b. Dissection des murs ventriculaires	83
3. Méthodes d'étude des effets à court terme des IgG-NMO sur l'épendyme par approche <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>	84
a. Immunomarquages	84
b. Analyse du flux épendymaire	85
c. Séquençage ARN et analyses bio-informatiques	86
d. Extraction d'ARN et qRT-PCR	86
4. Méthodes d'étude complémentaires des effets des IgG-NMO sur les modèles de culture et rats-NMO	87

a. Analyse des cellules souches sous-ventriculaire par cytométrie en flux	87
b. Méthode d'étude de l'effet des IgG-NMO à long terme sur l'épendyme <i>in vivo</i>	89
5. Analyses statistiques	92
RÉSULTATS PRINCIPAUX	93
1. Agglomération de l'AQP4 et gonflement des épendymocytes	95
2. Modification de l'expression des jonctions communicantes	95
3. Altération de la motilité et de la polarisation des cils.....	96
4. Activation de la zone sous-épendymaire	96
5. Réaction inflammatoire des épendymocytes	97
6. Conclusion	98
ARTICLE	99
Abstract.....	102
Introduction	103
Materials and methods	104
NMO patient and IgG purification	104
Primary culture of rat ependymocytes.....	104
Explant culture of adult rat lateral ventricular walls	105
Ependymal flow assay.....	105
Immunolabeling.....	106
Isolation of ependymal cells from primary cultures for RNA sequencing.....	107
RNA sequencing and bioinformatic analyses.....	107
RNA isolation and qRT-PCR	108
Statistical analyses.....	108
Data availability	109
Results	109
Purified IgG from NMO patients induce AQP4 expression alteration and cell enlargement in ependymal cells	109
Purified IgG from NMO patients induce alteration of gap junction expression in ependymal cells	111
Purified IgG from NMO patients induce ependymal cell cilia motility impairments and planar polarity disruption	112
Activation of subventricular neural stem cells proliferation after	114
Inflammatory response induced by purified IgG from NMO patients in ependymal cells	116
Discussion.....	117

Table des matières

Conclusion	121
Acknowledgements	121
Funding	121
Competing interests	121
References	122
Supplementary material	129
Supplementary materiel and methods.....	134
Binding of purified IgG from NMO patients on AQP4 expressed by ependymal cells.....	134
Flow cytometry	134
ANALYSES COMPLÉMENTAIRES ET RESULTATS PRÉLIMINAIRES	135
1. Compléments à l'analyse transcriptomique.....	137
2. Quantification des sous-populations de cellules souches de la V-SVZ en réponse aux IgG-NMO <i>ex vivo</i>	138
3. Effets des IgG-NMO à long terme <i>in vivo</i>	145
a. Analyse immunohistochimique	145
b. Analyse transcriptomique par séquençage ARN	150
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	151
1. Altération des fonctions épendymaires : vers une « épendymocytopathie ».....	153
a. Agglomération de l'AQP4 et gonflement cellulaire	153
b. Altération de la communication intercellulaire et déséquilibre ionique.....	155
c. Perturbation de l'activité des cils moteurs.....	157
d. Activation de la niche sous-ventriculaire	158
e. Réaction inflammatoire de l'épendyme.....	160
2. Rôles de l'épendyme dans la physiopathologie de la NMO.....	161
a. La route sang-LCS-parenchyme : une nouvelle entrée pour les IgG-NMO	161
b. Pourquoi certains patients ont des atteintes périventriculaires et d'autres non ?.....	163
c. Altérations du volume ventriculaire et de la circulation du LCS.....	164
3. Limites et perspectives	165
a. Limites.....	165
b. Perspectives	166
Bibliographie	170

Préambule

Lors de mon Master 2 Neurosciences Fondamentales et Cliniques en 2018, réalisé à l'université Claude Bernard Lyon 1, j'ai rejoint pour un stage de 5 mois le groupe du Pr. Romain Marignier au Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CRNL) pour étudier le rôle de l'épendyme dans la neuromyélie optique. C'est à la fin de ce stage que j'ai décroché une bourse doctorale ministérielle à Lyon 1 pour poursuivre ce travail.

Le groupe de recherche dirigé par le Pr. Romain Marignier, hébergé au CRNL dans l'équipe FORGETTING, étudie depuis de nombreuses années les pathologies auto-immunes démyélinisantes du système nerveux central. Une expertise particulière a été développée pour la neuromyélie optique (NMO), une pathologie rare apparentée à la sclérose en plaques. En étroite collaboration avec les Hospices Civils de Lyon (HCL) et le Centre de Ressources Biologiques (CRB) NeuroBioTec, nous disposons de prélèvements biologiques provenant de patients. Ces prélèvements biologiques sont ensuite utilisés dans des modèles *in vitro* et *in vivo* originaux afin d'étudier les mécanismes physiopathologiques de ces maladies auto-immunes, dont principalement la NMO.

La NMO est une maladie rare, auto-immune à auto-anticorps provoquant majoritairement des troubles visuels et moteurs très handicapants si la maladie n'est pas prise en charge rapidement. Ces auto-anticorps ciblent majoritairement l'aquaporine-4, le principal canal hydrique du système nerveux central, exprimé au niveau des pieds astrocytaires périvasculaires, de la glia limitans et aussi au niveau de l'épendyme. De nombreuses études ont permis de montrer que la NMO est une astrocytopathie. Cependant, plusieurs travaux suggèrent que l'épendyme pourrait être aussi touché. L'épendyme possède d'importantes fonctions biologiques et son ciblage pourrait entraîner des conséquences délétères. L'objectif de ma thèse a donc été d'évaluer les effets d'auto-anticorps de patients atteints de NMO sur l'épendyme et les fonctions qu'il régule, en utilisant des modèles d'études de l'épendyme que j'ai développés au laboratoire.

Je commencerai ce manuscrit par une description détaillée de l'épendyme et des fonctions biologiques qu'il régule. Je décrirai ensuite la NMO, ses symptômes et sa physiopathologie, avec un focus sur le rôle de l'épendyme dans celle-ci. Enfin, je présenterai les questions scientifiques, puis décrirai et discuterai des méthodes utilisées et des résultats obtenus.

Abréviations

ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
AQP4	<i>aquaporine 4</i>
AVC	<i>accident vasculaire cérébral</i>
BHE	<i>barrière hématoencéphalique</i>
BMP	<i>bone morphogenic protein</i>
CBF	<i>ciliary beat frequency</i>
CCL	<i>c-c motif chemokine ligand</i>
CE	<i>cellule épendymaire</i>
CNV	<i>copy number variations</i>
Cx	<i>connexine</i>
CXCL	<i>c-x-c motif chemokine ligand</i>
EAE	<i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
epSPC	<i>ependymal stem progenitor cell</i>
FT	<i>facteur de transcription</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GLT1	<i>glutamate transporter 1</i>
HC	<i>hémicanal</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
IFN	<i>interféron</i>
IgG	<i>immunoglobuline de type G</i>
IL	<i>interleukine</i>
JC	<i>jonction communicante</i>
KO	<i>knock out</i>

LCS	<i>liquide cérebrospinal</i>
LPS	<i>lipopolysaccharide</i>
LETM	<i>longitudinal extensive transverse myelitis</i>
MAC	<i>membranolytic attack complex</i>
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MMP	<i>métalloprotéinase matricielle</i>
MOG	<i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
NMO	<i>neuromyérite optique</i>
NMOSD	<i>neuromyelitis optica spectrum disorders</i>
NSC	<i>neural stem cell</i>
OAP	<i>orthogonal array of particle</i>
OPC	<i>oligodendrocyte precursor cell</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PCP	<i>planar cell polarity</i>
RGC	<i>radial glial cell</i>
SEP	<i>sclérose en plaques</i>
SLA	<i>sclérose latérale amyotrophique</i>
SNC	<i>système nerveux central</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
V-SVZ	<i>ventricular-subventricular zone</i>
VRS	<i>Virchow Robin space</i>

INTRODUCTION

1. L'épendyme

a. Généralités

L'épendyme est un épithélium monostratifié composé majoritairement de cellules cuboïdes multiciliées appelées cellules épendymaires (CEs) ou épendymocytes (**Figure 1**). Il borde les cavités des ventricules cérébraux, des aqueducs cérébraux et du canal central de la moelle épinière, séparant ainsi le liquide cérébro-spinal (LCS) du parenchyme neural sous-jacent. Même si les épendymocytes composent majoritairement cet épithélium chez l'adulte, on y retrouve également les prolongements de certains neurones contactant le LCS et les prolongements de cellules souches quiescentes encore présentes sous l'épendyme chez l'adulte.

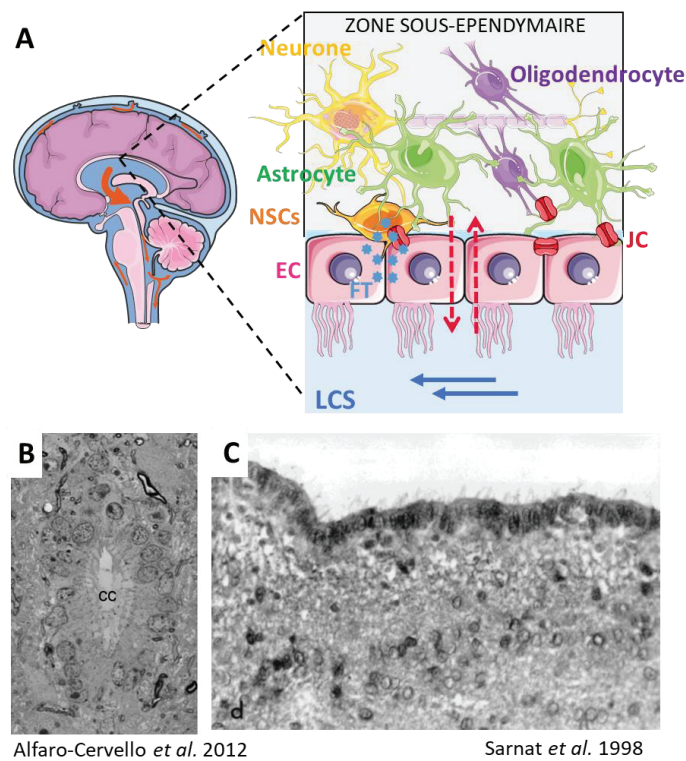


Figure 1. L'épendyme, un épithélium au cœur du système nerveux central. A) L'épendyme pave les cavités du SNC des ventricules jusqu'au canal central de la moelle épinière. Ses cellules épithéliales multiciliées, appelées épendymocytes sont en contact étroit avec le LCS et le parenchyme cérébral. Dans cette zone sous-épendymaire, on retrouve au contact avec les épendymocytes, des cellules souches et des astrocytes, et en contact indirect d'autres types cellulaires (des neurones ou oligodendrocytes). L'épendyme régule le flux du LCS par le battement de ses cils, les échanges entre le LCS et les différents types cellulaires via l'expression de jonctions communicantes (JC) et module la prolifération des cellules souches neurales (NSCs) par échanges de nutriments ou de facteurs de transcriptions (FT). B) Image de microscopie de l'épendyme du canal central (cc) de la moelle épinière marqué au bleu de

toluïdine. Les épendymocytes dont les cils baignent dans le LCS au centre forment une structure ovale au centre de la moelle épinière (Alfaro-Cervello et al., 2012). C) Image de microscopie de l'épendyme des ventricules marqués par S100-β. L'épendyme forme une monocouche de cellules cuboïdes dont les cils baignent dans le LCS (Sarnat, 1998).

Le terme épendyme provient du grec ἐπέδυμα, dont le préfixe epi- signifie « sur » ou « supérieur » et le radical -enduma signifie « vêtement ». Il s'agirait donc d'un « vêtement supérieur » pour le cerveau. Mais d'où provient ce nom ? Du fait de sa position interne dans le cerveau, on peut se demander pourquoi les premiers auteurs à l'avoir dénommé l'aient qualifié de « vêtement supérieur ». Est-ce plutôt un vêtement supérieur pour les ventricules eux-mêmes ? Pour répondre à cette question, il faudrait retrouver la première utilisation du mot épendyme. Le problème est qu'aucun auteur n'est explicitement considéré comme le premier utilisateur de ce nom. Dans un article spécifiquement dédié à l'origine de ce terme, F. Šimon retrace l'apparition du terme épendyme dans la littérature. Il indique que l'auteur originel n'est pas connu car personne n'a jamais revendiqué son invention. Le terme épendyme proviendrait en fait de la traduction progressive de sa 1ère description dans les travaux des frères allemands Wenzel en 1806, qui décrivaient pour la 1ère fois cet « épithélium bordant les ventricules » (Wenzel, 1806). Plusieurs auteurs, principalement allemands également, tentèrent de traduire cette expression en s'inspirant du latin et/ou du grec (e.g. « ependyma s. epithelium ventriculorum cerebri » ou « membrana ventriculos cerebri vestiens ») au cours du XIXème siècle (Šimon, 2016). Puis, petit à petit, c'est le terme ependyma qui fut repris par les auteurs, sans doute du fait de sa simplicité. Finalement, on peut penser que le mot épendyme était et est toujours utilisé comme un raccourci de différentes appellations plus longues, plutôt que comme une véritable entité sémantique. Dérivé de ce terme, on parle aujourd'hui des épendymocytes comme étant les cellules gliales qui bordent les ventricules.

Par sa position d'interface entre le LCS et le parenchyme, l'épendyme a longtemps été considéré comme une simple barrière limitante. Cependant, de nombreuses études réalisées lors de ces dernières décennies montrent qu'il possède de multiples rôles primordiaux pour le fonctionnement physiologique du SNC, notamment en régulant les échanges homéostatiques entre le LCS et le SNC, en contrôlant la propulsion du LCS dans les ventricules et en jouant un rôle de niche pour les cellules souches de la zone sous-ventriculaire (V-SVZ). Toutes ces fonctions sont détaillées dans les chapitres suivants. Mais avant d'aborder le fonctionnement de l'épendyme chez l'adulte, il est important de comprendre son rôle et son évolution pendant le développement.

b. Origine et développement des cellules épendymaires

D'origine, les épendymocytes sont des cellules gliales particulières dérivées de la différenciation, après la naissance, des cellules de la glie radiale (RGC), elles-mêmes provenant des cellules bordant la lumière du tube neural. Lors de l'embryogenèse et jusqu'à la naissance, l'épithélium séparant le LCS du tissu nerveux formé par les RGCs est appelé neuro-épithélium. C'est après la naissance que le terme d'épendyme est utilisé pour dénommer cette interface. Si le terme utilisé pour qualifier l'interface entre le LCS et le cerveau évolue, les cellules qui la compose aussi. En effet, les RGCs se différencient alors en deux types principaux : les épendymocytes et les cellules souches dites B1 de la V-SVZ. Durant le développement, les RGCs constituent la niche germinale à l'origine de la formation du SNC. Elles prolifèrent symétriquement et asymétriquement pour produire des précurseurs neuraux qui vont migrer le long de leurs prolongements pour former le cortex. Chez les rongeurs, les RGCs se divisent asymétriquement pour donner naissance aux neurones migrant le long de leurs processus sous-ventriculaires et qui peuplent, couche après couche, le futur cortex entre les jours embryonnaires E10 et E18. Puis les oligodendrocytes et les astrocytes sont produits entre E14 et P7. Enfin, entre P5 et P21 les RGCs se divisent en cellules B1 et en épendymocytes, ces derniers étant le stade final de différenciation des RGCs (Ortiz-Álvarez and Spassky, 2020). Le rôle de ces cellules dans le développement du SNC fait l'objet d'un vaste champ de recherche qui ne sera abordé ici qu'en regard de sa capacité à produire les épendymocytes lors du développement et les cellules souches de la V-SVZ à l'âge adulte pour la suite de ce chapitre.

i. D'une cellule de la glie radiale à une cellule épendymaire

Les cellules épendymaires sont des cellules très différenciées ayant pour origine les cellules de la glie radiale (RGCs) qui bordent le neuroépithélium pendant le développement embryonnaire (Spassky, 2005). Ces cellules acquièrent leur phénotype progressivement à la fin du développement (E15-E17.5) et deviennent matures vers P20. Les facteurs génétiques qui gouvernent la différenciation des RGCs en CE a fait l'objet de plusieurs revues récentes (Kyrousi et al., 2017; Lewis and Stracker, 2020; Spassky and Meunier, 2017). Nous proposons un schéma récapitulatif des voies d'expression impliquées dans l'identification des RGCs qui deviendront des CEs et dans la différenciation de celles-ci en CEs (**Figure 2**). Avant tout, il a été montré que la différenciation des RGCs en CEs était dépendante du facteur de transcription FoxJ1 (régulateur clé de la ciliogenèse), lui-même responsable de l'expression de nombreux

gènes codants pour des protéines associées à l'organisation du cil et au regroupement des corps basaux (Jacquet et al., 2009). Plus tard, la protéine ankyrin 3 (Ank3), dont l'expression est dépendante de FoxJ1, a été identifiée comme étant nécessaire à la formation des adhérences entre les cellules épendymaires. Un blocage de cette voie impacte la capacité de neurogenèse des NSC de la V-SVZ (Paez-Gonzalez et al., 2011). Ceci montre que, en plus des facteurs trophiques sécrétés par les CEs, leur configuration structurale et spatiale est également importante pour leur rôle en tant que niche. D'autres facteurs de régulations régulant l'expression de FoxJ1 ont également été trouvés. Notamment, le proto-oncogène c-Myb, les protéines de régulation du cycle cellulaire McIdas et GemC1/Lynkeas responsables de l'engagement des RGC qui deviendront des CE et le facteur de transcription Six3 impliqué dans l'expression de marqueurs de RGC (Kyrousi et al., 2017). Par ailleurs, il existe un système de régulation complexe dont l'expression différentielle de certains facteurs comme Notch, Noggin, STAT3 ou encore Numb permet d'orienter la différenciation de la RGC vers une CE ou un astrocyte (**Figure 2**). A la fin du développement embryonnaire, entre les stades E13.5 et E15.5, il a été montré que les RGSs peuvent se différencier soit en cellule E1 (cellule épendymaire multiciliée), soit en cellule B1 dans la V-SVZ (Spassky, 2005). Ainsi, à la fin du développement embryonnaire, les RGCs laissent place progressivement aux cellules B1 et E1 aux bords des ventricules qui augmentent leur volume de façon proportionnelle à la maturation des cellules E1 (Obernier et al., 2018). Plus tard, il a été montré qu'une RGC peut se diviser et se différencier en deux cellules E1 voisines ou en une cellule B1 et une cellule E1 voisines également grâce à une technique de *cell fate mapping* qui consiste à suivre le devenir d'une cellule et de ses descendants à partir d'un moment précis (Redmond et al., 2019). Cependant, les mécanismes de détermination du devenir d'une RGCs vers l'un ou l'autre type cellulaire n'est pas connu. Récemment, deux équipes ont utilisé des méthodes consistant en l'incorporation de traceurs fluorescents multicolores (UbC StarTrack et marqueurs MAGIC) *in utero* dans des RGCs de la V-SVZ de souris à différents stades embryonnaires afin de déterminer et de caractériser le devenir de chaque RGC et de ses clones dans le temps. Ainsi, il a été montré qu'une même RGC peut donner à la fois une cellule E1 et/ou une cellule B1 et que cette différenciation est dépendante de l'expression de Nestin pour la cellule B1 et de FoxJ1 pour la cellule E1 (Redmond et al., 2019). De même, GemC1 stimule la différenciation des RGCs vers le type E1 en défaveur du type B1 et inversement, l'inhibiteur de réplication de l'ADN Geminin induit la différenciation des RGCs vers le type B1 en défaveur du type E1 (Fame and Lehtinen, 2019; Ortiz-Álvarez et al., 2019). Par ailleurs, la différenciation de la RGC en cellules épendymaires

INTRODUCTION

est dépendante de l'expression de Anks1a (une protéine de transport de l'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR)). Son absence favorise notamment la différenciation des RGCs en cellules B1 et sa surexpression, par incorporation d'un vecteur d'ADN contenant le gène codant pour Anks1a par électroporation à P1-P2, provoque une multiplication anormale des cellules épendymaires induisant une hydrocéphalie 15 jours après (Park et al., 2019). Une fois le devenir de la CE fixé, sa différenciation et sa maturation se font par la prolifération des centrosomes, leur ancrage à la membrane apicale, l'élongation des cils et la mise en place de la polarisation planaire des cellules (Spassky and Meunier, 2017). Toutes ces étapes sont détaillées dans le chapitre dédié à la fonction ciliaire.

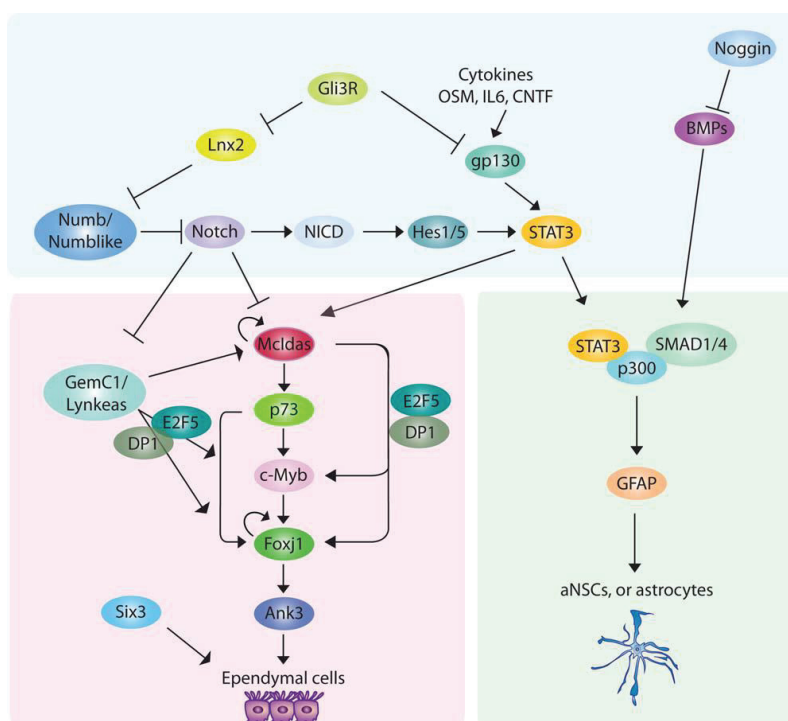
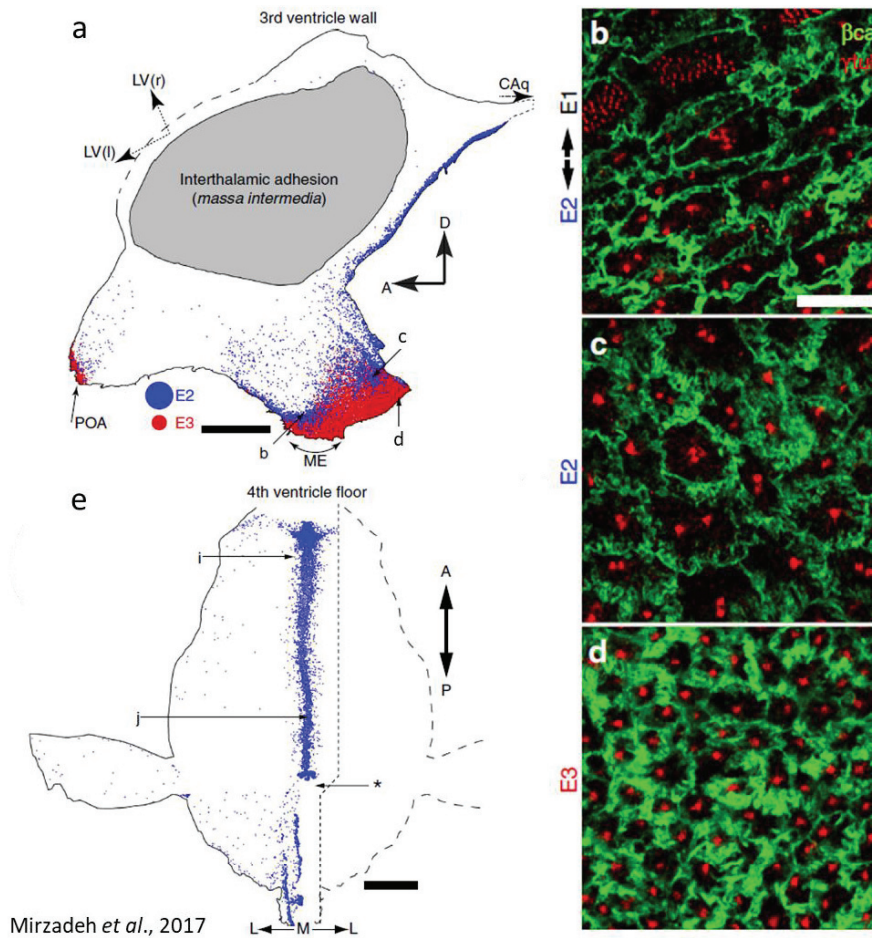


Figure 2. Cascades d'activation transcriptionnelle dirigeant la différenciation des cellules de la glie radiale en astrocyte ou en cellule épendymaire (Kyroosi et al., 2017). Le jeu d'expression de facteurs comprenant majoritairement Noggin, BMPs, Numb Notch et STAT3 permet d'orienter la différenciation de la RGC soit en CE soit en astrocyte ou aNSCs. La différenciation en astrocyte ou en aNSC passe par l'expression de la GFAP alors que celle en CE passe par la cascade MclDas, p73, c-Myb, FoxJ1 et Ank3. Cette dernière est également régulée par GemC1/Lynkeas, E2Fs et Six3.

ii. Les différentes cellules épendymaires

Dans le cerveau, il existe différents types de cellules épendymaires. Z. Mirzadeh et ses collègues ont proposé d'identifier ces différents types de cellules selon des critères morphologiques basés sur les cils (**Figure 3a-e** (Mirzadeh et al., 2017)). On distingue alors les cellules E1 multiciliées (**Figure 3b**), les cellules E2 biciliées (**Figure 3c**) et les cellules E3 uniciliées (**Figures 3c**). Ces cellules sont réparties en proportions différentes selon les ventricules. Dans leur étude, Z. Mirzadeh et ses collègues ont en effet montré grâce à des marqueurs spécifiques que dès le développement, les RGCs présentent des profils d'expression protéique hétérogènes selon les régions du cerveau, étant alors le reflet de l'hétérogénéité des cellules épendymaires à l'âge adulte. Cependant, au sein même d'une région, on ne connaît pas les signaux qui permettront de donner une cellule E1, E2 ou E3. Une étude publiée récemment montre une diversité de cellules épendymaires chez l'homme adulte, au niveau du 3^{ème} ventricule (Lorencova et al., 2020). Dans cette étude, 13 catégories différentes d'épendymocytes ont été définies suivant l'observation par microscopie électronique à balayage des 3^{èmes} ventricules de cerveaux humains selon des critères liés à la forme de la membrane apicale, de la présence de microvillosités, de corps sécrétoires et du nombre et de la taille des cils. De plus, l'enrichissement en ces différentes catégories est différent selon la région cérébrale bordant le ventricule. Cette étude souligne à quel point l'épendyme est hétérogène tout le long des ventricules.

INTRODUCTION

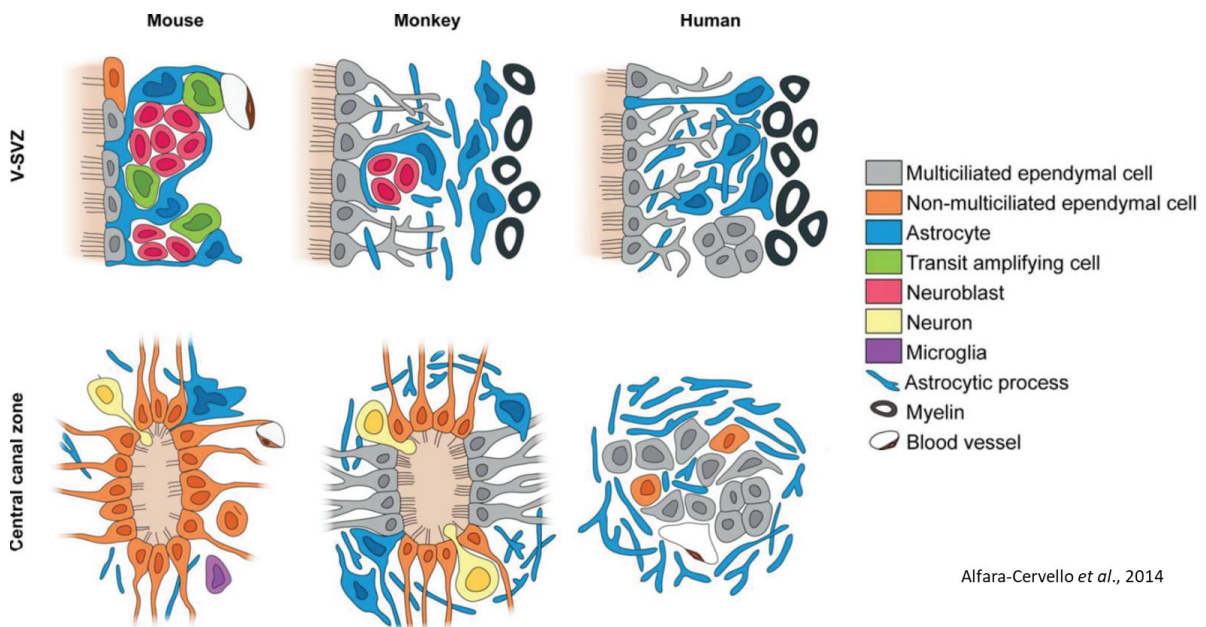


Mirzadeh *et al.*, 2017

Figure 3. Localisation des différentes cellules épendymaires définies par leur nombre de cils (adapté à partir de (Mirzadeh *et al.*, 2017)). En (a) et (e) sont représentées des cartes schématiques de l'organisation des 3^e et 4^e ventricules cérébraux et de la localisation des différentes cellules épendymaires. Les cellules E1 multiciliées sont localisées partout dans les ventricules. Les cellules E2 biciliées (en bleu) sont présentes dans les parties ventrales et caudales du 3^e ventricule (a) et dans la partie médiane du fond ventral du 4^e ventricule (e). Les cellules E3 uniciliées sont situées uniquement dans le 3^e ventricule au niveau de l'éminence médiane (ME) et de l'aire pré-optique (POA). Les ventricules ont été disséqués de sorte à avoir une vue en-face des cellules épendymaires, et le marquage de la membrane latérale par la β -catenin (vert) et des corps basaux par la γ -tubulin (rouge) a permis de distinguer les cellules E1 multiciliées avec de nombreux corps basaux (b), les cellules E2 biciliées avec deux corps basaux (b et c) et les cellules E3 uniciliées avec un seul corps basal (d).

Dans le canal central de la moelle épinière des rongeurs, les cellules épendymaires ressemblent en majorité aux cellules E2 des ventricules avec une paire de cils moteurs (**Figure 4**, (Alfaro-Cervello *et al.*, 2012)). Les auteurs n'ont pas noté la présence de cellules multiciliées mais ont observé quelques cellules épendymaires présentant 1, 3 ou 4 cils moteurs. Même si la cellule

épendymaire du canal central ressemble très fortement à la cellule E2 des ventricules, il existe tout de même une différence majeure entre ces deux cellules : elles peuvent proliférer dans la moelle épinière sous certaines conditions (voir partie 1.c.iii.b)). Chez le macaque et les jeunes humains, le canal central comprend un mélange de cellules biciliées ou uniciliées et de cellules multiciliées (**Figure 4**, (Alfaro-Cervello et al., 2014)). Chez l'humain adulte, le canal central est sténosé avec une présence anecdotique de LCS mais les cellules épendymaires biciliées ou multiciliées sont encore présentes. Entre les cellules épendymaires résident essentiellement des microcanaux et des processus gliaux (Alfaro-Cervello et al., 2014; Milhorat et al., 1994). Il a également été montré que le canal central est perdu avec l'âge chez deux espèces de rongeurs, le rat taupe nu et la souris mutante *hyh* (*hydrocephalus with hop gait*), mais avec une structuration différente de l'homme (Torrillas de la Cal et al., 2021). Il existe donc certainement une grande variabilité inter-espèce.



Alfaro-Cervello et al., 2014

Figure 4. Schémas d'organisation de l'épendyme de la V-SVZ et du canal central chez la souris, le singe et l'humain adulte proposé par (Alfaro-Cervello et al., 2014). Chez la souris, la V-SVZ est composée pour la grande majorité de cellules épendymaires multiciliées et, selon les régions, de cellules biciliées ou uniciliées. Une grande activité prolifératrice est présente avec les 3 stades de développement des cellules souches (les cellules souches astrocytaires B1 entourant les autres cellules souches et formant des projections avec un cil vers le LCS, les cellules transitaires-amplificatrices C et les neuroblastes A). Chez le singe, les ventricules sont bordés par des cellules multiciliées formant des processus sous-ventriculaires et quelques neuroblastes sont présents entourés par la glie. Chez l'homme, l'organisation semble similaire mais la présence de cellules souches fait encore débat. Le canal central de chez la souris contient

INTRODUCTION

des cellules épendymaires avec de un à quatre cils dont certaines ressemblent à des cellules de la glie radiale avec de longs processus, quelques projections astrocytaires et des neurones contactant le LCS. Chez le singe (et les jeunes humains), l'organisation est similaire aux côtés ventraux et dorsaux, mais des cellules épendymaires multiciliées bordent les côtés latéraux. Chez l'homme adulte, la cavité remplie de LCS semble avoir disparue laissant place à un amas de cellules épendymaires multiciliées en contact avec des micro-vaisseaux et de nombreux processus gliaux.

c. Rôles de l'épendyme

Nous avons vu que l'épendyme, ou plutôt le neuro-épithélium, présente un rôle très important dans le développement du SNC et que le passage à l'âge adulte entraîne un changement de phénotype des cellules bordant les ventricules. Le passage à l'adulte est synonyme d'arrêt de ses capacités prolifératives, mais l'épendyme acquiert alors de nouvelles tâches à réaliser pour le bon fonctionnement du SNC.

i. Echanges/interface LCS-parenchyme

o Rôles physiologiques du LCS

Avant de présenter le rôle de l'épendyme en tant qu'interface d'échange entre le LCS et le parenchyme nerveux, il est important de connaître le rôle du LCS, et ce qu'il véhicule.

Production du LCS par les plexus choroïdes

Le LCS est un ultrafiltrat du plasma produit principalement par les plexus choroïdes situés dans les ventricules cérébraux. Sa production est pulsatile et synchronisée sur le rythme cardiaque. Les plexus choroïdes sont des protrusions sous forme de grappes de raisins richement vascularisés flottant dans les ventricules latéraux, 3^{ème} et 4^{ème} ventricules. Ils sont composés de cellules épithéliales spécialisées exprimant des jonctions serrées et de nombreuses protéines de transports permettant de réguler les échanges entre le sang et le LCS. Les vaisseaux présents dans les plexus choroïdes sont fenestrés et les cellules épithéliales des plexus choroïdes sont en prolongement de l'épendyme. La filtration du sang par les plexus choroïdes est faite à la fois par une diffusion passive par une pression de gradient et par un transport actif mené par les différents transporteurs exprimés sur les cellules épithéliales des plexus choroïdes. En plus de leur activité de filtration du sang, les plexus choroïdes peuvent également contrôler la composition du LCS en sécrétant des vitamines ou des peptides (Sakka et al., 2011).

Circulation du LCS

Le LCS circule de son lieu de production dans les ventricules cérébraux jusqu'aux espaces sous-arachnoïdiens spinaux et crâniens où il est absorbé par le sang veineux. Une partie du LCS est également drainé vers le système lymphatique en s'écoulant le long des nerfs spinaux et crâniens, notamment les nerfs optiques et olfactifs via la lame criblée (**Figure 5**, (Nagra et al., 2006)). Arrivé dans le 4^{ème} ventricule, le LCS peut directement se diriger vers l'espace sous-arachnoïdien en traversant les ouvertures de Magendie et de Luschka ou s'écouler dans le canal central de la moelle épinière. Entre 400 à 600 mL sont produits chaque jour permettant le renouvellement du LCS d'environ quatre à cinq fois sur 24 heures (volume total moyen chez l'homme : 125 ml) (Spector et al., 2015). A noter que même si les plexus choroïdes produisent la majorité du LCS, une partie du LCS provient de la diffusion de liquide interstitiel à travers l'épendyme (Rosenberg et al., 1980). Parallèlement au circuit décrit précédemment, il existe également des voies de sortie mineures du LCS, notamment vers le liquide interstitiel du SNC à travers les cellules épendymaires aux jonctions perméables, l'espace périvasculaire ou via les canaux lymphatiques péri-neuraux (Casaca-Carreira et al., 2018).

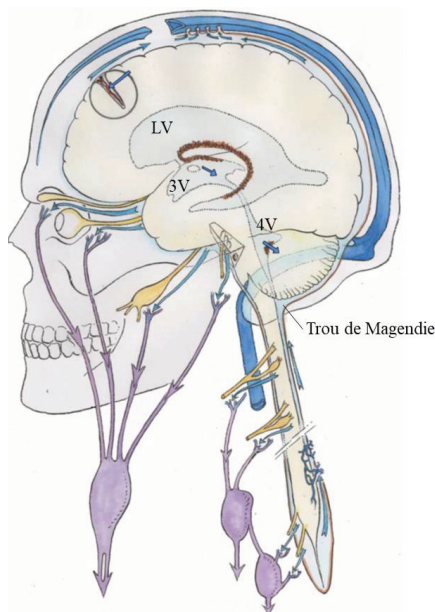


Figure 5. Circulation du LCS : de sa production à sa réabsorption (adapté à partir de Sakka et al., 2011). Le LCS provient majoritairement de la filtration du sang par les plexus choroïdes situés dans les LV, 3V et 4V. La circulation est rostro-caudale des LV en passant le 3V par le foramen de Monro, le 4V et le canal central de la moelle épinière jusqu'à l'espace sous arachnoïdien spinal et crânial où la circulation est caudo-rostrale. Un shunt est possible au niveau de trou de Magendie afin de passer directement du 4V à la sous-arachnoïde crâniale. Le LCS est ensuite réabsorbé par le sang veineux des sinus en contact avec la sous-arachnoïde ou est drainé vers le système lymphatique en s'écoulant le long des nerfs crâniens et spinaux. VL : ventricules latéraux, 3V : 3^{ème} ventricule, 4V : 4^{ème} ventricule.

Récemment, il a été décrit une nouvelle voie de circulation du LCS située dans l'espace périvasculaire. Une petite cavité remplie de LCS appelée l'espace de Virchow-Robin (VRS) se situe entre les pieds astrocytaires et les cellules endothéliales des artères (**Figure 6A**). Elle a été nommée système glymphatique en raison de la communication entre les pieds astrocytaires et

INTRODUCTION

le système lymphatique. Elle sert un processus dynamique d'élimination de déchets toxiques produits dans le parenchyme (comme par exemple le peptide amyloïde) directement le long des vaisseaux sanguins vers le système lymphatique proche des espaces sous-arachnoïdiens (Jessen et al., 2015). Il est très difficile d'étudier ce système car les mouvements d'eaux opérés n'ont lieu que sur du tissu vivant (principalement pendant le sommeil) et les préparations histologiques ne permettent pas de conserver sa structure. A ce jour, une seule étude s'est intéressée à la relation entre le système glymphatique et l'épendyme des ventricules cérébraux. Il s'agit d'une étude d'IRM sur sujets humains où des ouvertures de l'épendyme permettant une communication entre les ventricules latéraux et les VRS sous ventriculaires ont été observées grâce à des techniques de contrastes permettant de visualiser les cavités remplies d'eau (**Figure 6B** (Tsutsumi et al., 2018)). Cette étude suggère que le système glymphatique peut également communiquer dans un sens ou dans l'autre avec le système ventriculaire par des ouvertures de l'épendyme. Des études plus approfondies de ce système de communication pourrait avoir de grandes répercussions sur la compréhension des mécanismes d'évacuation des déchets cérébraux, notamment toxiques dans le cas de certaines pathologies neurodégénératives. Comme le système lymphatique permet le transport des cellules immunitaires, dont principalement les cellules présentatrices d'antigènes, similairement, le système glymphatique pourrait également jouer un rôle dans le transport des cellules immunitaires et contribuer ainsi à la présentation d'antigènes du cerveau au système immunitaire périphérique. En effet, il existe une communication entre le système glymphatique et le système lymphatique présent dans les méninges (Louveau et al., 2017). Etudier cette question pourrait aider à mieux comprendre l'origine de certaines pathologies auto-immunes du SNC.

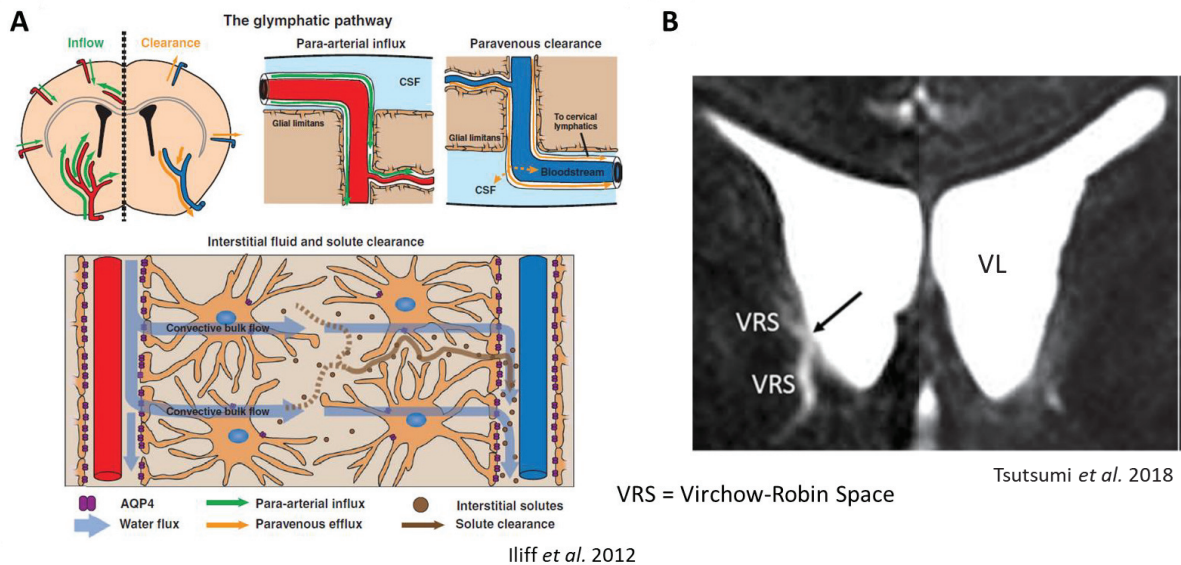


Figure 6. Présentation du système glymphatique et de son interaction avec les ventricules cérébraux. A) Schéma illustrant la circulation du système glymphatique permettant de drainer les solutés de l'espace interstitiel. Un flux d'eau présent dans l'espace périvasculaire, le VRS (*Virchow-Robin Space*), naissant le long des artères permettrait d'entraîner le long des capillaires ces solutés et déchets grâce au flux généré par l'AQP4 des astrocytes. Ce flux serait alors drainé jusqu'aux veines de l'espace sous-arachnoïde où il pourrait alors rejoindre le système veineux ou lymphatique le long des nerfs crâniens (Ilfiff *et al.*, 2012). B) Images d'IRM coronale en interférences constructives en état de repos montrant une ouverture des ventricules latéraux (VL) communiquant avec le VRS. Ces images suggèrent une sortie du système glymphatique vers le ventricule (Tsutsumi *et al.*, 2018).

Rôles du LCS

Historiquement, on considérait que le LCS avait pour unique rôle d'assurer une protection hydrodynamique du cerveau. Depuis, on sait qu'il assure en plus des fonctions métaboliques, nutritives, et immunologiques lui permettant ainsi de jouer un rôle important dans la régulation homéostatique du SNC (Sakka *et al.*, 2011). Par exemple, des troubles de régulation du flux du LCS ou des troubles de sa composition participent à la formation d'hydrocéphalies ou de démences. Il permet également un apport de métabolites et de nutriments, ou d'évacuer les produits du métabolisme des cellules nerveuses. Certaines molécules (peptides, lipides, ions) présentes dans le LCS peuvent aussi jouer un rôle de signal pouvant réguler les fonctions cérébrales. Par exemple, il a été montré que l'injection de LCS d'une chèvre privée de sommeil dans le système ventriculaire d'un rat peut induire le sommeil chez celui-ci (Pappenheimer *et al.*, 1967). De même, le transfert du LCS d'une chèvre rassasiée ou affamée dans les ventricules

INTRODUCTION

d'une autre chèvre a provoqué la diminution ou l'augmentation de la prise alimentaire (Heinrich Martin et al., 1973). Ces observations historiques montrent qu'il existe des molécules véhiculées dans le LCS pouvant réguler l'activité des neurones contrôlant ces fonctions. En fait, il a été montré que les neurones projettent des dendrites dans les ventricules pouvant capter les divers signaux présents dans le LCS (Vigh-Teichmann and Vigh, 1983). Des molécules trophiques sécrétées dans le LCS favorisent la croissance et guident la migration des cellules progénitrices présentes dans l'espace ventriculaire/sous-ventriculaire, grâce notamment aux battement des cils (Sawamoto, 2006). Enfin, le LCS peut contenir des molécules inflammatoires pouvant induire différentes réactions (réactivité gliale, changements morphologiques ou d'expression protéique, perte de fonction, ou mort cellulaire) des cellules bordant les ventricules (Kovacs, 2018; Pourabdolhossein et al., 2017; Young et al., 2013). Tous ces exemples illustrent l'étendue des rôles physiologiques de ce liquide et de son importance pour le bon fonctionnement du SNC.

◦ *Régulation des échanges LCS-parenchyme*

Il sera présenté ici le double rôle de l'épendyme dans les échanges entre le LCS et le parenchyme, notamment de son activité d'échange métabolique mais aussi de relai hormonal.

L'épendyme : le douanier de la frontière LCS-SNC ?

Parce que l'épendyme est à l'interface entre le SNC et le LCS, de très nombreuses études se sont intéressées à l'expression de protéines régulant les échanges entre ces deux compartiments. Une revue écrite par M. R. Del Bigio en 1995, puis une seconde en 2009 résument l'ensemble des connaissances apportées par toutes ces études (Del Bigio, 1995, 2010). Pour résumer, les épendymocytes expriment des fixateurs et transporteurs d'ions et de métaux, des enzymes détoxifiantes, des vésicules de pinocytose pouvant fusionner avec des lysosomes, des pompes d'efflux, des récepteurs de neuropeptides, des canaux hydriques et des jonctions communicantes formant soit des pores vers l'espace extra-cellulaire, soit des pores entre les cellules épendymaires ou les astrocytes voisins. Ce large éventail de transporteurs et de canaux permet à l'épendyme de réguler les échanges de globalement toutes les molécules qui se trouvent entre le parenchyme et le LCS, et le place dans une position d'intermédiaire entre ces deux compartiments. Un des plus importants transports régulés par l'épendyme est le transport d'eau permis par l'aquaporine-4 (AQP4), principal canal hydrique du SNC exprimé par les astrocytes et les épendymocytes et permettant de réguler les volumes d'eau présents dans le

compartiment interstitiel et ventriculaire (détail plus loin). A noter que l'épendyme exprime également le transporteur de K^+ Kir4.1 (Fujita et al., 2015). C'est un transporteur actif permettant de réguler l'équilibre ionique du potassium participant au phénomène de tamponnage du potassium (ou « K^+ buffering »), principalement opéré par les astrocytes, qui consiste à répartir les ions K^+ situés dans les zones concentrées, c'est-à-dire les synapses excitatrices venant de décharger, vers les zones moins concentrées afin de protéger les neurones des effets toxiques d'une forte concentration de K^+ (Kofuji and Newman, 2004). Kir4.1 pourrait alors jouer un rôle de tampon localement, particulièrement au niveau du 3^{ème} ventricule où les tanocytes sont à proximité des neurones hypothalamiques (Fujita et al., 2015). Tous ces échanges peuvent avoir lieu directement entre les cellules en contact avec les épendymocytes par les jonctions communicantes ou via le fluide interstitiel. L'épendyme exprime peu de jonctions serrées et beaucoup de jonctions adhérentes (**Figure 7A**), ce qui en fait un épithélium perméable (Whish et al., 2015). On peut alors se demander si la cellule épendymaire peut vraiment jouer un rôle de régulateur du passage de molécules ou si elle ne joue finalement qu'un rôle de senseur ou de relai. Car même si de grosses molécules peuvent effectivement diffuser à travers ces cellules, il a été montré que la perte d'expression de canaux hydriques comme l'AQP4 entraînait des hydrocéphalies chez un modèle murin (Li et al., 2009) montrant un contrôle actif du transport d'eau. L'épendyme exprime également des transporteurs membranaires dépendants de l'ATP (Aykac and Shirlir, 2021) et régule les échanges d'ions métalliques (MacDonald et al., 2021). En conclusion, même si l'épendyme n'est pas une barrière imperméable car il possède peu de jonctions serrées, il possède de nombreux outils pour contrôler les échanges entre le LCS et le parenchyme.

INTRODUCTION

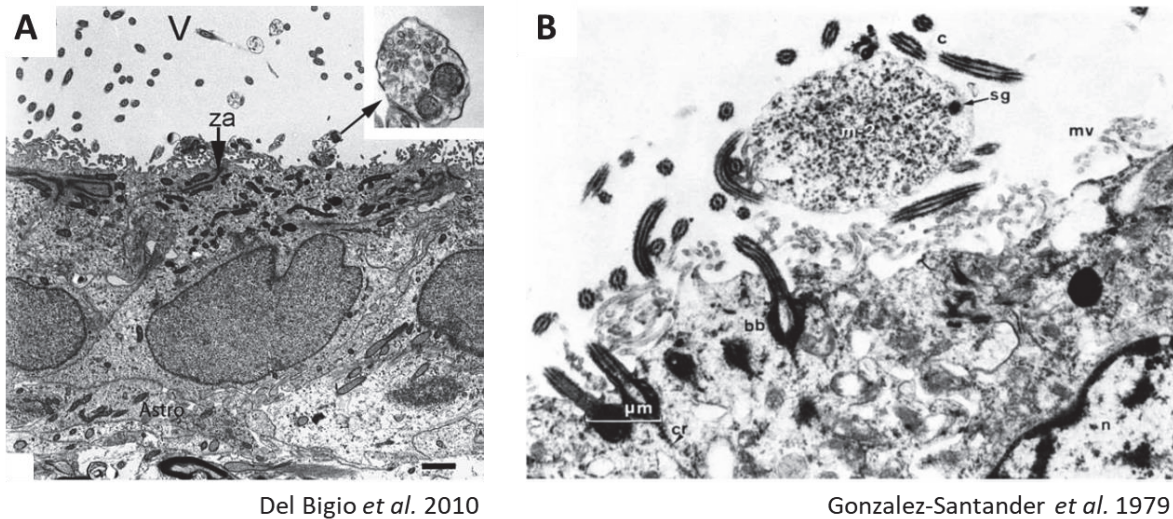


Figure 7. Caractérisation des cellules épendymaires par microscopie électronique. A) Image de microscopie électronique à transmission d'une cellule épendymaire mature de ventricule latéral. On peut voir de nombreux cils dans le ventricule (V). L'épendymocyte possède un gros noyau basolatéral et de nombreuses jonctions adhérentes apicales (za). Elle est en contact direct avec des prolongements astrocytaires côté basal. On peut voir également des vésicules de sécrétion à destination du LCS (flèche noire) (Del Bigio, 2010). B) Image de microscopie électronique d'une cellule épendymaire mature de 3^{ème} ventricule. On y voit des cils moteurs (c) ancrés via leurs corps basaux (bb) et des grosses masses apocrine (m-2) contenant une vésicule de sécrétion (sg) (Gonzalez-Santander, 1979).

Production de messagers moléculaires vers le LCS

De récents travaux de séquençage ARN montrent que les épendymocytes sont également capables de libérer eux-mêmes des molécules signalétiques (lipides, peptides, amines ou nucléotides neuromodulateurs, cytokines/chemokines) dans le LCS (Campbell *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017; MacDonald *et al.*, 2021). Ces observations ont permis d'apporter une toute nouvelle vision de ces cellules qu'on considérait comme de simples cellules intermédiaires situées entre le LCS et le parenchyme nerveux. Elles seraient alors capables de participer activement à la production de signaux transmis par le LCS et de réguler diverses fonctions biologiques du SNC. Comme l'a proposé récemment A. Alpár, les cellules épendymaires qui sont couplées à des neurones via leurs synapses, provenant par exemple de l'hypothalamus, sont capables d'être stimulées par ces derniers afin de sécréter des neuropeptides dans le LCS (Alpár *et al.*, 2019). Cette théorie est soutenue par une observation, 40 ans plus tôt, de vésicules denses aux électrons, riches en peptides, du côté apical des épendymocytes du 3^{ème} ventricule

de chat par microscopie électronique (**Figure 7A-B** (Gonzalez-Santander, 1979)). Même si la théorie d'A. Alpar semble être en opposition avec les nombreuses études sur les neurones émettant directement des prolongements axonaux dans le LCS pour sécréter des neuromodulateurs (Illes, 2017), ces deux visions différentes de la capacité des neurones à libérer des neuromodulateurs dans le LCS peuvent coexister. Les épendymocytes pourraient alors jouer un rôle d'amplificateur ou de relai de l'activité des neurones à condition que leur activité soit synchronisée avec celle des neurones les stimulant. Ce qui est possible car A. Alpar et ses collègues ont également montré que certains épendymocytes du 3^{ème} ventricule peuvent être dépolarisés après excitation par des neurones hypothalamiques à CRH (*corticotropin-releasing hormone*), provoquant alors la sécrétion de CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) dans le LCS par les épendymocytes. Dans cette étude, ils ont montré également que le CNTF libéré peut lui-même agir à longue-distance sur le Locus Coeruleus du 4^{ème} ventricule, montrant ainsi le rôle des épendymocytes dans la transmission d'un signal hormonal à travers les ventricules (Alpar et al., 2018). Cette théorie présente alors un nouveau rôle peu connu pour les cellules épendymaires dans la régulation des échanges entre le LCS et le tissu nerveux, leur donnant une part dans la communication hormonale véhiculée par le LCS.

◦ *Balance hydrique et AQP4*

Il est connu que le LCS est majoritairement produit par les plexus choroïdes mais il y a également une participation de l'épendyme et de ses canaux hydriques dans la régulation du volume ventriculaire et des échanges d'eau, notamment par l'AQP4 puisque c'est le principal canal hydrique exprimé par les épendymocytes (**Figure 8**).

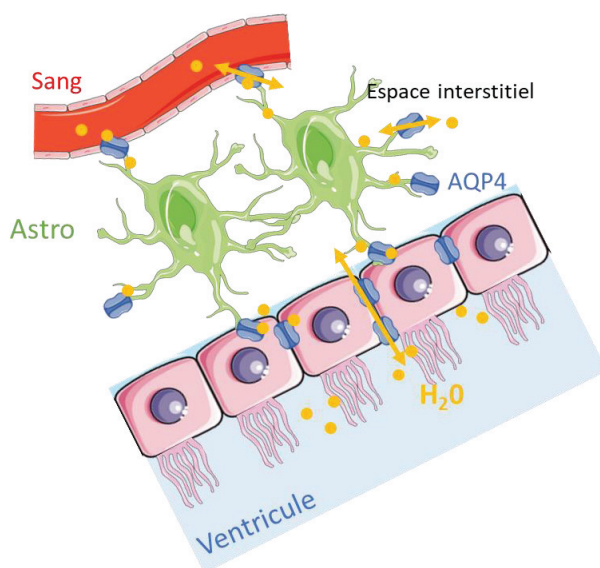


Figure 8. Régulation de la balance hydrique par l'AQP4. L'AQP4 exprimée au niveau des pieds astrocytaires et de l'épendyme permet de réguler les échanges d'eau entre les différents compartiments du SNC afin de répondre aux différentes contraintes homéostatiques comme par exemple le contrôle du volume ventriculaire.

INTRODUCTION

Caractéristiques moléculaires de l'AQP4

L'aquaporine-4 est le principal canal hydrique exprimé dans le SNC, notamment au niveau des pieds astrocytaires entourant les vaisseaux et la pie-mère, ainsi qu'au niveau de l'épendyme (**Figure 8**). Il est également exprimé par les cellules épithéliales des plexus choroïdes (Deffner et al., 2022). Il permet de réguler les échanges d'eau entre les vaisseaux sanguins, le liquide interstitiel, le cytoplasme des cellules et les ventricules cérébraux (**Figure 8**). Les deux isoformes les plus connues sont les formes M1 et M23 qui diffèrent selon leur longueur. La forme M1 possède 23 acides aminés de plus que la forme M23 où l'initiation de la transcription commence à la Met-23 (**Figure 9**). Ces deux isoformes forment des tétramères à la membrane. La particularité de l'AQP4 est de former ce qu'on appelle des réseaux orthogonaux de particules (ou *orthogonal array of particles* (OAPs)). Décrits de très nombreuses fois dans la littérature par des techniques de microscopie électronique, ces OAPs ont longtemps été un mystère pour les neuroscientifiques, avant de découvrir qu'ils sont composés d'AQP4. Seules les formes M23 contribuent à la formation des OAPs et on pense que c'est la queue N-ter de la forme M1 qui inhibe l'agrégat des tétramères en OAPs. Encore aujourd'hui, on ne comprend pas très bien quel est le rôle de ces OAPs car la fonction de l'AQP4 en tant que canal ne semble pas dépendre de l'agrégation en OAPs. Cependant, l'AQP4 présente un rôle dans la neuroinflammation puisque les auto-anticorps anti-AQP4 des patients atteints de neuromyélie optique (NMO) fixent préférentiellement les OAPs (Iorio et al., 2013). Même si ces OAP ont été principalement décrits au niveau des pieds astrocytaires, ils sont également exprimés dans l'épendyme et possèdent donc très probablement les mêmes fonctions (Gleiser et al., 2016; Mack et al., 1987; Privat, 1977).

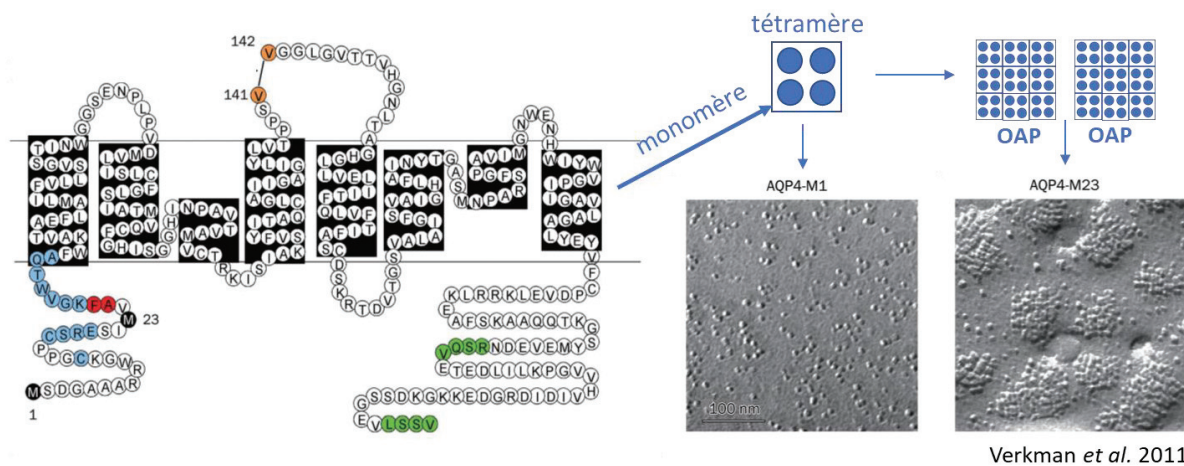


Figure 9. Caractérisation moléculaire de l'AQP4. L'AQP4 est une molécule possédant 6 domaines transmembranaires et 2 boucles intermembranaires formant un pore de la taille d'une molécule d'eau. La forme tertiaire de l'AQP4 est constituée de 4 monomères assemblés en tétramères. Les tétramères s'assemblent ensuite en grosses structures carrées appelées *Orthogonal Array of Particles* (OAPs) visibles en microscopie électronique (Verkman et al., 2011). Il existe deux isoformes M1 (321 aa) et M23 (323 aa). La portion supplémentaire de la forme M1 réduit l'assemblage des tétramères en OAPs c'est pourquoi les OAPs de la forme M23 sont plus gros.

A noter qu'il a été découvert d'autres isoformes de l'AQP4. L'équipe de Torgeir Holen, en 2008, a décrit ainsi six isoformes différentes issues de l'épissage alternatif du gène de l'aqp4 (Moe et al., 2008). Ils notent les isoformes selon la manière suivante : AQP4a (323 aa), AQP4b (268 aa), AQP4c (301 aa), AQP4d (246 aa), AQP4e (364 aa) et AQP4f (309). L'AQP4a correspond à la forme M23 et l'AQP4c à la forme M1. Les AQP4b, d et f sont des formes tronquées des formes a, c et e respectivement où il manque un exon important dans la formation du pore aqueux. Elles ne sont donc pas fonctionnelles. L'AQP4e, plus longue que les formes M1 et M23, est capable de transporter l'eau et est exprimée dans le SNC. Cependant, aucune étude aujourd'hui n'a approfondie son rôle dans le fonctionnement du SNC. Une autre isoforme décrite plus tard, l'AQP4ex faisant 358 aa, donc 10 aa de différence avec l'AQP4e, pourrait correspondre (De Bellis et al., 2017). Cette dernière n'aurait pas un rôle de régulation des échanges d'eau au niveau des pieds astrocytaires et de l'épendyme car elle n'est pas localisée à la membrane. En revanche, il a été montré dans un modèle de souris AQP4ex^{-/-} que l'adressage de l'AQP4 (c'est-à-dire des autres isoformes) à la membrane n'a plus lieu montrant son rôle dans le transport des autres isoformes à la membrane (Palazzo et al., 2019).

INTRODUCTION

Rôles de l'AQP4

Mis à part sa fonction de régulation des échanges d'eau, d'autres fonctions comme le transport d'ions ou d'élimination de déchets ont été récemment attribuées à l'AQP4. Mais le rôle le plus important de l'AQP4 est la régulation des échanges d'eau entre le cerveau et le reste du corps humain. Une très grande partie de ces échanges s'effectue entre le sang et le parenchyme via les pieds astrocytaires entourant les vaisseaux, mais il existe aussi une voie de circulation importante au niveau de l'interface LCS-parenchyme, notamment via les plexus choroïdes et l'épendyme. De façon méconnue, ce dernier produit même une partie du LCS (Rosenberg et al., 1980), notamment via des mouvements d'eau et d'ions orchestrés par l'AQP4 (Desai et al., 2016). Il a été montré chez des souris knock-out (KO) pour l'AQP4 une réduction du volume du LCS et de la pression intra-ventriculaire allant dans le sens d'une sortie d'eau du parenchyme vers le LCS (Feng et al., 2009; Li et al., 2009; Trillo-Contreras et al., 2019). De nombreuses études ont aussi révélé l'importance de l'AQP4 dans la protection contre les hydrocéphalies, car l'absence d'AQP4 aggrave les accumulations d'eau dans le LCS (Desai et al., 2016; Guo et al., 2018; Trillo-Contreras et al., 2018). De façon contradictoire, en faisant un knock-out (KO) conditionnel de l'AQP4 dans les cellules épendymaires de souris (FoxJ1-Cre:AQP4^{fl/fl}), une étude de 2016 ne montre aucune modification de l'organisation histologique de l'épendyme et aucune augmentation de la quantité d'eau dans le cerveau chez ces souris (Vindedal et al., 2016). Dans cette étude, ils suggèrent que c'est l'AQP4 exprimée au niveau des pieds astrocytaires de la pie-mère qui est essentielle pour effectuer un drainage efficace de l'eau. Même si une étude de 2016 est en opposition par rapport aux autres, la majorité montre quand même que l'AQP4 de l'épendyme joue un rôle majeur dans la régulation à la fois des entrées et des sorties d'eau du SNC vers le LCS et que le sens des mouvements d'eau répond aux contraintes imposées par les variations physiologiques ou pathologiques du SNC.

L'AQP4 possède également un rôle dans le drainage du liquide interstitiel vers le LCS. Il a été montré que le drainage de molécules fluorescentes de différentes tailles injectées dans le corps calleux passe par les ventricules latéraux pour ensuite rejoindre la circulation veineuse au niveau de la sous-arachnoïde et de la lame criblée (Bedussi et al., 2015). Ce drainage interstitiel est notamment dépendant de l'activité des échanges hydriques orchestrés par l'AQP4 au niveau des pieds astrocytaires et de l'épendyme et sert au drainage de déchets comme les peptides amyloïdes (Desai et al., 2016; Nagelhus and Ottersen, 2013; Tait et al., 2008). Une diminution de la capacité de clairance de ce système de drainage a été montrée avec l'âge (Ma et al., 2017).

Cibler ce système pourrait donc être une solution pour améliorer l'élimination de déchets toxiques comme les peptides amyloïdes qui s'accumulent avec l'âge. Et l'AQP4 pourrait être cette cible. En effet, il a été montré que l'inhibition de son activité réduit la clairance des peptides amyloïdes (Rosu et al., 2020; Xu et al., 2015).

AQP4 et jonctions communicantes, un lien particulier

L'AQP4 possède un rôle dans le maintien de l'intégrité de l'épendyme. En effet, en réalisant un KO de l'AQP4 de l'épendyme de souris, en parallèle des altérations du volume ventriculaire, il y a une perte d'expression de la jonction communicante Connexin-43 (Cx43), la principale connexine exprimée dans le SNC par les épendymocytes et les astrocytes (Li et al., 2009). D'ailleurs, cette observation a également été faite pour les astrocytes où le KO par siRNA d'AQP4 entraîne une diminution d'expression de Cx43 et du couplage intercellulaire (Nicchia et al., 2005). Il y a donc une co-régulation de l'expression de l'AQP4 et de la Cx43. Une perturbation de l'AQP4 peut donc avoir des conséquences indirectes sur la communication intercellulaire opérée par les jonctions communicantes. C'est notamment le cas lorsque l'on perturbe l'expression de l'AQP4 par des anticorps anti-AQP4 de patients atteints de NMO chez l'astrocyte où une modification de l'expression et des fonctions des connexines a été montrée précédemment dans l'équipe (Richard et al., 2020). Il est donc fortement probable également que la perturbation de l'expression de l'AQP4 de l'épendyme ait des conséquences sur les fonctions des jonctions communicantes de l'épendyme et c'est ce que nous cherchons à démontrer dans nos travaux (voir partie résultats).

ii. Régulation du flux du LCS par les cils

La fonction ciliaire est au cœur de l'activité des cellules épendymaires. L'identité même de la cellule épendymaire, comme nous l'avons vu précédemment, dépend de l'expression de régulateurs de la ciliogenèse comme FoxJ1. De plus, il a été montré par une analyse comparative de l'épendyme en fonction de l'âge, de la région et de l'espèce, que les fonctions biologiques les plus conservées de l'épendyme sont liées au cil (MacDonald et al., 2021). En inhibant la formation des cils ou leur motilité dans des modèles murins, des chercheurs ont pu montrer leur rôle dans la régulation du flux et du contrôle des hydrocéphalies (Fliegauf et al., 2007). Je vais donc prendre le temps dans cette partie de décrire comment les cils sont organisés et se mettent en place au cours du développement, et comment ils permettent de réguler le flux du LCS.

Il s'agit en fait d'un cycle comprenant deux phases : une phase effective où le cil s'étend de façon perpendiculaire à la cellule et une phase de récupération où le cil se courbe de façon parallèle à la cellule pour retourner à sa position initiale (**Figure 11**, (Brooks and Wallingford, 2014)). Même si cette dynamique mécanique est bien connue, les mécanismes moléculaires régulant ce cycle sont encore en débat (Lindemann and Lesich, 2010).

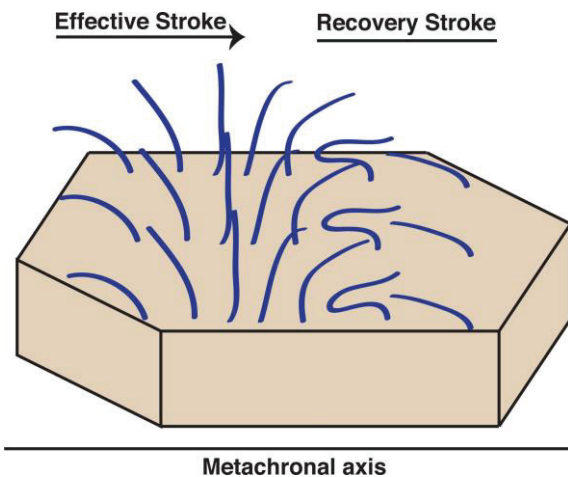


Figure 11. Organisation métachronale d'une cellule multiciliée (Brooks and Wallingford, 2014). Ici est représentée chaque étape du mouvement d'un cil. Le cil se redresse progressivement pendant la phase effective et se courbe pour retrouver sa position initiale pendant la phase de récupération, propulsant ainsi un liquide avec la force produite par ce mouvement dans la direction représentée par la flèche. Les mouvements de tous les cils d'une même cellule sont régulièrement décalés de sorte à ce que le mouvement du fluide à sa surface soit constant, c'est ce qu'on appelle la métachronie.

Afin de réguler le mouvement d'un flux à leur surface, les cellules multiciliées doivent émettre une certaine synchronicité dans leur mouvement afin que le sens et la vitesse du flux restent constants. Cette caractéristique est commune à tous les épithéliums constitués de cellules multiciliées participant à la régulation d'un flux (comme par exemple l'épithélium bronchique, tubulaire rénal ou l'oviducte). Les nombreux cils d'une même cellule présentent alors ce qu'on appelle une métachronie (**Figure 11**). Il s'agit du battement en décalage de phase de chaque cil. Celle-ci permet de constituer une vague de mouvement ciliaire synchroniquement décalée permettant le déplacement à vitesse constante du fluide présent à la surface de l'épithélium (Brooks and Wallingford, 2014).

La fréquence de battement ciliaire

La principale méthode utilisée pour mesurer la capacité de battement des cils est la mesure de la fréquence de battement (CBF pour *ciliary beat frequency*). En utilisant des explants de ventricules d'animaux ou des cellules épendymaires en culture (Hirst et al., 2000a), il est possible de mesurer la CBF par microscopie optique à fort grossissement grâce à des caméras à très haute vitesse pouvant enregistrer un grand nombre d'images par seconde (souvent entre 200 à 2000 images/s) (O'Callaghan et al., 2012). On peut alors établir la CBF en mesurant le

INTRODUCTION

temps mis par un cil pour effectuer son cycle de battement. A l'état physiologique, l'amplitude de variations de la CBF des cellules épendymaires varie selon les études. Selon R. A. Hirst et ses collègues, elle oscille entre 38 et 44 Hz (cycles/s) dans le 4^{ème} ventricule du rat (Hirst et al., 2000a; Mohammed et al., 1999). A partir d'une isolation cellulaire du 4^{ème} ventricule de rat, T. Nguyen a noté une CBF oscillant entre 0 et 28 Hz (Nguyen et al., 2001). La diminution notable de la CBF observée dans l'étude de T. Nguyen par rapport à celle de l'équipe de R. A. Hirst pourrait s'expliquer par le fait qu'un grand stress était appliqué sur les cellules pour les isoler, qu'une souche de rat différente a été utilisée et que les cellules étaient isolées à partir de rats âgés de seulement 8 à 10 jours alors que les cellules épendymaires ne deviennent matures qu'à partir d'une vingtaine de jours après la naissance (cf. chapitre sur le développement des cellules épendymaires). Sur un modèle de culture primaire d'épendymocytes de rat, où les cellules proviennent majoritairement des ventricules latéraux et du 3^{ème} ventricule, K.S. Mönkkönen et ses collègues mesurent une CBF aux alentours de 40 Hz (Mnkkönen et al., 2008; Mönkkönen et al., 2007). En suivant une différente méthode pour cultiver les cellules épendymaires, notamment à partir des ventricules latéraux, M. Bosch Grau reporte une CBF comprise entre 25 et 35 Hz (Bosch Grau et al., 2013). Dans une étude de G. Conductier, la CBF mesurée oscille entre 0 et 15 Hz au niveau du 3^{ème} ventricule sur tranches de cerveaux de souris (Conductier et al., 2013). Alors que T. Liu reporte en 2014 une amplitude comprise entre 30 et 60 Hz dans le 3^{ème} ventricule de souris et classe ainsi en 3 catégories les cellules épendymaires en fonction de leur CBF, de leur angle de battement et de leur localisation dans le 3^{ème} ventricule (Liu et al., 2014). Dans une étude où la CBF a été mesurée à la fois sur des ventricules latéraux de coupes de cerveaux de souris et des cultures primaires, la CBF est d'environ 40 Hz (Mahuzier et al., 2018). Ainsi, il existe une importante variation de la CBF inter-étude. Celle-ci peut varier en fonction de l'origine des cellules utilisées, de la méthode pour les isoler et également de la méthode utilisée pour mesurer la CBF. En effet, C. O'Callaghan reporte en 2012 que l'amplitude varie selon le type de caméra utilisée pour mesurer la CBF (O'Callaghan et al., 2012). A titre de comparaison, la CBF de l'épithélium des voies respiratoires est comprise entre 5 et 20 Hz avec une variabilité entre les études également (Kempeneers et al., 2019).

Régulations de la CBF

Différents mécanismes régulant la CBF ont été décrits dans la littérature. Dans un premier temps, il a été montré que des toxines bactériennes impliquées dans les méningites réduisent la CBF de cellules épendymaires en culture ou d'explants de ventricules murins (Fadaee-Shohada

et al., 2010; Hirst et al., 2000a, 2000b; Mohammed et al., 1999). Des processus pro-inflammatoires d'origine virale ou bactérienne peuvent donc influencer la CBF par des mécanismes encore peu connus.

D'un point de vue plus physiologiques, une étude de 2001 a montré que la CBF du 4^{ème} ventricule de rat mis en culture pendant 1 à 3 jours et de cellules épendymaires en culture est régulée par différents signaux extra- et intracellulaires. Celle-ci augmente après ajout de sérotonine et diminue en présence d'ATP et d'AMPc intracellulaire, en suggérant notamment que l'ATP réduit la CBF par une voie dépendante de l'AMPc (Nguyen et al., 2001). Également, en utilisant du milieu sans Ca²⁺, ils ont montré que l'effet potentialisant de la sérotonine est Ca²⁺-dépendant mais que la diminution de la CBF par l'ATP est indépendante du Ca²⁺. Plus tard, K. Monkkonen et ses collègues ont induit une stase ciliaire par inhibition de la protéine G α_{i2} via l'injection intraventriculaire chez la souris d'oligonucléotides anti-sens (Mönkkönen et al., 2007). Un an après, ils ont montré que l'activation de l'adénylate cyclase (AD) par un agoniste entraîne une diminution de la CBF (Mnkkönen et al., 2008), confirmant alors les résultats de (Nguyen et al., 2001), concernant l'inhibition de la CBF par activation d'une voie AD-AMPc. Par contraste, l'effet de l'ATP extracellulaire a été montré comme étant un puissant activateur de la CBF sur d'autres épithéliums multiciliés comme l'oviducte (Villalón et al., 1989), l'œsophage (Gheber et al., 1995), l'épithélium nasal (Morse et al., 2001) ou la trachée (Zhang and Sanderson, 2003). Ces résultats suggèrent que les cils de l'épendyme sont régulés de manière différente des cils des autres épithéliums leur conférant alors un caractère unique.

Il existe un contrôle de la fréquence de battement des cils épendymaires par différents systèmes neuropeptidiens. Cette régulation est permise dès lors que des prolongements neuronaux provenant de noyaux sécréteurs irriguent l'épendyme et que celui-ci exprime les récepteurs associés. Ainsi, il a été montré que l'épendyme, notamment au niveau du 3^{ème} ventricule, exprime le récepteur 1 à la *melanin-concentrating hormone* (MCHR1), que des fibres neuronales hypothalamiques courent le long de l'épendyme et que la MCH régule positivement la CBF (Conductier et al., 2013). De même, l'épendyme est innervé par des fibres sérotoninergiques (Voutsinos et al., 1994), exprime des récepteurs sérotoninergiques (Verleysdonk et al., 2005) et la CBF est régulée positivement par la 5-HT (Nguyen et al., 2001) montrant clairement un rôle de la sérotonine. Il a été montré également que l'épendyme exprime les récepteurs à la dopamine D2, D3, D4 et D5 et est afféré par des fibres dopaminergiques dans les ventricules latéraux. Ceci suggère qu'une régulation des fonctions épendymaires par la

INTRODUCTION

dopamine est possible mais ceci reste encore à être démontré (Tomé et al., 2007). Une régulation hormonale de la CBF existe donc et suggère que la vitesse du flux du LCS peut être contrôlée et varie physiologiquement.

Par ailleurs, la communication intercellulaire est aussi importante dans la régulation des fonctions épendymaires. En effet, Sival et ses collègues ont suggéré qu'un déficit d'expression de jonctions communicantes, les connexines (notamment la Cx43), par lesquelles les cellules communiquent (en échangeant des ions Ca^{2+} par exemple), et adhérentes peuvent entraîner une altération du battement ciliaire et une apoptose (Sival et al., 2011). Plus tard, il a été montré qu'une baisse d'expression de Cx43 dans l'épendyme de zebrafish réduit le nombre de cil et la propagation des vagues calciques le long de l'épendyme (Zhang et al., 2020). Il existe donc un lien entre la communication intercellulaire et les échanges ioniques via les jonctions communicantes, et la régulation du battement ciliaire dans l'épendyme.

◦ *La polarisation planaire des cellules*

Afin d'assurer leur fonction, les cellules multiciliées doivent présenter une certaine polarisation planaire (PCP pour *planar cell polarity*) via l'orientation de leurs cils à leur apex. D'un point de vue général, celle-ci se définit comme étant l'organisation commune et asymétrique des cellules au sein d'un tissu (Devenport, 2014). Concernant l'épendyme, les cellules présentent deux types de polarisation : i) la polarisation rotationnelle, reflet de l'unidirectionnalité commune du battement des cils, et ii) la polarisation translationnelle, correspondant à la polarisation antérieure identique des cils à l'échelle tissulaire (Mirzadeh et al., 2010a). C'est grâce à ces deux types de polarisation que les cellules épendymaires peuvent participer à la régulation du flux du LCS dans les ventricules (Boutin et al., 2014; Ohata et al., 2014).

Mise en place et développement de la PCP

Après le début de la différenciation des cellules de la glie radiale en épendymocytes, il faut entre 8 à 21 jours pour que la PCP épendymaire se mette en place de par le regroupement des cils et l'alignement des corps basaux (**Figure 12**, (Ohata and Alvarez-Buylla, 2016)). Comment est-ce que cette polarisation est-elle mise en place durant le développement ? Deux hypothèses existent concernant cette mise en place : i) la polarisation est permise grâce à l'existence d'un flux capté par les cils qui s'orientent alors en fonction de sa direction, et ii) des signaux intracellulaires indiquent le positionnement des cils. Même si ce n'est pas le cas pour tous les

épithéliums présentant une polarisation planaire (Marshall, 2010), la mise en place de la PCP dans les cellules épendymaires semble être dépendante de ces deux mécanismes.

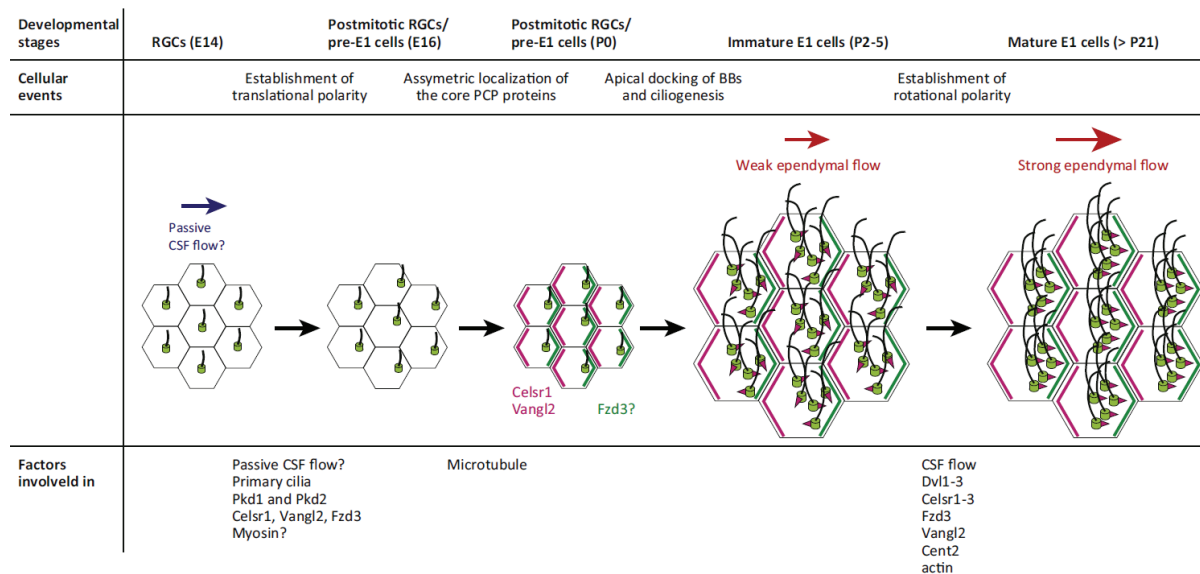


Figure 12. Mise en place de la polarité planaire au cours du développement (Ohata and Alvarez-Buylla, 2016). Lors de la maturation des cellules de la glie radiale (RGC) en cellules épendymaire mature, il y a une mise en place progressive de la polarisation translationnelle et rotationnelle sous la gouvernance de signaux à la fois génétiques, structuraux et extérieurs (le flux passif du LCS).

Durant les 21 jours de maturation des cellules épendymaires après la naissance, le flux entraîné par la production du LCS par les plexus choroïdes qui s'écoule alors des ventricules vers l'espace sous-arachnoïdien constitue un signal mécanique permettant d'orienter la polarisation des cellules. De par l'étude de la contribution de ces deux voies dans la mise en place de la polarisation des cellules épendymaires de cerveaux de souris, il a été montré que ce flux est un premier signal permettant d'orienter les cils et est complémentaire des signaux intracellulaires (Guirao et al., 2010; Pellicciotta et al., 2020). Dans ces études, les cellules épendymaires de souris nouveau-nées en culture ont été exposées à un flux soit par rotation du milieu ou par une pompe péristaltique. Au début de leur maturation, les cellules épendymaires présentent des cils positionnés de façon aléatoire dans la cellule. Puis, progressivement, ceux-ci s'orientent jusqu'à être tous orientés dans la même direction. C'est ce qui est appelé la polarité rotationnelle. Les cellules épendymaires présentent une polarisation de leurs cils en parallèle de la direction du flux imposé (Guirao et al., 2010; Pellicciotta et al., 2020). Ceci suggère que le flux est un signal hydrodynamique capable d'orienter le battement des cils dans sa direction et, que sans ce signal,

INTRODUCTION

les cellules sont capables de s'orienter dans la même direction de façon autonome mais la direction est aléatoire. En revanche, il a été montré par un système similaire qu'avec ou sans flux appliqué, les cellules ne parviennent pas à mettre en place une polarisation translationnelle (Hirota et al., 2010). Autrement dit, le flux seul ne peut pas induire la polarisation translationnelle des cellules épendymaires suggérant ainsi que cette polarité serait induite par d'autres facteurs de régulation.

Bien que le flux soit capable d'indiquer la direction de la polarisation des cellules épendymaires, il existe des facteurs de régulation génétiques dans cette mise en place. En effet, B. Guirao et ses collègues, ont montré que l'expression du facteur de régulation de la PCP, Vangl2, est nécessaire à l'orientation des cils et de leur battement en fonction du flux pendant la maturation des cellules épendymaires (Guirao et al., 2010). Plus tard, une autre équipe a montré que cette orientation en fonction du flux est également dépendante de l'expression de la *coiled-coil protein* appelée *basal-body orientation 1* (Bbof1), une protéine dont la transcription dépend du facteur Foxj1 connu pour être suffisant pour induire la formation de cils moteurs (Chien et al., 2013).

Quels sont les gènes qui permettent aux cellules multiciliées, et plus précisément, les épendymocytes de mettre en place leur deux types de polarisation ? Grâce à une palette de souris transgéniques, C. Boutin et ses collègues ont proposé l'existence de deux voies de régulation coexistantes (Boutin et al., 2014). La première régie la mise en place de la polarisation rotationnelle et est régulée par les cadhérines EGF-like laminin G-like seven-pass G-type receptor (Celsr) 2 et 3, Fizzled 3 (Fzd3) et Van Gogh like 2 (Vangl2). La seconde régie la mise en place de la polarisation translationnelle et est régulée par Celsr1, Fzd3 et Vangl2. Mis à part les travaux de C. Boutin et ses collègues, plus de 20 autres études ont mis en évidence l'importance de facteurs de régulation de la polarisation d'origines diverses (**Table 1**). Ces travaux ont mis en évidence que la mise en place de la polarisation translationnelle et rotationnelle sont régulées par des facteurs différents. Tous ces gènes sont impliqués dans l'expression de protéines aux fonctions diverses : motilité ciliaire, cytosquelette, suppresseurs de tumeur ou récepteurs mécano-sensoriels. Tous ces gènes ont un impact sur la formation et le maintien de la polarité et donc la fonction ciliaire des cellules épendymaires. Cette variété de gènes régulateurs démontre que cette polarité est au cœur de la physiologie de ces cellules et aussi à quel point elle peut être sensible à différentes sources de variations d'origines diverses (environnementales ou internes) rendant nécessaire la redondance des signaux.

Table 1. Protéines régulant la mise en place de la polarisation planaire des cellules épendymaires

L'inhibition d'expression ou le KO impacte la :

Protéine	Fonction	Polarité		Ciliogenèse	Motilité	Référence
		rotationnelle	translationnelle			
FoxJ1	Facteur de transcription pour la ciliogenèse	oui	oui	oui	non	Jacquet <i>et al.</i> 2009
Kif3a	Sous-unité de la kinesine-2	oui	oui	oui	non	Mirzadeh <i>et al.</i> 2010
Vangl2	Voie de signalisation de la PCP	oui	oui	non	-	Guirao <i>et al.</i> 2010 ; Boutin <i>et al.</i> 2014
Celsr2&3	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor	oui	non	☑	non	Tissir <i>et al.</i> 2010 ; Boutin <i>et al.</i> 2014
Dishevelled2	Voie de signalisation de la PCP	oui	non	non	☑	Hirota <i>et al.</i> 2010
Non-muscle myosin II	Contrôle du mouvement des centrosomes	non	oui	non	non	Hirota <i>et al.</i> 2010
Bbobl1	Protéine coiled-coil	oui	-	non	-	Chien <i>et al.</i> 2013
Ktu	Assemblage des bras de dynéines internes de l'axonème	oui	-	non	stase	Matsuo <i>et al.</i> 2013
Spag6	Composant de l'appareil central de l'axonème	oui	oui	☑	☑	Teves <i>et al.</i> 2014
Celsr1	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor	non	oui	-	-	Boutin <i>et al.</i> 2014
Frizzled3	Voie de signalisation de la PCP	oui	oui	-	-	Boutin <i>et al.</i> 2014
Centrin2	Protéine fixant le Ca ²⁺ associée au corps basal	oui	-	non	-	Ying <i>et al.</i> 2014
Dishevelled1,2&3	Voie de signalisation de la PCP	oui	oui	non	non	Ohata <i>et al.</i> 2014
Myosin Id	Protéine motrice	-	oui	non	-	Hegan <i>et al.</i> 2015
Pkd1	Mécanosenseur du cil primaire	oui	oui	non	non	Ohata <i>et al.</i> 2015
Pkd2	Mécanosenseur du cil primaire	oui	oui	non	non	Ohata <i>et al.</i> 2015
NHERF1	Facteur de régulation 1 de l'échangeur Na ⁺ /H ⁺	oui	-	☑	-	Treat <i>et al.</i> 2016
p73	Régulateur du cycle cellulaire	-	oui	☑	-	Gonzalez-Cano <i>et al.</i> 2016
Daple	Ancrage membranaire de Dvl & signal PCP	oui	oui	non	☑	Takagishi <i>et al.</i> 2017
icMMP12	Matrix metalloproteinase 12 intracellulaire	-	-	☑	-	Shan <i>et al.</i> 2018
ecMMP12	Matrix metalloproteinase 12 extracellulaire	-	oui	non	-	Shan <i>et al.</i> 2018

INTRODUCTION

Table 1. Facteurs régulant la mise en place de la polarité planaire des cellules épendymaires. Les gènes présentés ici ont été mis en regard de leur importance dans la mise en place de la polarité rotationnelle, translationnelle, dans la ciliogenèse ou la motilité ciliaire grâce à leur invalidation dans des modèles murins. Ils ont été sélectionnés car ils régulent directement la polarité des cellules épendymaires.

On peut alors se demander comment se met en place la PCP d'un point de vue moléculaire dans les cellules épendymaires. Même si le lien entre toutes les protéines exprimées par les gènes que j'ai précédemment cités n'est pas encore totalement établi, des pistes solides sont déjà envisagées (Marques et al., 2019). On sait que la mise en place des corps basaux passe par la division massive des centrioles, de leur migration et de leur ancrage à la membrane apicale et à la restructuration progressive des centrioles immatures en structures multi-protéiques appelées deuterosomes (Spassky and Meunier, 2017). Les centrioles se détachent ensuite de ces structures pour effectuer leur migration et leur ancrage apical sous le contrôle des nombreuses protéines responsables de la formation de la PCP. Une fois qu'ils sont ancrés au bon endroit dans la cellule épendymaire, notamment grâce au cytosquelette d'actine et de microtubules, la ciliogenèse débute à partir des corps basaux ainsi formés.

◦ *Régulation du flux à l'échelle ventriculaire*

Pour finir, une fois que les deux types de polarisation sont mis en place (rotationnelle et translationnelle), il existe un troisième niveau d'organisation et de polarisation des cils qui a lieu à l'échelle du ventricule en entier. Le battement ciliaire régule la circulation du LCS qui doit s'écouler entre tous les ventricules et atteindre le canal central de la moelle épinière et l'espace sous-arachnoïdien. Mais au sein même des ventricules, la circulation du LCS s'organise selon des courants complexes qui permettent une délivrance plus fine et contrôlée des composants du LCS. Par exemple, au niveau des ventricules latéraux des souris, la circulation du LCS est parallèle au flux rostral migratoire des neuroblastes se dirigeant vers le bulbe olfactif (Sawamoto, 2006). Selon les données de la littérature et mes observations, le LCS circule rostro-caudalement le long du bord dorsal du mur latéral du ventricule latérale en suivant le sens de migration de neuroblastes (**Figure 13**, (Mirzadeh et al., 2010b; Sawamoto, 2006)). Puis le flux se dirige ensuite vers la partie ventrale du ventricule. A ma connaissance, il n'existe pas de description à l'échelle macroscopique de l'organisation du flux des autres parties des ventricules latéraux donc on ne sait pas comment circule précisément le LCS vers le foramen séparant le ventricule latéral et le 3^{ème} ventricule.

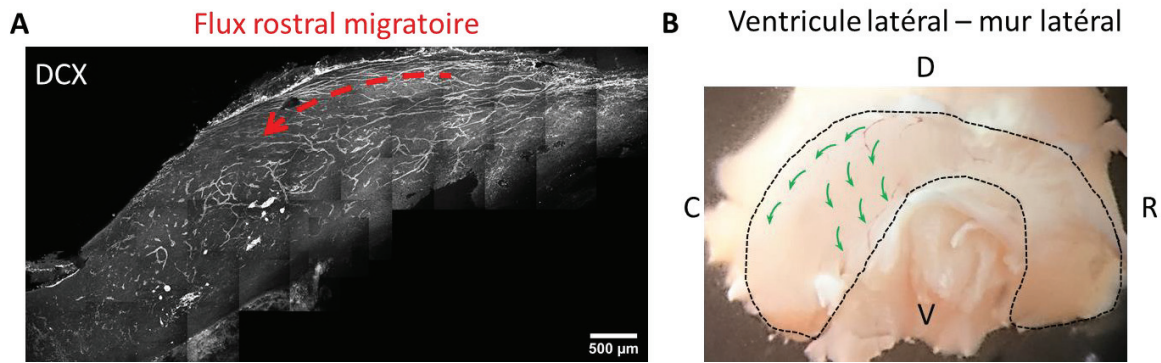


Figure 13. Organisation du flux au niveau du ventricule latéral. **A)** Dissection wholemount du mur ventriculaire latéral marqué par la doublecortin (DCX) montrant le réseau des neuroblastes migrant le long du bord dorsal vers la partie antérieure du mur ventriculaire. **B)** Photo d'un wholemount du ventricule latéral. Les flèches vertes montrent dans quel sens circule le flux sur la partie antérieure du mur latéral du ventricule latéral droit. On voit que le flux circule parallèlement à la migration des neuroblastes au niveau dorsal, puis se dirige vers la partie ventrale. C : caudal, D : dorsal, R : rostral, V : ventral.

Au niveau du 3^{ème} ventricule, la direction du flux est organisée en petites zones correspondant aux différents noyaux hypothalamiques situés sous l'épendyme. R. Faubel et ses collègues ont cartographié le réseau fluidique du 3^{ème} ventricule en entier (Faubel et al., 2016). Chaque zone de la carte correspond à un noyau hypothalamique sous-jacent suggérant un rôle de ce réseau dans la répartition des métabolites ou des signaux neuraux-hormonaux présents dans la LCS. Dans cette étude, ils montrent également que la carte des flux change en fonction de l'état de vigilance de l'animal. Ceci suggère donc que l'orientation des cils n'est pas figée d'un point de vue spatio-temporel mais qu'elle est dynamique et qu'il existe des mécanismes de régulation, probablement hormonaux, permettant de modifier la polarisation rotationnelle et/ou translationnelle des cils au besoin.

iii. Niche des cellules souches neurales (NSCs)

Après la naissance, les cellules de la glie radiale se différencient en cellules épendymaires quiescentes ou en précurseurs neuraux encore actifs à l'âge adulte. La 3^{ème} fonction importante des épendymocytes est de réguler la prolifération de ces précurseurs en conditions physiologiques et pathologiques. La compréhension des mécanismes de régulation de la prolifération de ces cellules souches est l'objectif de beaucoup de neuroscientifiques afin d'apporter de nouvelles solutions thérapeutiques pour la réparation des dommages du SNC. Les capacités prolifératrices de l'épendyme diffèrent entre le cerveau et la moelle épinière. En effet,

INTRODUCTION

les cellules E1, E2 et E3 des ventricules sont post-mitotiques et ne prolifèrent pas en conditions pathologiques (Mirzadeh et al., 2017; Shah et al., 2018; Spassky, 2005) alors que les cellules épendymaires du canal central peuvent proliférer en réponse à des stimuli pharmacologiques ou pathologiques (Moore, 2016). C'est pourquoi le rôle des épendymocytes dans la régulation de la neurogenèse et gliogenèse adulte sera abordé d'abord dans les ventricules puis dans la moelle épinière brièvement.

◦ *Dans les ventricules*

Chez les mammifères adultes, il a été décrit deux principales sources de neurogenèse et de gliogenèse dans le cerveau : la zone sous granulaire du gyrus denté de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire (SVZ) des ventricules latéraux. Les NSCs situées dans la (SVZ) sont en fait en contact étroit avec les cellules épendymaires. Les NSCs du gyrus denté ne seront pas abordées car elles ne sont pas en lien avec l'épendyme. Le terme souvent employé de « zone sous-ventriculaire » pour référer aux cellules souches présentes à proximité des ventricules laisse penser qu'elles ne sont pas en contact avec le LCS. Or, il a été montré qu'un bon nombre de ces cellules souches sont en contact direct avec le LCS. C'est pourquoi le terme de zone ventriculaire-sous-ventriculaire (V-SVZ) est désormais proposé et sera utilisé dans ce manuscrit. L'étude du rôle des NSCs et des mécanismes qui contrôlent leur devenir est un domaine de recherche très actif et excitant car il présente un enjeu majeur dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour stimuler le remplacement neuronal ou glial après des dommages cérébraux ou maladies neurologiques.

Description des différentes NSCs résidents la V-SVZ

Il existe 3 sous-populations de NSCs au niveau de la V-SVZ : les cellules A, B et C. Les cellules B sont les NSCs les plus indifférenciées et sont en contact avec le LCS. Elles sont entourées par des épendymocytes qui forment des roues ou « *pinwheel* » autour d'elles (**Figure 14** (Mirzadeh et al., 2008)). Ces cellules B sont considérées comme des cellules gliales au phénotype astrocytaire (Doetsch et al., 1999) et dérivent des RGCs qui constituent le neuroépithélium de l'embryon (Merkle et al., 2004). Les cellules B1 ont donc la même origine que les cellules épendymaires (Spassky, 2005). Chaque cellule B1 émet un prolongement apical muni d'un seul cil senseur dirigé vers le ventricule au centre des *pinwheels*, et des prolongements basaux contactant des vaisseaux de la V-SVZ ce qui lui permet d'être sensible aux molécules sécrétées dans son environnement qui peuvent alors orienter sa destinée. Elles

peuvent être distinguées entre une forme active (B1a ou Ba) qui se multiplie pour donner deux cellules identiques (division symétrique) ou se différencie (division asymétrique) en cellules C, ou en forme passive (B1) plus étendue et ramifiée (Lim and Alvarez-Buylla, 2014). Les cellules C (multiplicatrices transitoires) se divisent symétriquement approximativement 3 fois dans la V-SVZ avant de se différencier en cellules A (neuroblastes). Les cellules A migrent ensuite en chaînettes à travers le flux rostral migratoire vers le bulbe olfactif (Ponti et al., 2013). Dans le bulbe olfactif, ces neuroblastes se différencient en interneurons qui s'implantent dans le réseau neuronal et sont essentiels pour les fonctions cognitives liées à l'olfaction (Lazarini and Lledo, 2011).

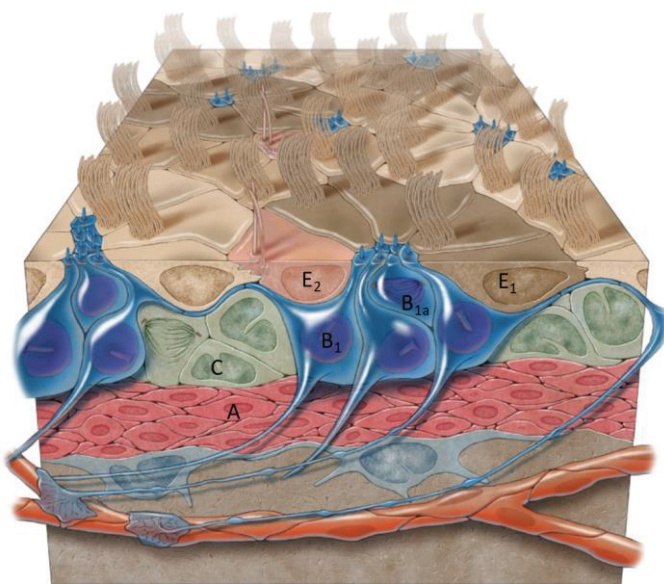


Figure 14. Schéma de l'organisation cellulaire de la V-SVZ (Mirzadeh et al., 2008). Les cellules épendymaires E1, et parfois quelques cellules E2, forment des structures arrondies appelées *pinwheels* (en marron foncé) au centre desquelles sont situées les prolongements des cellules B1 contactant le LCS. Les cellules B1 ressemblent à des astrocytes émettant des prolongements tout autour d'eux dont vers le LCS et les capillaires. Elles peuvent être actives (B1a) et se diviser symétriquement ou asymétriquement pour former les cellules C amplificatrices. On estime que

les cellules C se divisent au moins 3 fois avant de former les neuroblastes, ou cellules A. A noter la polarité des cils des cellules E1 et le cil senseur des cellules B1.

Variabilité des précurseurs neuraux produits

Même si beaucoup d'intérêt a été porté sur la capacité de neurogénèse de ces cellules souches, les cellules B1 sont aussi capables de donner d'autres cellules que des neuroblastes destinés au bulbe olfactif. En effet, les cellules C sont des cellules progénitrices intermédiaires capables de donner des neurones mais aussi des cellules gliales en fonction des signaux qu'elles reçoivent (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Par exemple, lors de lésions démyélinisantes au niveau du corps calleux, les NSCs de la V-SVZ se différencient en progéniteurs d'oligodendrocytes (OPC) capables de migrer vers le corps calleux servant à fournir de nouveaux oligodendrocytes myélinisants (Colak et al., 2008; Jablonska et al., 2010). Similairement, une démyélinisation

INTRODUCTION

induite à la cuprizone entraîne une augmentation du nombre d'astrocytes dans la zone démyélinisée et dans la V-SVZ suggérant que les NSCs peuvent se différencier aussi en astrocytes sous la dépendance d'un facteur de différenciation spécifique, ici *bone morphogenic protein 4* (BMP4) (Cate et al., 2010). De façon similaire, des astrocytes nouvellement produits par la V-SVZ viennent combler par astrogliose les dommages corticaux induits par photothrombose chez la souris (Benner et al., 2013). Mais est-ce que les NSCs de la V-SVZ peuvent se différencier en cellules gliales en conditions physiologiques ? Etant donné que les cellules B1 sont considérées à la fois comme des cellules gliales et NSCs (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009), on peut alors supposer que la division des cellules B1 constitue en soi une production de cellules gliales. Mais la question à se poser alors est : est-ce que ces cellules peuvent se différencier en précurseurs d'astrocytes et d'oligodendrocytes et migrer en conditions physiologiques ? Curieusement, des NSCs prélevées de la V-SVZ et transplantées de façon ectopique ont engendré deux populations de cellules gliales distinctes : astrocytes et oligodendrocytes (Seidenfaden et al., 2006). Après sélection des cellules destinées à devenir des neurones par tri des cellules qui expriment un marqueur de guidance par le flux rostral migratoire (PSA-NCAM), R. Seidenfaden et ses collègues ont greffé ces cellules qui sont devenues encore une fois des oligodendrocytes et des astrocytes. Ces résultats suggèrent que, en dehors de leur environnement, les NSCs se différencient spontanément en cellules gliales. Il existe également une gliogenèse postnatale en conditions physiologiques. Il a été montré récemment que la V-SVZ de souris adultes produit des astrocytes qui migrent vers le corps calleux et qui sont capables de devenir matures par la suite en produisant des contacts avec les vaisseaux (Sohn et al., 2015). De même, il a été montré que les cellules B1 de la V-SVZ produisent des OPCs chez la souris adulte qui migrent vers le corps calleux ou le striatum pour former des oligodendrocytes (Menn et al., 2006). Si un apport de nouveaux astrocytes et oligodendrocytes a lieu chez l'adulte, ceci suggère qu'il existe un renouvellement des oligodendrocytes et des astrocytes qui a lieu de façon physiologique au cours de la vie du cerveau. A l'heure actuelle, on pense que les neurones ont une durée de vie limitée allant de leur naissance à la mort de l'individu mais cela ne semble pas être le cas pour les cellules gliales.

Signaux régulant la prolifération et la différenciation des NSCs de la V-SVZ

Une multitude de signaux moléculaires peuvent influencer la maintenance ou la différenciation des NSCs de la V-SVZ : facteurs de croissance, morphogènes, hormones, cytokines, neurotransmetteurs, composants de la matrice extracellulaire, contacts directs intercellulaires et

facteurs neurotrophiques (Bernstock et al., 2014; Ihrle and Álvarez-Buylla, 2011). Par exemple, l'expression de certains récepteurs comme le PDGFR β permet le maintien de la quiescence et l'EGFR permet l'activation des NSCs de la V-SVZ (Belenguer et al., 2021a; Delgado et al., 2021). Les éléments de la matrice extracellulaire et les contacts intercellulaires sont également des signaux permettant le maintien ou la sortie de la quiescence (Dray et al., 2021; McClenahan et al., 2016). Les cytokines peuvent influencer le sort des NPCs, suggérant une modulation de leur prolifération en conditions neuroinflammatoires. Par exemple, certaines cytokines comme l'IL-4, l'IL-6, l'IL-10 ou l'IFN- γ régulent la différenciation des NSCs en certains types cellulaires (Borsini et al., 2015; Butovsky et al., 2006; Perez-Asensio et al., 2013). Le TNF- α stimule la gliogenèse, inhibe la neurogenèse (Belmadani et al., 2006) et régule l'activation ou la quiescence des NSC en fonction du récepteur qu'elles expriment (Belenguer et al., 2021b). Ainsi, la composition en cytokines du LCS de patients atteints de maladies neuroinflammatoires peut modifier la neurogenèse et la gliogenèse de la V-SVZ. Enfin, il existe une régionalisation au sein des ventricules dévoilant des microdomaines dans lesquels sont produits spécifiquement certains types cellulaires. Par exemple, il existe une hétérogénéité régionale des neuroblastes produits et la partie dorso-antérieure du ventricule latéral est la zone la plus active en terme de neurogenèse (Fiorelli et al., 2015). Cette régionalisation existe aussi pour les cellules gliales, avec une gliogenèse majoritairement située sur les bords dorsaux et septaux des ventricules latéraux (Azim et al., 2016; Delgado et al., 2021).

Rôle des cellules épendymaires en tant que niche

Quel est le rôle des épendymocytes dans la régulation de la survie et de la prolifération des NSCs ? En tant que niche, sont-ils capables de modifier le devenir des NSCs de la V-SVZ ? L'intégrité de la structure de la V-SVZ est nécessaire au contrôle de la prolifération des cellules. En induisant un détachement des cellules épendymaires par injection de neuraminidase dans les ventricules latéraux de rats, les neuroblastes de la V-SVZ augmentent leur prolifération à la surface du ventricule formant des clusters (Del Carmen Gómez-Roldán et al., 2008). Plus tard, il a été montré que la N-cadhérine (protéine d'adhésion intercellulaire) permet de maintenir les cellules B à l'état de quiescence (Porlan et al., 2014). Ce maintien à l'état de quiescence peut être en partie désactivé par le clivage de la N-cadhérine par la métallo-protéinase MT5-MMP potentiellement produite par les épendymocytes adjacents. L'intégrité de la V-SVZ est également nécessaire pour la capacité de neurogenèse des NCSs. Il a été montré que l'inhibition de la protéine d'ancrage des protéines membranaires au cytosquelette Ankyrin-3 au moment de

INTRODUCTION

la maturation des RGCs en CEs désorganise la structure de cette niche et réduit également la neurogenèse (Paez-Gonzalez et al., 2011). Les cellules épendymaires contrôlent la composition du LCS au niveau des prolongements apicaux des cellules B1 grâce au battement de leurs cils moteurs (Sawamoto, 2006). Ainsi, ils peuvent faire parvenir des molécules capables de réguler la prolifération des NSCs présentes dans le LCS (Bernstock et al., 2014). Aussi, les épendymocytes peuvent directement produire des facteurs régulant la prolifération des NSCs. Il a été montré que les épendymocytes produisent la protéine Noggin capable de promouvoir la neurogenèse dans la V-SVZ par inhibition antagoniste de la voie de signalisation BMP (Lim et al., 2000; Peretto et al., 2004). Similairement, l'expression de LRP2, un récepteur de capture de BMP4, est nécessaire pour la prolifération et la migration des neuroblastes vers le bulbe olfactif (Gajera et al., 2010). Les auteurs de ces travaux suggèrent donc qu'en l'absence d'inhibition, BMP aurait pour rôle de stimuler la différenciation des neuroblastes et d'inhiber leur prolifération. Il a été montré que les cellules épendymaires expriment différents facteurs de croissance comme le *fibroblast growth factor 1&2* (FGF1&2), le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), le *hepatocyte growth factor* (HGF) et le *connective tissue growth factor* (CTGF) (Del Bigio, 2010). Cependant, leur effet sur la prolifération des NSCs n'a pas été recherché jusqu'à maintenant. Enfin, il existe de nombreux éléments de la matrice extracellulaire (MEC) pouvant réguler l'activité des NSCs de la V-SVZ, qui en plus de façonner l'architecture cellulaire de la zone sous-épendymaire, peuvent activer certaines voies intracellulaires en interagissant directement avec des récepteurs membranaires comme les intégrines (pour revue (Morante-Redolat and Porlan, 2019)). Ces éléments, de la famille des laminines, collagènes ou encore des protéoglycanes, peuvent provenir des astrocytes B1 eux-mêmes (Sato et al., 2019) ou des épendymocytes (Nascimento et al., 2018).

En plus de leur capacité à réguler la prolifération des NSCs de la V-SVZ, les cellules épendymaires jouent également un rôle de support métabolique pour les NSCs s'ajoutant à leur rôle de niche. Par exemple, les CEs sont capables de capter le glucose environnant, de le stocker sous forme de glycogène et de le mobiliser sous l'effet de la noradrénaline ou de la sérotonine (Prothmann et al., 2001; Verleysdonk et al., 2004, 2005). Elles expriment également des transporteurs au lactate, pyruvate et corps cétoniques MCT1&2 (Pierre et al., 2000). Il a été montré que la Cx43 est exprimée entre les NSCs et les CEs (Mirzadeh et al., 2008). Les cellules épendymaires jouent donc leur rôle de support trophique envers les NSCs en échangeant des ions, des nutriments ou des facteurs trophiques via ces connexines. Indirectement, le flux généré

par le battement ciliaire des épendymocytes régule la prolifération et la migration des NSCs. En effet, K. Sawamoto et ses collaborateurs montrent en 2006 que le sens du flux rostral migratoire est dépendant de la direction du flux du LCS induite par le battement des cils épendymaires (Sawamoto, 2006). Plus tard, il a été démontré que le flux stimule la prolifération des NSCs de la V-SVZ en contact avec les ventricules (donc les cellules B1), et ce de façon dépendante de l'activité du canal sodique épithélial (ENaC) qui jouerait un rôle de détecteur du flux (Petrik et al., 2018).

La neurogenèse adulte dans la V-SVZ humaine

Longtemps sujet à controverse dans la littérature, il est maintenant admis que la neurogenèse de la V-SVZ de l'humain diminue avec l'âge (Beckervordersandforth and Rolando, 2020). En comparaison avec celle des rongeurs, la V-SVZ humaine est aussi composée d'une monocouche de cellules épendymaires, mais la zone sous-épendymaire est dépourvue d'astrocytes de type B1 émettant des prolongements vers le LCS, de neuroblastes et d'un flux migratoire vers le bulbe olfactif. A la place, on retrouve juste plusieurs couches de prolongements astrocytaires pouvant rarement proliférer *in vivo* mais multipotents *in vitro* (Sanai et al., 2004). Pourtant, malgré cette quiescence, il est possible que sous certaines conditions ces cellules se divisent. En 2006, une étude montre une prolifération de cellules dans la V-SVZ de patients ayant subis des lésions ischémiques (Macas et al., 2006). Dans une étude de 2014, une datation au C^{14} a révélé la présence de progéniteurs d'interneurones dans le striatum de patients atteints de la maladie de Huntington, une pathologie neurodégénérative conduisant à la mort spécifique de certains neurones du striatum. Les auteurs suggèrent que ces précurseurs proviendraient de la V-SVZ comme elle est proche (Ernst et al., 2014). Cependant, on ne sait pas s'ils proviennent de la différenciation des NSCs quiescentes de la V-SVZ car il n'y a pas eu de *fate mapping*. Plus récemment, chez des patients atteints de la maladie de Parkinson, il a été montré par analyse transcriptomique que des NSCs de la V-SVZ passent d'un métabolisme anaérobie vers un métabolisme aérobie qui correspond à un phénotype prolifératif (Donega et al., 2019). Même si la neurogenèse semble inactive à l'état physiologique, ces études montrent que cette niche est stimulable et certainement modulable, ce qui offre des perspectives thérapeutiques pour les réparations des dommages cérébraux traumatiques ou neurodégénératifs.

INTRODUCTION

◦ Dans le canal central de la moelle épinière

L'épendyme bordant le canal central de la moelle épinière est organisé en une monocouche de cellules présentant d'un à quatre cils comme vu précédemment. On peut y distinguer principalement trois types cellulaires : 1) les cellules épendymaires multiciliées présentes majoritairement latéralement dans le canal central ; 2) des cellules ressemblant à de la glie radiale avec de longs prolongements vers le parenchyme sous épendymaire sur les côtés dorsaux et ventraux ; 3) des neurones sous épendymaires projetant vers le LCS (**Figure 15**, (Marichal et al., 2012, 2017a; Moreno-Manzano, 2020)). Certains auteurs considèrent également qu'il existe des cellules semblables aux cellules B1 au phénotype astrocytaire présentes en faible quantité (Alfaro-Cervello et al., 2012, 2014) ou des tanocytes contactant les vaisseaux (Moore, 2016).

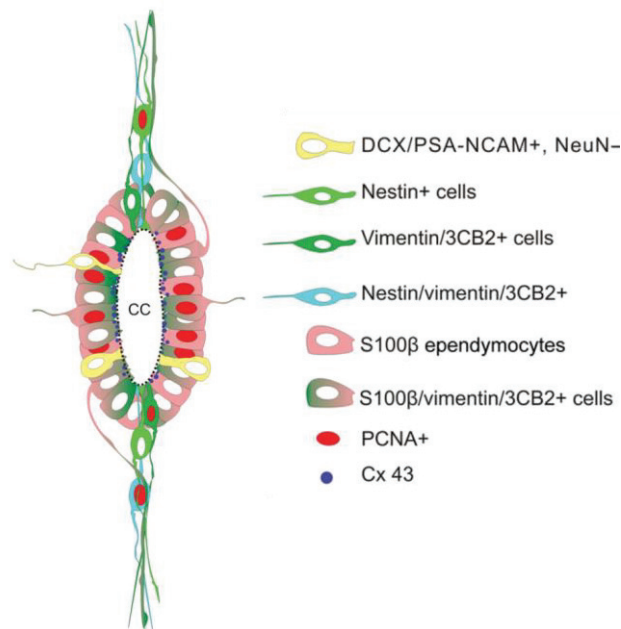


Figure 15. Schéma de l'organisation de l'épendyme du canal central de la moelle épinière (adapté de (Marichal et al., 2012)). Le canal central (cc) est bordé par une monocouche de cellules épendymaires possédant pour la plupart la capacité de proliférer (représentée par la présence du marqueur PCNA pour *proliferating cell nuclear antigen*). Il existe cependant une ségrégation spatiale entre les cellules épendymaires cuboïdes présentant plusieurs cils et peu de prolongements sous l'épendymaire aux côtés latéraux (en rose) et les cellules épendymaires ressemblant à des cellules de la glie radiale avec de longs prolongements sous l'épendymaire aux côtés ventraux et dorsaux (en vert et bleu). On retrouve également des neurones contactant le LCS et des progéniteurs neuraux (en jaune).

Activité prolifératrice des épendymocytes du canal central de la moelle épinière

Lors des lésions de la moelle épinière, il y a une perte de motoneurones et d'oligodendrocytes provoquant un dysfonctionnement de la transmission nerveuse qui engendre des paralysies sous les zones lésées ou des troubles viscéraux dans le bas du tronc. Certains bas-vertébrés, comme la salamandre, la tortue et certains poissons, sont capable de récupérer de façon extraordinaire à la suite de telles lésions et de nouveaux neurones et oligodendrocytes sont reformés dans les zones lésées (Marichal et al., 2017b). Les mammifères, en revanche, récupèrent plus difficilement et les zones lésées ne sont comblées que par des astrocytes formant une cicatrice gliale (Li et al., 2016). Même si cette activité réparatrice n'est pas aussi efficace que chez ces bas-vertébrés, les mammifères possèdent quand même des précurseurs neuraux au niveau du canal central de la moelle épinière pouvant former des astrocytes, des oligodendrocytes ou des neurones mais dans une moindre mesure et de façon décroissante avec l'âge (Li et al., 2016; Moreno-Manzano et al., 2009). Ceux-ci proviennent soit directement de précurseurs latents situés sous ou dans l'épendyme, soit de la dé-différenciation des épendymocytes du canal central en astrocyte glio-cicatrisant ou en progéniteurs d'oligodendrocytes (Llorens-Bobadilla et al., 2015, 2020). De nombreuses études visent donc à comprendre les mécanismes moléculaires qui permettent la prolifération, la migration et l'orientation vers un type cellulaire de ces précurseurs issus des épendymocytes afin d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques visant la réparation des dommages spinaux chez l'homme (pour revue, (Marichal et al., 2017b; Moore, 2016).

iv. La communication inter-cellulaire par les connexines au cœur de toutes les fonctions épendymaires

La communication inter-cellulaire permet les échanges de messagers peptidiques ou nucléiques, d'ions ou de métabolites. Elle est nécessaire au bon fonctionnement de tout système cellulaire aussi bien à l'échelle de deux cellules entre elles ou d'un organe entier. Les cellules musculaires du cœur ne pourraient par exemple pas battre de façon synchronisée sans elles. Cet exemple peut s'appliquer à tout le reste du corps humain où les cellules forment un réseau, et l'épendyme en fait bien évidemment partie. Cette communication inter-cellulaire est principalement permise grâce aux jonctions communicantes, encore appelées jonctions gap ou *gap junctions*. La principale famille de protéines composant ces jonctions sont les connexines, mais il en existe d'autres, comme les panexines qui sont cependant moins décrites, voire pas du

INTRODUCTION

tout dans le cas de l'épendyme. L'objectif de cette partie est donc de présenter quelques généralités sur ces protéines et de décrire leur rôle dans les fonctions de l'épendyme.

◦ Généralités sur les connexines

Les connexines sont des sous-unités qui s'assemblent en hexamères qu'on appelle des connexons dont le poids moléculaire est compris entre 26 et 60 kD. Chaque membre de la famille des connexines est nommé en fonction de son poids moléculaire. Deux connexons présents à la surface de deux cellules voisines peuvent s'assembler en dimères pour ainsi former une jonction communicante (JC), ou alors ne pas s'assembler et ainsi former un pore entre l'espace intra-cellulaire et extra-cellulaire, ce qu'on appelle un hémicanal (HC) (**Figure 16A-C**). Les jonctions gap s'assemblent ensuite en petits groupes visibles sous forme de points visibles en microscopie (**Figure 16D**). Les jonctions gap formées par les connexines permettent le passage de molécules d'un poids < 1 kDA.

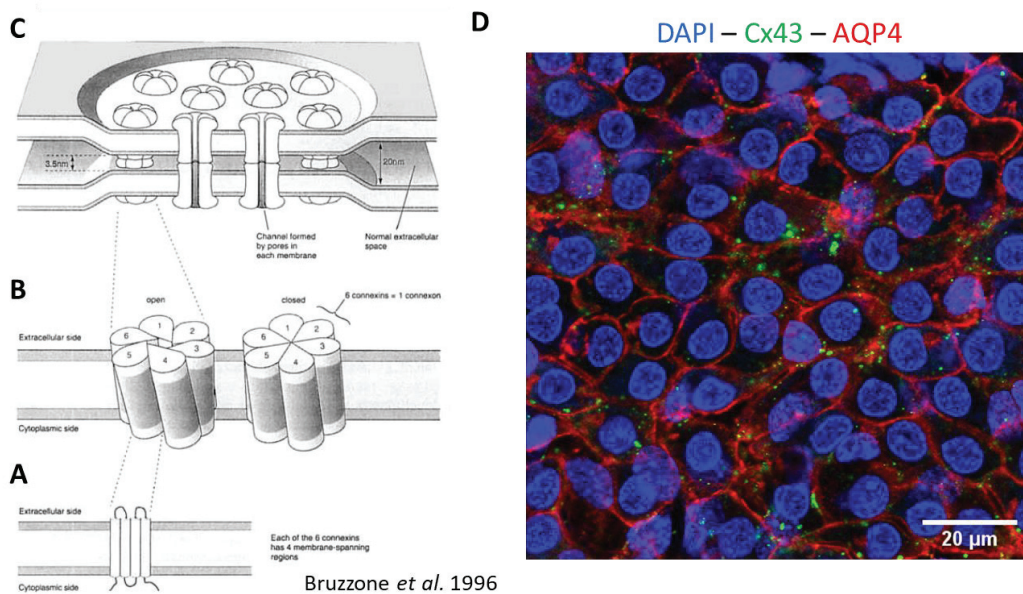


Figure 16. Représentation schématique et immunomarquage de jonctions gap. A) Les connexines sont formées de six boucles intra-cellulaires, deux boucles extracellulaires, une boucle intracytoplasmique et les deux queues Nter et Cter intracytoplasmiques. B) Les connexons sont formés de six sous-unités de connexines et peuvent être en configuration ouverte ou fermée. C) Les connexons s'assemblent en dimères et se regroupent pour former des jonctions gap entre deux cellules (Bruzzone et al., 1996). D) Image en microscopie confocale de cellules épendymaires après une préparation en wholemount du mur ventriculaire latéral et marqué pour la connexin-43 (vert), l'AQP4 (rouge) et le noyau au DAPI (bleu). On voit que les connexines sont regroupées sous forme de points généralement à la membrane marquée en rouge par l'AQP4.

Il existe dans l'épendyme principalement cinq connexines dont l'expression a été reporté dans la littérature. Des différences de leur expression ont également été mentionnée en fonction de l'âge et entre l'épendyme des ventricules ou du canal central de la moelle épinière (**Table 2**). La Cx43 est la plus étudiée. Elle est exprimée dans tout le système ventriculaire et à tous les stades de développement, aussi bien dans l'épendyme ventriculaire (Li et al., 2009; Mirzadeh et al., 2008; Recabal et al., 2018; Roales-Buján et al., 2012) que spinal (Fabbiani et al., 2020; Marichal et al., 2012; Russo et al., 2008). La seule différence à noter est que dans le canal central, elle semble être exprimée plutôt du côté apical des cellules chez l'adulte (Fabbiani et al., 2020). La Cx26, elle, est exprimée dans le canal central des nouveau-nés mais pas chez l'adulte, sauf en cas de lésion et d'acquisition d'un phénotype prolifératif (Fabbiani et al., 2020). Les mêmes observations ont également été faites pour l'épendyme ventriculaire (Mercier and Hatton, 2001; Nadarajah et al., 1997). La Cx30 s'exprime progressivement de la naissance à l'âge adulte dans les ventricules (Kunzelmann et al., 1999), à l'inverse, la Cx30 est très faiblement exprimée chez les nouveau-nés dans le canal central et pas du tout à l'âge adulte (Fabbiani et al., 2020). Enfin, il a été reporté également que la Cx50 est exprimée dans le canal central à l'âge adulte (Rodriguez-Jimenez et al., 2016) et la Cx45 dans les ventricules latéraux de souris adultes (von Maltzahn et al., 2009), mais aucune donnée concernant des différences d'expression entre les régions ou en fonction de l'âge n'a été reportée. A l'heure actuelle, on ne sait pas pourquoi ces différences sont observées entre l'âge et les régions car on ne sait pas vraiment quelles sont les différentes fonctions assurées par ces connexines. On sait juste que la Cx26 est associée à un phénotype prolifératif pour les cellules épendymaires et que la Cx30 semble plutôt être associée à la quiescence.

Connexines exprimées dans l'épendyme

Ventriculaire		Spinal	
Nouveau-né	Adulte	Nouveau-né	Adulte
Cx43	Cx43	Cx43	Cx43 (apical)
Cx26	Cx30	Cx26	Cx30
	Cx45		Cx50

Table 2. Les différences d'expression des connexines de l'épendyme en fonction de l'âge et de la localisation dans le SNC. La Cx43 est exprimée de façon ubiquitaire dans les cellules épendymaires. La Cx26 n'est exprimée que dans les cellules épendymaires de nouveau-nés. A l'inverse, la Cx30 augmente avec l'âge. L'expression de la Cx45 a été montrée dans l'épendyme des ventricules latéraux de souris adultes et la Cx50 a été reportée dans l'épendyme du canal central de la moelle épinière.

INTRODUCTION

- *Rôles des connexines dans les fonctions épendymaires*

Intégrité tissulaire et échanges intercellulaires

Dans un premier temps, les connexines soutiennent les échanges d'ions, messagers, nutriments et déchets entre les cellules épendymaires elles-mêmes et les autres cellules environnantes (Mirzadeh et al., 2008). Par ailleurs, il a été montré qu'une perte de Cx43 compromet l'intégrité du tissu et sans elle, les cellules peuvent se dénuder du mur ventriculaire (Nicchia et al., 2005). Il a aussi été suggéré que la Cx43, en plus d'assurer la cohérence structurelle du tissu, régule la synchronisation des cils, grâce notamment aux échanges calciques (Sival et al., 2011; Zhang et al., 2020). Un lien fort existe entre la Cx43 et l'AQP4. En effet, il a été montré chez l'astrocyte, qu'une interférence avec l'expression de l'AQP4 par des ARN interférants provoque une baisse d'expression et d'activité de la Cx43 (Nicchia et al., 2005). Cette même observation est valable également pour l'épendyme car un KO de l'AQP4 induit une perte de Cx43 et d'intégrité tissulaire (Li et al., 2009).

Régulation de l'activité des cellules souches sous ventriculaires

Les connexines exercent également leurs fonctions dans la régulation de l'activité des cellules souches de la V-SVZ. Il a été montré par exemple que l'activité et l'expression de la Cx45, aussi exprimée par les cellules C (*transit-amplifying*), régulent leur prolifération (Jiao et al., 2017; Khodosevich et al., 2012). En tant que cellule de soutien, l'épendymocyte peut communiquer avec ses voisines B1 au centre des *pinwheels* par l'expression de Cx43 entre ces deux cellules (Mirzadeh et al., 2008). Pendant les premiers jours après la naissance, les cellules épendymaires exprimant encore un phénotype de glie radiale sont couplées fonctionnellement par la Cx43 (Freitas et al., 2012). Même si aucun couplage fonctionnel n'a été réalisé entre les cellules épendymaires et B1 chez l'adulte, le fait que la Cx43 soit exprimée entre ces deux cellules suggèrent fortement que des échanges ont lieu et que l'épendymocyte peut exercer une influence sur la prolifération des NSCs de la V-SVZ grâce aux connexines. Comme expliqué précédemment, la Cx26 joue un rôle dans la prolifération des cellules épendymaires, notamment pendant le développement dans le cerveau. Comme les épendymocytes du cerveau ne prolifèrent pas en cas de lésion, il est peu probable qu'ils expriment de nouveau la Cx26 chez l'adulte. Il a également été montré que l'activité des Cx26, Cx43 et Cx50 régule l'activité des cellules souches originaires des cellules épendymaires de la moelle épinière (Cronin et al.,

2008; Fabbiani et al., 2020; Rodriguez-Jimenez et al., 2016) renforçant leur possible rôle dans la régulation des cellules sous-ventriculaires.

d. L'épendyme en conditions pathologiques

Pour conclure ce chapitre sur l'épendyme, nous avons vu que celui-ci possède de nombreuses fonctions importantes pour le fonctionnement physiologique du SNC. Mais que se passe-t-il lorsque des facteurs d'origine génétique ou environnementale perturbent cet épithélium ? Des troubles de son fonctionnement peuvent-ils être à l'origine de pathologies ?

o Anomalies génétiques : ciliopathies et hydrocéphalies

Il a été abordé plusieurs fois précédemment que des anomalies génétiques du cil ou de la formation de la polarité planaire, ainsi que des troubles des échanges hydriques provoquent des hydrocéphalies, notamment dans les modèles animaux. Il existe aussi chez l'homme des anomalies du cil augmentant la susceptibilité de développer des accumulations de LCS dans le cerveau et des hydrocéphalies. Elles peuvent notamment faire apparaître des maux de têtes, des nausées, des troubles du sommeil, des troubles visuels ou des troubles cognitifs (Lee, 2013). Ces syndromes ont été décrits dans le contexte des ciliopathies qui est une appellation très large comprenant toutes les maladies génétiques issues d'un dysfonctionnement des cils des différents épithéliums du corps humain (comme l'épithélium des voies respiratoires, l'épendyme, l'oviducte ou les tubules rénaux). Des anomalies du fonctionnement ou de la structure des cils de l'épendyme ont été observées chez ces patients mais les hydrocéphalies ne sont pas systématiques (Lee, 2013). Les ciliopathies résultent de la combinaison de plusieurs mutations génétiques. A l'heure actuelle, on ne connaît pas encore bien le lien entre les mutations génétiques identifiées et les anomalies ciliaires observées chez les patients. Elles peuvent avoir des conséquences sur le fonctionnement ou la structuration du cil moteur directement, ou même plus tôt, pendant le développement, en altérant la formation ou le développement du cil primaire des RGCs, comme l'indique les résultats sur les modèles génétiques d'animaux développant des hydrocéphalies (pour revue, (Lee, 2013; Baker and Beales, 2009; Fliegauf et al., 2007)). Des mutations au niveau des protéines de jonction de l'épendyme pourraient également être à l'origine d'une dénudation des cellules épendymaires dans les ventricules et être à l'origine de spina bifida (i.e. des malformations congénitales de la

INTRODUCTION

moelle épinière et de la colonne vertébrale causées par des accumulations de LCS) qui peut également être associée à des hydrocéphalies (Sival et al., 2011).

◦ *Infections microbiennes et réponses inflammatoires*

Certains virus ou certaines bactéries ont un tropisme pour le SNC et peuvent se retrouver dans le LCS. En première ligne, l'épendyme est donc exposé à ces pathogènes. Mais quels sont ses armes faces à ces situations ? L'épendyme possède l'enzyme capable de dégrader les ARN viraux, la 2',5' oligoadenylate synthase et peut la sécréter en réponse à l'IFN- α (Asada-Kubota et al., 1997). Les cellules épendymaires sont la cible d'un grand nombre de virus (Del Bigio, 2010). Même si ces virus ont été retrouvés dans les cellules épendymaires, la conséquence de leur infection sur leurs fonctions n'ont pas toujours été identifiées. Dans certains cas, ces cellules sont dénudées à la suite d'une infection fœtale entraînant des risques d'hydrocéphalie aux conséquences importantes pour le développement. En réponse à des virus neurotrophiques, il a été montré que l'épendyme produit de l'IFN- α et β , des inhibiteurs de la réplication virale et recruteurs des effecteurs de l'immunité innée (Delhaye et al., 2006). Dans sa revue, Marc R. Del Bigio mentionne également que les épendymocytes, exprimant des récepteurs viraux, notamment aux adénovirus, lentivirus, virus Sendai et aux virus de l'herpès de type 1, pourraient être utilisés pour la thérapie génique ou les modifications génétiques expérimentales en injectant dans les ventricules un gène couplé à une capsule virale. Cependant, cette méthode entraîne des risques de réactions inflammatoires trop importantes au niveau des ventricules et montre sa sensibilité aux infections virales même s'ils sont atténués (Tada et al., 2005).

L'épendyme est également la cible de bactéries. L'injection de LPS dans le SNC entraîne l'expression épendymaire du *Toll-like Receptor-4* (TLR4) et une réponse inflammatoire (Chakravarty and Herkenham, 2005). Les TLR sont une famille de récepteurs capables de reconnaître les *Pathogen-Associated Molecular Pattern* (PAMP), dont l'activation induit une cascade de signalisation intracellulaire activant les facteurs de transcription Myd88 et NF κ -B qui augmentent la production de cytokines pro-inflammatoires chémo-attractrices des macrophages et neutrophiles. Parmi tous les récepteurs aux PAMPs, l'épendyme exprime les TLR4, 7 et 9, et CD14, ce qui suggère qu'il est capable de réagir à différents peptides de bactéries Gram- (Neal and Gasque, 2013). Dans le cadre des infections bactériennes, le rôle de l'épendyme a surtout été étudié dans sa réponse aux méningites bactériennes. Il a été montré que l'épendyme subit une perte de cellules, une perte des cils et une réduction du battement ciliaire en présence de pneumolysine, une toxine produite par *Streptococcus pneumoniae* qui

est une bactérie responsable de méninges à streptocoques (Hirst et al., 2000a, 2000b, 2003). Il existe également des infections fongiques à *Cryptococcus* pouvant entraîner des méningites et des hydrocéphalies. Il a notamment été montré par des études en imagerie, que l'épendyme est inflammé dans ces conditions (Hammoud et al., 2017).

L'épendyme serait une voie d'entrée possible pour les leukocytes vers le LCS. En effet, après une infection par *Mesocestoides corti* (un helminthe intestinal pouvant se retrouver dans les ventricules) injecté en intrathécale chez des souris, une augmentation de leukocytes dans le LCS a été observée. Cependant, cette entrée était trop massive pour qu'elle n'ait lieu que via les plexus choroïdes (la voie d'entrée des leukocytes du sang vers le LCS la plus étudiée) et donc les auteurs ont émis l'hypothèse que l'épendyme est une voie d'entrée alternative. Ils ont tout d'abord montré que les cellules épithéliales des plexus choroïdes expriment plus de jonctions serrées que celles de l'épendyme chez les souris WT, le passage serait donc plus facile en dehors des plexus. Puis après infection avec *M. corti*, ils ont observé que l'expression de protéines de jonctions est plus fortement diminuée dans l'épendyme par rapport aux plexus choroïdes et la sécrétion de métalloprotéinase (MMP), protéines facilitant la diapédèse des leukocytes, augmente uniquement dans l'épendyme. Ils suggèrent donc que dans ce cas-là, l'entrée de leukocytes dans le LCS via l'épendyme est plus importante que par les plexus choroïdes (Alvarez and Teale, 2007).

Plusieurs études montrent que l'épendyme peut moduler l'activité du système immunitaire. Par exemple, il a été montré que l'IFN- γ injecté en intrathécale induit la production par les épendymocytes de CCL5 et CXCL10, deux cytokines attractrices des lymphocytes T (Millward et al., 2007). Dans le cas où une inflammation importante a lieu dans le LCS, comme lors d'une méningite, le complément alors recruté pour former des complexes d'attaques membranolytiques (MAC), en plus de détruire les bactéries, peut avoir des effets délétères sur les cellules environnantes. C'est pourquoi, il est important pour les cellules résidentes de pouvoir se protéger en sécrétant à sa surface des molécules capables d'inhiber l'action du MAC. Il a été montré que l'épendyme exprime ces marqueurs (CD35, CD46, CD55 et CD59) après une méningite bactérienne (Canova et al., 2006). Ces données indiquent que l'épendyme a très certainement un rôle de première ligne de défense face aux pathogènes ou aux molécules pro-inflammatoires présents dans le LCS.

INTRODUCTION

◦ *Souffrance cérébrale et pathologies neuroinflammatoires*

Les capacités prolifératives de l'épendyme du canal central de la moelle épinière aux lésions et aux maladies dégénératives est un gros enjeu thérapeutique auquel tente de répondre les neuroscientifiques actuellement (pour revue, (Moore, 2016)). Il est maintenant clair que cette couche épithéliale constituée de différents types cellulaires (tanocytes, précurseurs gliaux, épendymocytes et neurones contactant le LCS) est une source de progéniteurs capables de migrer et de repeupler les zones lésées. Cela a été montré dans beaucoup de modèles de lésions traumatiques mais également dans des modèles de pathologies démyélinisantes comme la SEP (Danilov et al., 2006) ou la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Chi et al., 2006). Il reste encore à comprendre comment se met en place cette migration et cette réorganisation du tissu lésé afin de pouvoir en faire un véritable traitement réparateur chez l'homme. Au niveau de la moelle épinière, les cellules épendymaires elles-mêmes peuvent devenir de nouveau des précurseurs neuraux, comme pendant le développement, et participer à cette neuro/gliogenèse (voir chapitres précédents sur la neurogenèse).

Un certain intérêt se porte sur la capacité de la V-SVZ à fournir des précurseurs en réponse aux pertes causées par certaines conditions neuroinflammatoires. Par exemple, il a été montré qu'il y avait un recrutement de progéniteurs neuraux de la V-SVZ vers des zones lésées suite à un accident vasculaire cérébral (AVC) (Zhang et al., 2009), ou de progéniteurs d'oligodendrocytes vers des zones démyélinisées (Brousse et al., 2015). Certains auteurs se sont donc penchés sur le rôle des cellules épendymaires dans cette réaction. Dans un contexte où la capacité des épendymocytes cérébraux à se différencier pour fournir des précurseurs neuraux n'était pas certaine, ces études avaient aussi pour objectif de clarifier cette question. Dans un modèle d'AVC par occlusion d'une artère cérébrale et dans un modèle EAE (pour *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*), l'observation fut la même : les cellules épendymaires ne prolifèrent pas mais adoptent un phénotype réactif et dysfonctionnel caractérisé par une augmentation de la taille des cellules, une réexpression de la GFAP et une désorganisation des cils, de leur polarisation et de leur capacité à diriger le flux du LCS (Pourabdolhossein et al., 2017; Young et al., 2013). Même si les acteurs du système immunitaire recrutés dans la SEP et dans l'ischémie sont très certainement différents, ces observations suggèrent que dans un environnement inflammatoire, l'épendymocyte peut contribuer à la souffrance du système nerveux en devenant réactif et en perdant ses fonctions importantes pour l'homéostasie cérébrale.

Enfin, l'épendyme est ciblé dans une pathologie auto-immune qui nous intéresse particulièrement au laboratoire qui est la NMO. Dans le chapitre suivant, je détaillerai ce qu'est la NMO, quels sont les symptômes, comment diagnostique-t-on la maladie et quels sont nos connaissances actuelles sur sa physiopathologie. Puis je décrirai brièvement les hypothèses quant à l'origine du déclenchement de l'auto-immunité et quels en sont les traitements, avant de développer le rôle probable de l'épendyme dans cette maladie.

2. La neuromyélie optique (NMO)

a. Généralités

La NMO, ou maladie de Devic, est une maladie auto-immune du système nerveux central (SNC) caractérisée par une perte visuelle et/ou une perte de motricité dans un ou plusieurs membres, provoquées par des attaques démyélinisantes au niveau des nerfs optiques et de la moelle transverse. La prévalence mondiale est de 1-2/100 000 selon les chiffres d'Orphanet, ce qui en fait une maladie rare. Elle atteint majoritairement les femmes avec un rapport de 1 pour 9 et un âge moyen de 40 ans, avec des formes particulières existant chez l'enfant. La NMO évolue généralement par poussées, c'est-à-dire, par apparition répétée des symptômes à intervalles réguliers. C'est pour ces raisons qu'elle a longtemps été considérée comme une forme particulière de sclérose en plaques (SEP). Cependant, contrairement à la SEP, les lésions sont localisées majoritairement au niveau de la moelle épinière, des nerfs optiques et du tronc cérébral, et l'évolution de la maladie est bien plus rapide et sévère. Plus tard, la distinction fut accentuée par la découverte de la présence d'auto-anticorps spécifiques dans le sérum et le LCS des patients atteints de NMO et dirigés contre l'aquaporine 4 (AQP4) pour environ 70% des patients (Lennon et al., 2004). Cependant 30% de patients présentent une sérologie négative pour l'anti-AQP4 et parfois positive pour d'autres auto-anticorps, particulièrement la glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline (MOG).

b. Symptômes et diagnostic : de la maladie de Devic au spectre de la NMO

Eugène Devic et Fernand Gault furent les premiers à proposer de distinguer les patients avec une atteinte simultanée du nerf optique et de la moelle épinière afin d'en faire un type clinique à part entière qu'ils appelèrent la neuro-myélie optique (Devic, 1895; Gault, 1894). Puis, pendant plus d'un siècle, le débat continua et la NMO fut longtemps considérée par beaucoup comme un sous-type de SEP monophasique aux atteintes localisées aux nerfs optiques et à la moelle épinière. Ces dernières décennies, le diagnostic de la NMO a évolué avec l'apparition de techniques d'imagerie cérébrale et d'analyse biologique. Ainsi, il fut possible de diagnostiquer la NMO en montrant des atteintes inflammatoires unilatérales ou bilatérales au niveau des nerfs optiques, une myélie transverse longitudinale extensive (LETM) \geq à trois

vertèbres observable par IRM et une pléiocytose (augmentation du nombre de cellules immunitaires) des neutrophiles dans le LCS (en comparaison, les patients SEP n'en présentent pas, mais ont des bandes oligoclonales qui se ne retrouvent pas dans la NMO) (Wingerchuk et al., 1999). Mais ce n'est qu'à la découverte par V. Lennon et ses collègues d'anticorps dirigés contre l'aquaporine 4 détectés exclusivement dans le sérum des patients atteints de NMO dans 70-90% des cas, que la distinction entre la SEP et la NMO fut définitivement consensuelle (Lennon et al., 2004, 2005).

Ces nouvelles techniques de diagnostic ont permis d'ouvrir le champ clinique de la NMO et d'inclure d'autres atteintes que la névrite optique et la myélite transverse. Par exemple, certains symptômes caractéristiques apparaissent suite aux lésions du tronc cérébral : nausées, vomissements ou crises de hoquets. Plus rarement, il peut apparaître avant ou pendant les crises des troubles du sommeil, du comportement alimentaire ou d'autres troubles cognitifs ainsi que des symptômes neuropsychiatriques associés à des atteintes centrales. Suite à ces inclusions, il n'était alors plus possible d'utiliser des critères diagnostiques restreints aux nerfs optiques et à la moelle épinière. C'est pourquoi, les critères de diagnostic de la NMO ont été révisés une première fois pour inclure le statut sérologique et les lésions observables en IRM (Wingerchuk et al., 2006). Puis, le nouveau terme NMOSD (NMO Spectrum Disorders) fut proposé à la place de NMO suite à l'agrandissement du spectre des patients présentant une sérologie positive à l'AQP4, des lésions IRM s'étendant en dehors des nerfs optiques et de la moelle épinière et des cas où les poussées de névrite optique bilatérale ou de LETM étaient récurrentes et isolées (Wingerchuk, 2010; Wingerchuk et al., 2007). Des critères diagnostiques adaptés à cette nouvelle définition de l'entité NMOSD furent alors définis par un panel international (Wingerchuk et al., 2015).

Un intérêt de plus en plus élevé est apparu récemment concernant des patients NMOSD séronégatifs pour l'AQP4 mais présentant des anticorps dirigés contre la MOG (voir la **Box MOG**)(Kitley et al., 2012). Les descriptions cliniques qui ont été faites de ses patients correspondent plutôt aux cas initialement décrits par E. Devic, c'est-à-dire des névrites optiques et des LETM monophasiques observables en clinique et en IRM (Kitley et al., 2012; Sato, 2014). De plus, ces patients présentent peu d'extension des lésions vers le cerveau (tronc cérébral, area postrema, espaces peri-épendymaires) contrairement aux patients avec anti-AQP4. Ils ont également une meilleure récupération visuelle et motrice après traitement que les patients séropositifs pour l'anti-AQP4, même s'ils ont plus de risques de refaire des névrites

INTRODUCTION

optiques (Cobo-Calvo et al., 2016). Les IgG anti-MOG sont retrouvées dans d'autres présentations cliniques, comme l'*acute demyelinating encephalomyelitis* (ADEM) qui est une encéphalopathie démyélinisante pédiatrique. Pour ces raisons, il est difficile de regrouper tous les patients présentant des anticorps anti-MOG dans un seul type clinique unique (Kim et al., 2015; Marignier et al., 2017). Aujourd'hui, le terme MOGAD (*Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Associated Diseases*) émerge pour qualifier les patients présentant une pathologie démyélinisante avec des anti-MOG.

Dans la suite de ce chapitre, je ferai référence à cette maladie en l'appelant NMO et je me focaliserai sur la NMO à anti-AQP4. Le terme IgG-NMO sera utilisé pour parler de toutes les IgG présentes dans le sérum ou le LCS des patients NMO, contenant en partie les anti-AQP4.

Box MOG

La MOG est une protéine structurale qui compose la myéline du SNC. Elle n'est pas retrouvée dans la myéline périphérique. Elle ne représente que 0,05% des protéines totales de la myéline. Elle est avant tout exprimée sur la couche la plus externe en formant des homodimères et sur la membrane des oligodendrocytes. Son rôle exact n'est pas encore totalement connu mais il existe quelques hypothèses concernant ses fonctions. Dans une revue publiée en 1999, trois rôles ont été proposés pour la MOG : structuration et stabilisation des couches de myéline, régulation de l'état de polymérisation des microtubules et régulation des interactions entre la myéline du SNC et le système immunitaire car elle est capable de fixer et d'activer le composant C1q du complément (Johns and Bernard, 1999). C'est également un marqueur de maturation des oligodendrocytes. La MOG est l'un des auto-antigènes les plus utilisés dans les modèles murins d'EAE.

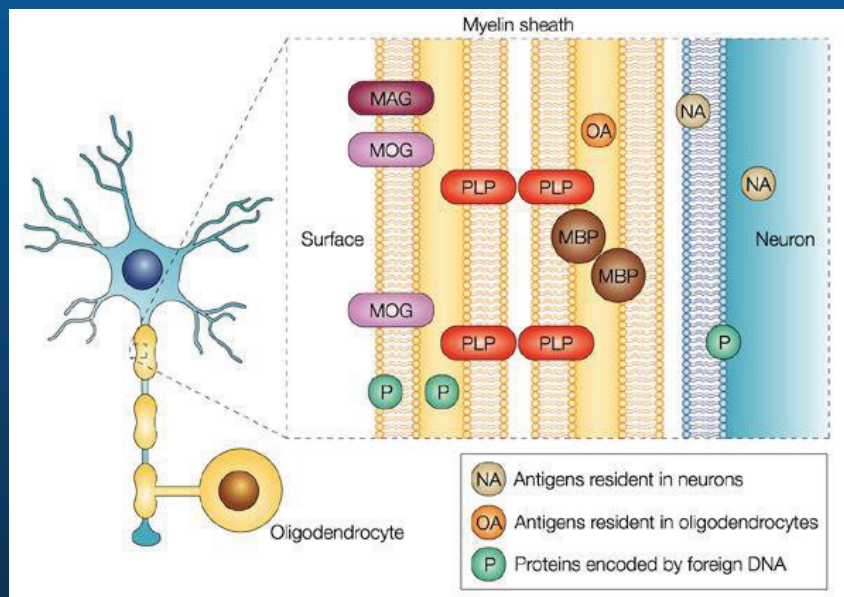


Figure 17. Expression de la MOG et d'autres protéines dans les gaines de myéline (Hemmer et al., 2002). La MOG est exprimée sur la dernière couche de la myéline. Les autres constituants de la myéline sont : *myelin-associated glycoprotein* (MAG), *proteolipid protein* (PLP) et *myelin basic protein* (MBP).

c. Physiopathologie du NMOSD à anti-AQP4

i. Description des lésions et astrocytopathie

Même si la NMO est historiquement considérée comme une pathologie démyélinisante du fait de sa proximité avec la SEP, de nombreuses preuves anatomopathologiques ont poussé les cliniciens et les chercheurs à qualifier cette maladie d'astrocytopathie. Ceci vient principalement du fait que les atteintes inflammatoires ne sont pas toujours caractérisées par des démyélinisations actives (c'est-à-dire lorsque la myéline est phagocytée) et que l'activité du système inflammatoire est également variable alors que l'atteinte astrocytaire (sous de multiples formes) est toujours présente (Fujihara et al., 2012; Kira, 2011; Lucchinetti et al., 2014). Les atteintes sont retrouvées majoritairement dans les zones riches en AQP4, c'est-à-dire au niveau des pieds astrocytaires périvasculaires, dans la glia limitans et dans les zones périventriculaires.

Dans une étude de 2013 (Misu et al., 2013), six différents types de lésions ont été caractérisés sur des prélèvements post-mortem : **1) des lésions actives** caractérisées par l'importante présence d'immunoglobulines, de dépôt de complément et l'invasion de granulocytes. Ces lésions sont accompagnées d'une nécrose des astrocytes, les pieds astrocytaires sont perdus et les astrocytes encore présents n'expriment plus l'AQP4. Une réduction des oligodendrocytes est présente et les macrophages phagocytent les glycoprotéines associées à la myéline (MAG) les plus superficielles mais il y a une relative conservation des autres protéines de myéline et des axones ; **2) des lésions kystiques avec une destruction du tissu** caractérisées par des zones où la plupart des cellules sont détruites et remplacées par des kystes remplis de fluides et de produits de dégradation des macrophages (contenant notamment du complément et de la GFAP). Les oligodendrocytes sont peu nombreux et la myéline a complètement disparu ; **3) des lésions dégénératives secondaires** surtout présentes dans la moelle épinière. Elles sont caractérisées par une perte d'oligodendrocytes, de myéline et d'axones, ainsi qu'une astroglie fibreuse avec surexpression de la GFAP et perte variable de l'AQP4 ; **4) des lésions avec une perte sélective d'AQP4** moins active avec des oligodendrocytes et de la myéline préservée, sans infiltration de granulocytes et de dépôt de complément. Les astrocytes sont soit sous forme normale avec expression de GFAP mais perte d'AQP4 soit gonflés avec une internalisation d'AQP4 ; **5) des lésions avec clasmatodendrose astrocytaire** caractérisées par une gliose protoplasmique, une présence exclusive de lymphocytes T et macrophages, une absence de

complément et des granulocytes et une myéline préservée. Il s'agit surtout d'astrocytes gonflés sans GFAP avec vacuoles réactives à l'AQP4 et aux immunoglobulines ou nécrotiques ; **6) des lésions démyélinisantes primaires avec dystrophie astrocytaire** caractérisée par l'absence de myéline et l'apoptose des oligodendrocytes mais les axones sont préservés. Les lymphocytes T et les macrophages sont présents et actifs mais les granulocytes et les dépôts de complément sont absents. Les astrocytes surexpriment la GFAP et l'AQP4 est relativement conservée.

Il existe donc une grande diversité des lésions pouvant être présentes chez les patients. Plusieurs types de lésions peuvent être retrouvés chez un même patient, et potentiellement en fonction du stade d'avancée de la maladie. Le même groupe a publié une étude sur la caractérisation des lésions en fonction du stade d'avancée de la pathologie (Takai et al., 2021). Toujours par une analyse anatomopathologique de l'astrocytopathie sur tissus de patients décédés en phase aiguë ou chronique du NMOSD, ils définissent 4 stades d'évolution des lésions : **1) un stade de lyse astrocytaire** dans la phase la plus aiguë de la pathologie caractérisé par la perte d'astrocytes et de GFAP dont les débris sont phagocytés par les macrophages et avec une forte présence de dépôt de complément ; **2) un stade de recrutement des progéniteurs gliaux** en phase aiguë ou subaiguë assez semblable au précédent stade excepté la présence de petites cellules unipolaires ou bipolaires exprimant la GFAP (considérés comme des progéniteurs) ; **3) un stade de gliose protoplasmique** présent en phase subaiguë ou chronique caractérisé par la présence d'astrocytes étoilés exprimant fortement la GFAP et formant un réseau ; **4) un stade de gliose fibreuse** observé en phase chronique où les lésions sont envahies par des astrocytes matures et positifs à la GFAP. Ces stades ne sont pas exclusifs et peuvent être présents dans plusieurs lésions chez un même patient. Dans chacun de ces stades, l'immunoréactivité à l'AQP4, le recrutement de cellules immunes, le dépôt de complément et l'activité inflammatoire démyélinisante ont été évalués (**Figure 18**).

INTRODUCTION

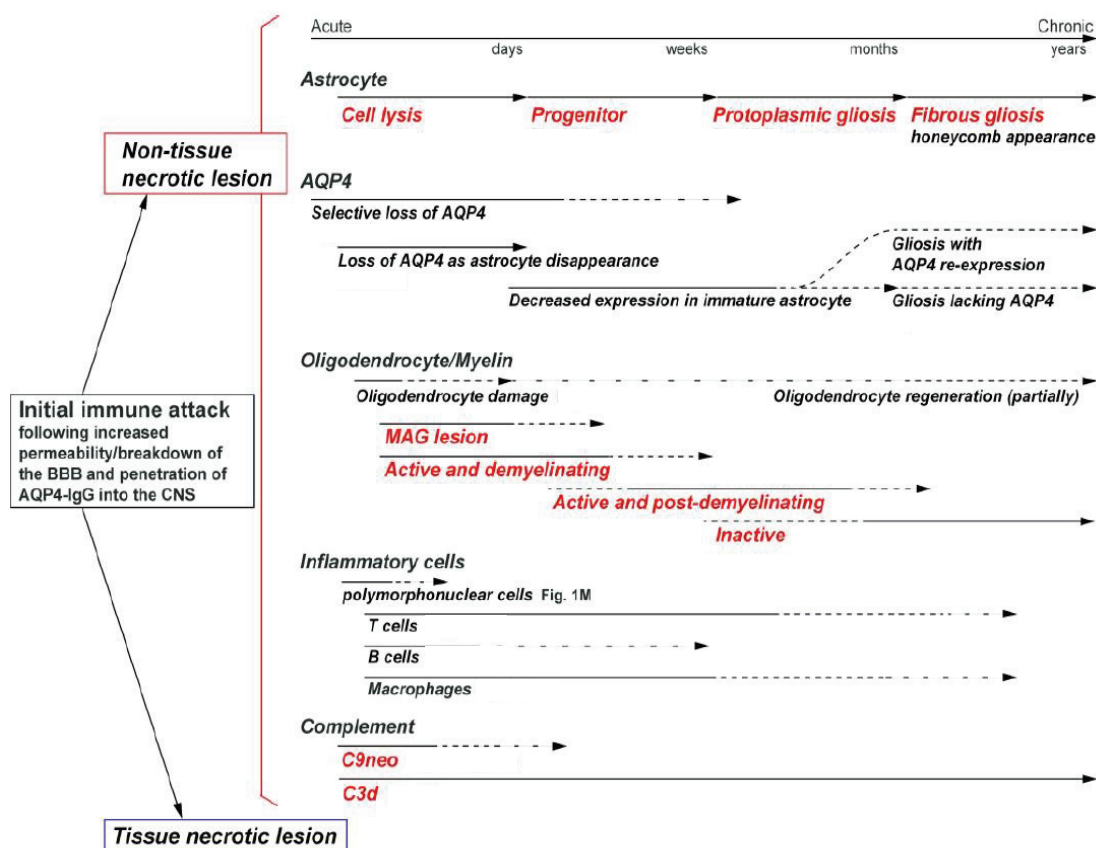


Figure 18. Résumé de l'avancée histopathologique des lésions dans le NMOSD (figure adaptée de (Takai et al., 2021)). Après l'apparition d'une première attaque, les astrocytes sont les premières cellules touchées avec une perte sélective et progressive d'AQP4. Les lésions sont envahies de granulocytes et de macrophages phagocytant les débris astrocytaires. Puis les protéines de myéline sont dégradées lorsque les lésions sont actives en commençant par les MAG, puis les autres à mesure que la pathologie s'installe. L'apoptose des oligodendrocytes, la dégradation de la myéline et la perte axonale surviennent entre la phase 1 et 2. Lors du passage d'une phase aiguë à chronique, les précurseurs astrocytaires prolifèrent et forment des lésions gliales fibreuses avec ou sans réexpression d'AQP4. Les lésions deviennent moins actives mais la régénération des oligodendrocytes n'est que partielle et la myéline et les axones sont perdus. Les cellules immunitaires ne sont relativement plus présentes et l'antigène C9neo (participant à la formation du complexe d'attaque membranaire) est dégradé dès le stade 2. La protéine du système du complément C3d (impliquée dans l'activation des lymphocytes B) semble persister en phase chronique.

ii. Pathogénicité des auto-anticorps

Une des plus grandes questions que se pose la communauté scientifique autour de la NMO est celle de la pathogénicité des auto-anticorps. De nombreuses preuves suggèrent que ces autoanticorps sont au centre du développement de cette maladie :

- les IgG-NMO sont retrouvées dans le sérum des patients avec une grande sensibilité et spécificité (Lennon et al., 2005).
- l'échange plasmatique s'avère être très efficace (Keegan et al., 2002).
- les autoanticorps ont été utilisés dans un grand nombre d'études afin de reproduire les symptômes de la NMO chez le rongeur (détail plus bas).

On pense notamment que le ciblage de l'AQP4 des astrocytes par les IgG-NMO est l'évènement initial déclenchant ensuite le recrutement du complément et des leucocytes, la rupture de la barrière sang-cerveau, puis s'ensuit la mort des oligodendrocytes, la perte de myéline et neuronale entraînant l'apparition des symptômes (Ratelade and Verkman, 2012).

o Transferts vers le modèle animal

La plupart des modèles d'études de la NMO, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, se base sur le transfert d'anticorps de patients, d'anticorps recombinants ou de lymphocytes T sensibles à l'AQP4. Une revue publiée en 2019 résume l'état des lieux des modèles conçus pour reproduire la pathologie chez le rongeur, les avancées scientifiques qu'ils ont pu apporter et leurs limites (Duan and Verkman, 2020). Jusqu'à présent, ces modèles n'existent que chez le rat ou la souris. Dans un premier temps, il s'agissait d'injecter les anticorps en intrapéritonéale (i.p.) dans des souris préalablement immunisées contre des protéines de myélines (MBP ou MOG) et dont la barrière sang cerveau a été fragilisée pour favoriser l'entrée des éléments du système immunitaire vers le SNC (Duan and Verkman, 2020). Il s'agit des modèles d'EAE couramment utilisés comme modèle murin de la SEP. Ces modèles reproduisaient bien les symptômes de la maladie et ont permis de montrer l'importance du complément dans le développement des lésions mais ne permettent pas d'étudier spécifiquement l'effet pathogène des IgG-NMO car on ne peut pas savoir si la démyélinisation provient des effets des IgG-NMO et de l'immunité humorale ou de l'immunité cellulaire induite après immunisation contre les protéines de myéline.

INTRODUCTION

Afin d'étudier le caractère pathogène des anticorps, différents modèles murins ont été conçus en injectant, soit directement des anticorps de patients (ou recombinants) dans le SNC, soit en périphérie. Le complément semblant jouer une part importante dans le développement des lésions, il a fallu ajouter du complément humain pour les injections chez la souris. La première étude ayant injecté directement des anticorps purifiés à partir de sérum de patients NMO avec du complément humain dans le SNC de souris a montré l'effet pathogène des anti-AQP4 (Saadoun et al., 2010). 12 heures après l'injection, une perte d'AQP4, une perte de myéline et de neurones, ainsi que du dépôt de complément ont été observés. 7 jours après l'injection répétée d'IgG-NMO, ils ont observé une perte d'AQP4 et de GFAP, de la démyélinisation, du dépôt de complément ainsi que le recrutement de leukocytes et macrophages et des pertes motrices. Ces résultats ont été reproduits chez le rat de la même façon mais sans ajouter de complément humain car le système du complément du rat est plus efficace que celui de la souris et peut être recruté par les anticorps humain (Asavapanumas et al., 2014a).

Afin d'étudier les effets pathogènes des auto-anticorps aux sites préférentiellement touchés chez les patients, des équipes ont choisi d'injecter les anticorps dans la moelle épinière (Geis et al., 2015; Zhang and Verkman, 2014) ou au niveau des yeux, dans la vitrée ou dans les nerfs optiques (Asavapanumas et al., 2014b; Matsumoto et al., 2014; Zhang et al., 2018) et ont permis de montrer une inflammation avec recrutement de leukocytes/macrophages et complément, une perte d'AQP4, une atteinte astrocytaire et une démyélinisation. Etant donné que les patients présentent également des anti-AQP4 dans le LCS, un groupe danois a évalué l'effet pathogène d'anticorps de patients NMO injectés en intrathécale (via la cisterna magna) accompagnés de complément humain. Ils ont pu montrer que ces anticorps provoquent une perte d'AQP4 et de GFAP au niveau de l'épendyme avec un dépôt de complément et de la démyélinisation dans le cervelet, le tronc cérébral et autour des ventricules (Asgari et al., 2013) ; une astrocytopathie périvasculaire avec dépôt de complément et rupture de la barrière hématoencéphalique (Asgari et al., 2015) ; une atteinte du nerf optique traduite par une perte d'AQP4 et de GFAP, du dépôt de complément et une démyélinisation (Soerensen et al., 2021) le tout de façon dépendante du complément.

Toutes ces études ont pour contrainte d'introduire directement les IgG-NMO dans le SNC. Cependant, elles ne reproduisent pas fidèlement la pathologie car les autoanticorps proviennent de la périphérie. Afin de reproduire les lésions de la NMO en rendant séropositifs des rats, des équipes ont injecté en i.p. les IgG-NMO afin de produire un passage vers le SNC par la barrière

sang-cerveau. En fragilisant cette barrière avec une aiguille dans le parenchyme (Asavapanumas and Verkman, 2014) ou de façon non invasive par ultrason (Yao et al., 2019), l'entrée des anticorps dans le SNC a induit la baisse d'expression d'AQP4, une astrocytopathie, le recrutement de leukocytes/macrophages, du dépôt de complément et une démyélinisation reproduisant ainsi les caractéristiques de la NMO mais seulement localement, là où la barrière sang-cerveau fut fragilisée.

Un modèle d'injection continue pendant 7 jours des anticorps directement dans le LCS a été développé au laboratoire afin d'étudier l'effet pathogène des anticorps seuls, c'est-à-dire sans complément, par la délivrance des anticorps par une canule implantée dans les ventricules latéraux et reliée à une pompe osmotique contenant les anticorps (Marignier et al., 2016). Au bout de 7 jours, une baisse d'expression d'AQP4 et une perte de myéline a été observée dans les nerfs optiques et la moelle épinière. Durant les 14 jours suivant l'arrêt de l'injection, les rats ont développé une perte motrice testée en comportement en parallèle d'une atteinte axonale. Aucun dépôt de complément ou de recrutement de leukocytes/macrophages n'a été observé suggérant que les IgG-NMO peuvent avoir un effet pathogène seules, en lien au moins partiellement avec une modulation de l'activité de l'astrocyte.

◦ *Mécanismes d'action des auto-anticorps*

Les différents modèles de la pathologie, que ce soit chez l'animal ou en culture, ont permis de décrire d'un point de vue mécanistique comment les autoanticorps anti-AQP4 provoquent le développement des symptômes clés de la NMO.

Recrutement du complément et des leukocytes/macrophages

Dans une série d'expérimentations, il a été suggéré que les anticorps anti-AQP4 fixent l'astrocyte et par effet bystander, provoquent la mort des oligodendrocytes et des neurones par action du système inflammatoire (**Figure 19**). Important modulateur du complément, la glycoprotéine CD59 (inhibiteur du complément) est exprimée par les astrocytes mais pas par les oligodendrocytes et les neurones, les rendant sensibles au complément recruté par les anticorps pour attaquer les astrocytes (Verkman, Duan 2018). Quand le complément est recruté sur la partie Fc récepteur des anticorps fixant l'AQP4 des astrocytes, le complexe d'attaque membranaire (MAC) est formé par l'assemblage des différents composants du complément et induit une mort cellulaire par perforation. Les oligodendrocytes et les neurones aux alentours des astrocytes ciblés par les anti-AQP4 n'exprimant pas CD59, ils sont indirectement ciblés par

En présence de complément, les astrocytes perdent rapidement leurs adhérences, gonflent et sont détruits (Nishiyama et al., 2016). Les auteurs en ont donc conclu que les deux mécanismes d'action des anticorps étaient possibles et n'étaient pas exclusifs. D'ailleurs, la diversité des lésions retrouvées chez les patients renforce cette conclusion (Misu et al., 2013; Takai et al., 2021). Lorsque le complément ou les cellules immunitaires effectrices sont recrutés, les anticorps présentent un effet destructeur sur leur cible, alors que sans ces éléments, les anticorps vont plutôt moduler les fonctions cellulaires (Brimberg et al., 2015; Diamond et al., 2009).

Au laboratoire, nous nous sommes focalisés sur le rôle modulateur des IgG-NMO et en avons étudié le caractère pathogène en purifiant les IgG des plasmaphèreses de patients NMO. Dans un premier temps, nous avons montré que ces IgG-NMO provoquent la perte d'expression de l'AQP4 et du transporteur de glutamate GLT1, ainsi qu'une réduction de son activité de recapture du glutamate sur des cultures primaires d'astrocytes (Marignier et al., 2010). En traitant par des IgG-NMO des co-cultures d'astrocytes et d'oligodendrocytes ou des nerfs optiques, nous avons également montré une mort d'oligodendrocytes et une démyélinisation. Ces effets sont indirectement induits par l'altération des fonctions astrocytaires qui entraîne l'augmentation de la concentration en glutamate extracellulaire ayant un effet excitotoxique (Marignier et al., 2010). Pour poursuivre, l'injection continue pendant 7 jours d'IgG-NMO dans le LCS de rat a permis de confirmer *in vivo* ces effets modulateurs pathogènes. En effet, les IgG-NMO ont induit un phénotype astrocytaire dysfonctionnel avec baisse d'expression d'AQP4, de GLT1 et une réduction de la recapture du glutamate associé à une démyélinisation et une perte axonale dans les nerfs optiques, la moelle épinière et le corps calleux, ainsi que des troubles moteurs chez les rats (Marignier et al., 2016). Afin de mieux comprendre le lien entre la fixation des IgG-NMO sur les astrocytes et la démyélinisation, nous avons également montré que les IgG-NMO altèrent les communications intercellulaires et extracellulaires orchestrées par les jonctions communicantes (Richard et al., 2020).

d. Origine de l'auto-immunité

Quels sont les facteurs qui entraînent la formation d'une auto-immunité contre l'AQP4 chez les patients atteints de NMO ? C'est une grande question qui est encore aujourd'hui ouverte.

i. Facteurs de prédisposition génétique

La piste de la prédisposition génétique est peu probable étant donné qu'environ seulement 3% des patients ont un membre de leur famille atteint (Papadopoulos and Verkman, 2012). Aucune variation dans la séquence du gène de l'AQP4 n'a été associée avec l'apparition de la maladie (Matiello et al., 2011). Cependant, des variants génétiques des gènes HLA (*human leukocyte antigen*), qui codent pour les complexes majeurs d'histocompatibilité, sont des facteurs de prédisposition (Blanco et al., 2011). A noter que la fréquence d'apparition de ce variant génétique de HLA est plus faible chez les patients NMO que pour la SEP (Zéphir et al., 2009). Plus récemment, une analyse génomique des variations à l'échelle nucléotidique (SNPs pour *single nucleotide polymorphisms*) et des variations dans le nombre de copies (CNV pour *copy number variations*) a été réalisée sur une grande cohorte aux Etats-Unis (Estrada et al., 2018). Encore une fois, ce sont des variations SNPs aux niveaux des gènes HLA, notamment l'allèle HLA-DRB1*03 :01, qui ont été retrouvées chez les patients NMO avec et sans anti-AQP4. De même, des SNP dans le gène HLA et dans le gène du canal potassique KCNMA1 sont considérés comme des facteurs de risques au Japon (Matsushita et al., 2020). De plus, des CNVs au niveau du gène codant pour le composant 4 du complément (C4) ont été trouvées uniquement pour les patients avec anti-AQP4. Cette différence de facteurs de risque entre les patients séropositifs pour l'anti-AQP4 et les séronégatifs offre une première piste pour comprendre la différence entre ces deux types de patients atteints de NMO. D'ailleurs, les profils génomiques des patients NMO sont plus proches des patients ayant un lupus érythémateux systémique que des patients SEP, confirmant d'une autre manière la distinction entre la pathogenèse de la SEP et de la NMO. Finalement, même si ces variations génétiques forment des facteurs de risque significatifs d'apparition de la NMO, elles ne peuvent expliquer à elles-seules la formation d'une auto-immunité, notamment contre l'AQP4.

ii. Interactions entre le microbiome, l'alimentation et le système immunitaire

Les recherches se sont orientées vers les interactions du microbiome intestinal et/ou de l'alimentation avec le système immunitaire. Comme pour beaucoup d'autres maladies auto-immunes à auto-anticorps, l'immunisation peut avoir lieu par « mimétisme moléculaire », c'est-à-dire lorsque deux molécules partagent une configuration protéique similaire. Partant de cette hypothèse, plusieurs études ont montré des similarités de séquences en acides aminés entre l'AQP4 et des protéines membranaires de bactéries commensales (Jarius et al., 2011; Ren et al., 2012; Varrin-Doyer et al., 2012) ou de plantes (Vaishnav et al., 2013). Il a été montré notamment que la bactérie commensale *Clostridium perfringens*, qui exprime l'une de ces protéines (l'ABC-TP pour *adenosin triphosphate-binding cassette transporter permease*), est en surpopulation chez les patients NMO (Cree et al., 2016). Également, les auteurs ont montré une cross-réactivité de ce peptide bactérien avec l'AQP4 en montrant une prolifération des LT de patients NMO après exposition au peptide. Ces LT expriment une polarisation vers le type Th17 connue pour être impliquée dans la pathogénicité de la NMO et dans les phénomènes auto-immuns généralement (Varrin-Doyer et al., 2012). L'organisme possède des moyens pour réguler l'activité immunitaire contre des antigènes du soi (ou ici proche du soi), notamment via les lymphocytes T régulateurs (LTreg). Mais une dérégulation de la balance de production des LTreg et LTh17, deux voies de différenciation intimement liées, pourrait avoir lieu par une hausse de la présence d'acides gras à longue chaîne et une baisse d'acides gras à chaîne courte qui stimulerait la prolifération des LTh17 au détriment des LTreg (Zamvil et al., 2018). Soutenant cette idée, une étude chinoise a montré qu'une baisse en acides gras à chaîne courte est en lien avec la prolifération de *Streptococcus* dans les matières fécales de patients NMO (Gong et al., 2019). En lien avec cette dernière observation, une équipe coréenne a montré l'association entre un niveau élevé en triglycérides et un bas niveau de lipoprotéine de haute densité (HDL, c'est-à-dire les transporteurs du « bon » cholestérol) aux attaques dans la NMO, sachant qu'un niveau élevé en cholestérol a déjà été associé à d'autres maladies auto-immunes et que l'hypercholestérolémie augmente les réponses inflammatoires (Cho et al., 2020). Ces données supportent l'hypothèse qu'une accumulation de facteurs environnementaux, tels qu'une alimentation particulière associée à une dérégulation du microbiome, et possiblement avec des prédispositions génétiques, pourrait alors entraîner une immunisation contre l'AQP4. Même si l'hypothèse d'un lien entre une dérégulation du microbiome intestinal et l'auto-

INTRODUCTION

immunité est très attractive, ces théories n'expliquent pas ni comment ces lymphocytes se retrouvent à traverser la barrière hématoencéphalique, ni pourquoi seule l'AQP4 du SNC est ciblée, ou ni comment l'auto-immunité est produite pour les patients NMO séronégatifs pour l'anti-AQP4.

iii. L'origine de l'auto-immunité est-elle dans le SNC ?

Il a été proposé que l'auto-immunité dirigée contre l'AQP4 pourrait subvenir de la présence anormale d'AQP4 dans le LCS après des dommages causés sur l'épendyme. Les cellules épendymaires dénudées libéreraient de l'AQP4 dans le LCS, qui se retrouverait alors dans des zones où celle-ci n'est pas retrouvée habituellement et causerait une réaction auto-immune contre l'AQP4 pouvant être à l'origine de la NMO et de certains cas d'hydrocéphalies (Castañeyra-Ruiz et al., 2014). Cette hypothèse adresse la question de la dynamique d'apparition des auto-anticorps pendant la progression de la maladie : sont-ils produits en périphérie ou dans le SNC ? Allant dans le sens d'une production intrathécale, il a été montré que le titre en IgG-NMO dans le LCS était augmenté pendant les attaques (Sato et al., 2014). Aujourd'hui, on ne sait pas si ces IgG proviennent du sang à la suite d'une rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) ou s'ils sont produits localement. Une seule étude de cas a reporté l'apparition de débris d'AQP4 dans le LCS avant le développement de la NMO (Bejerot et al., 2019), mais aucune étude à ce jour n'a recherché la présence des IgG avant/après attaques dans le sérum et le LCS car on ne peut pas prévoir quand un patient fera une attaque et les ponctions lombaires sont lourdes et douloureuses.

e. Traitements

Les atteintes aux nerfs optiques et à la moelle épinière dans le cadre de la NMO peuvent dramatiquement évoluer vers des dommages irréversibles si un traitement n'est pas rapidement mis en place. Dans un premier temps, le traitement des poussées consiste à administrer de fortes doses de corticostéroïdes (prednisolone) et à utiliser l'échange plasmatique (ou plasmaphérèse), si ce n'est pas suffisant (Kimbrough et al., 2012). Pour le traitement à long terme de la pathologie et la prévention des rechutes, le rituximab (anti-CD20 réduisant le nombre de lymphocytes B), l'azathioprine ou le mycophénolate mofetil (deux inhibiteurs généraux du système immunitaire) ou d'autres immunosuppresseurs sont utilisés (Kimbrough et al., 2012).

Trois autres traitements ont été récemment approuvés par la FDA (*Food and Drug Administration*) : l'eculizumab (inhibiteur du complément), le satralizumab (antagoniste du récepteur à l'IL-6) et l'inebilizumab (anti-CD19 réduisant le nombre de plasmocytes) offrant plus d'options lorsque les autres thérapies sont peu efficaces, ou provoquent trop d'effets secondaires (Jarius et al., 2020).

f. Vers une « épendymocytopathie » ?

Nous avons vu que la NMO est considérée comme une astrocytopathie. Cependant, l'épendyme peut également être la cible des IgG-NMO. En effet, les cellules épendymaires qui tapissent les ventricules et le canal central de la moelle épinière expriment aussi fortement l'AQP4, notamment à la membrane basolatérale des cellules (Nielsen et al., 1997). De plus, la présence des IgG-NMO dans le LCS des patients a été mise en corrélation avec l'activité de la pathologie, notamment la présence de pléiocytose, et du taux d'IL6 et de GFAP dans le LCS (Sato et al., 2014). Des données IRM montrent chez certains patients une prise de contraste au niveau des ventricules sous forme de pinceau (« *pencil-thin* »), notamment au niveau des ventricules latéraux bordant le corps calleux et du 3^{ème} ventricule, suggérant une atteinte inflammatoire dans ces régions (**Figure 20A**, (Banker et al., 2012; Long et al., 2014)). En ce sens, des lésions péri-épendymaires observées le long des 3^{ème} et 4^{ème} ventricules et des ventricules latéraux en neuroimagerie IRM ont été ajoutées dans les critères diagnostiques (Wingerchuk et al., 2015). Récemment, les chercheurs de la Mayo Clinic ont rapporté un recrutement de granulocytes et de complément, ainsi que de la réactivité microgliale au niveau de l'épendyme de 16 patients autopsiés dans une étude histologique (**Figure 20B**, (Guo et al., 2017)). Les cellules épendymaires présentent également des atteintes morphologiques (atrophie et aplatissement) et parfois même des portions entières d'épendymocytes sont dénudées. Parmi ces 16 patients, 56% présentent des pertes d'AQP4 épendymaire localisées, avec parfois une extension de la perte dans les astrocytes sous-jacents. Toutes ces données montrent que l'épendyme est atteint dans la NMO. S'en suit alors la question de la pathogénicité des auto-anticorps présents dans le LCS de ces patients. Quels sont les mécanismes biologiques impliqués et quels sont les conséquences du ciblage de l'épendyme par les IgG-NMO sur les fonctions physiologiques entretenues par celui-ci ? Répondre à ces questions permettrait d'élargir la compréhension des atteintes gliales dans la NMO et du rôle que possède l'épendyme dans les maladies neuroinflammatoires.

INTRODUCTION

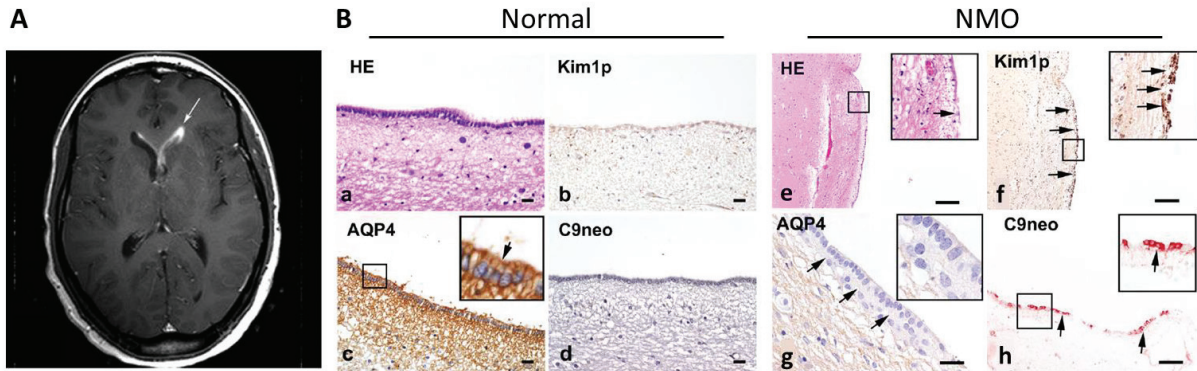


Figure 20. Atteintes épendymaires chez les patients NMO. A) Inflammation du ventricule latéral en IRM (Banker et al., 2012). B) Analyse histologique post-mortem de tissu de patients NMO en comparaison avec des sujets sains montrant des altérations morphologiques et des portions dénudées de l'épendyme (e), une activation microgliale avec le marquage Kim1p (f), une perte d'AQP4 (g) et du dépôt de complément (h)(Guo et al., 2017).

Questions scientifiques posées et objectifs du projet

Dans ce contexte, nous émettons l'hypothèse que les anticorps de patients atteints de NMO altèrent les fonctions biologiques régulées par l'épendyme. L'objectif de ce projet a été d'évaluer cette hypothèse en évaluant les effets d'IgG purifiées de patients NMO (IgG-NMO) à deux niveaux : 1) au niveau des cellules épendymaires directement et 2) dans l'espace sous-ventriculaire. Pour cela, un modèle *in vitro* de culture primaire de cellules épendymaires de rat, un modèle de culture *ex vivo* d'explants de ventriculaires latéraux de rats adultes et un modèle *in vivo* par injection continue dans les ventricules latéraux d'IgG-NMO pendant 7 jours chez le rat, ont été utilisés.

Les méthodes utilisées et les résultats obtenus durant cette thèse seront présentés en deux parties distinctes :

1. Étude des effets des IgG-NMO sur la morphologie et la fonction des cellules épendymaires sur les modèles *in vitro* et *ex vivo* : Article « *Ependyma: a new target for autoantibodies in Neuromyelitis Optica?* ».
2. Analyses complémentaires et résultats préliminaires des effets des IgG-NMO sur les modèles *in vitro* et *ex vivo* et des effets à long terme avec le modèle *in vivo*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Patients et échantillons plasmatiques

Nous avons inclus sept patients faisant partie de la cohorte nationale NOMADMUS dont le diagnostic de NMO a été établi selon les critères internationaux, et testés positifs aux anticorps anti-AQP4 (Wingerchuk et al., 2015). Elles étaient toutes des femmes ayant entre 18 à 75 ans au moment du prélèvement et ont été traitées par une plasmaphérèse pour des épisodes survenus entre 2011 et 2017. Les principales données cliniques comprenant la présentation clinique, le nombre d'épisodes depuis le début de la maladie, le score de handicap Expanded Disability Status Scale (EDSS), le traitement de fond et la présence ou non d'atteinte ventriculaire à l'IRM au moment du prélèvement sont résumés (**Table 3**). La patiente n°2 en particulier présentait des lésions périventriculaires visibles à l'IRM avant la plasmaphérèse, notamment au niveau des ventricules latéraux et du 4^{ème} ventricule avec un élargissement du ventricule latéral côté lésion (**Figure 21**).

Numéro	Sexe	Age au prélèvement	Névrite optique	Myélite transverse	Syndrome de l'area postrema	Nombre de poussées	EDSS au prélèvement	Traitement de fond	IRM : Atteinte ventriculaire
1	F	50	Oui	Oui	Non	7	3,5	Imurel	Non
2	F	18	Oui	Oui	Non	10	8	CellCept	Oui
3	F	42	Oui	Oui	Non	2	2	Aucun	Non
4	F	31	Oui	Oui	Non	3	2	Aucun	Non
5	F	53	Non	Oui	Non	2	7	CellCept	Non
6	F	75	Oui	Oui	Non	9	5	Imurel	Non
7	F	29	Oui	Oui	Non	1	7	Aucun	Non

Table 3. Données cliniques des patients NMO. Les données cliniques présentées ici concernent les patients NMO qui ont eu un échange plasmatique et dont les plasmas ont été utilisés durant ma thèse. Ces informations sont valables au moment du prélèvement.

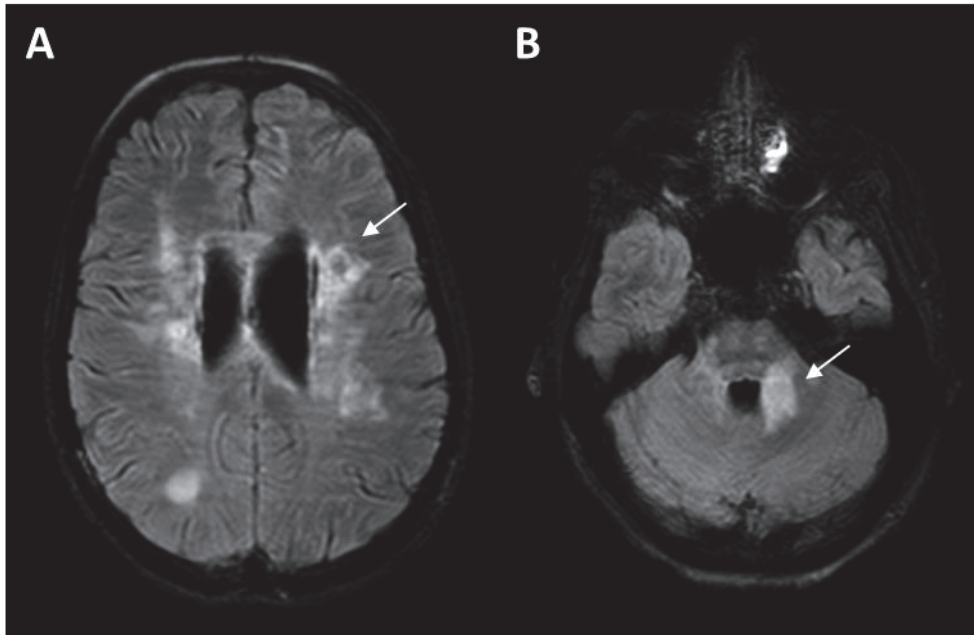


Figure 21. Atteintes ventriculaires et périventriculaires chez la patiente n°2. IRM cérébrales réalisées un an avant la plasmaphérèse de la patiente n°2 montrant des lésions périventriculaires (flèches blanches) au niveau des ventricules latéraux (A) et au niveau du 4^{ème} ventricule (B).

Les plasmaphérèses ont été réalisées aux Hospices Civils de Lyon (HCL) et ont ensuite été stockées à -80°C au Centre de Ressource Biologique (CRB) de Lyon NeuroBioTec. Les plasmaphérèses ont ensuite été transférées au CRNL où nous avons échantillonné, concentré et purifié les prélèvements pour obtenir uniquement les IgG. Les IgG ont été purifiées avec des billes couplées avec la protéine-A Sepharose (P9424, Sigma-Aldrich) reconnaissant la partie Fc des IgG et éluées en colonne avec de la glycine 0,1M pH 2,8. Les échantillons ont été ensuite neutralisés avec du tampon Tris 1,5M pH 8,8 et dialysés la nuit avec du milieu de culture DMEM. La concentration des IgG-NMO après purification était comprise entre 2 et 10 mg/ml. Les pools d'IgG purifiées de chaque patiente (contenant en partie les anti-AQP4) ont ensuite été nommées NMO₁-IgG à NMO₇-IgG. Comme condition contrôle, nous avons utilisé un pool d'IgG provenant de donneurs sains et fournis par l'Établissement du Sang Français (EFS) nommés CTRL-IgG. Les IgG purifiées ont été diluées à 0,2 mg/ml pour utilisation dans nos modèles de culture et 2 mg/ml *in vivo*. Leur capacité à fixer les cellules épendymaires en culture ou du rat a été évaluée en les incubant pendant 24 heures avec des cellules épendymaires de culture primaires fixées ou des coupes de cerveau de rats adultes, qui ont ensuite été marqués pour les IgG humaines et l'AQP4 (Figure Supplémentaire 1, Bigotte et al., under review).

2. Modèles d'étude de l'épendyme : généralités et présentation des techniques utilisées au laboratoire

a. Culture primaire de cellules épendymaires

Une première méthode pour cultiver les cellules épendymaires a été décrite par M. Weibel (Weibel et al., 1986). Cette méthode consiste à dissocier mécaniquement le cerveau de rats nouveau-nés afin d'obtenir des explants de petite taille et de les ensemercer sur des supports de culture couverts de fibronectine. Les cellules sont ensuite cultivées dans un milieu sans sérum, contenant de l'insuline, de la transferrine et de l'albumine de sérum bovin permettant de favoriser la croissance des épendymocytes par rapport aux autres cellules neurales. Plus tard, les utilisateurs de cette technique ont ajouté de la thrombine dans leur milieu de culture pour accroître de façon importante la prolifération des cellules épendymaires au début de la culture (Tritschler et al., 2007). Les cellules épendymaires croissent alors à partir de ces explants formant des plages de cellules adhérentes et jointives reconnaissables grâce à leur morphologie et au battement ciliaire (**Figure 22**). L'inconvénient de cette méthode est que d'autres cellules sont présentes en dehors de ces plages rendant la culture non pure d'environ 10%. D'autres méthodes permettent d'obtenir des cultures plus pures (Grondona et al., 2013; Pfenninger et al., 2011), cependant, elles ne permettent pas d'obtenir des cellules adhérentes et jointives, une des caractéristiques majeures de ces cellules épendymaires. Le groupe de N. Spassky a développé une méthode permettant d'obtenir une bonne pureté de cellules et a obtenu de bons résultats sur la motilité ciliaire (Delgehr et al., 2015; Mahuzier et al., 2018). Cette technique requiert de disséquer les ventricules des rats nouveaux-nés de façon fine.

J'ai choisi de développer au laboratoire la première méthode décrite, avec l'ajout de thrombine pour accroître la taille des plages d'épendymocytes (Tritschler et al., 2007).

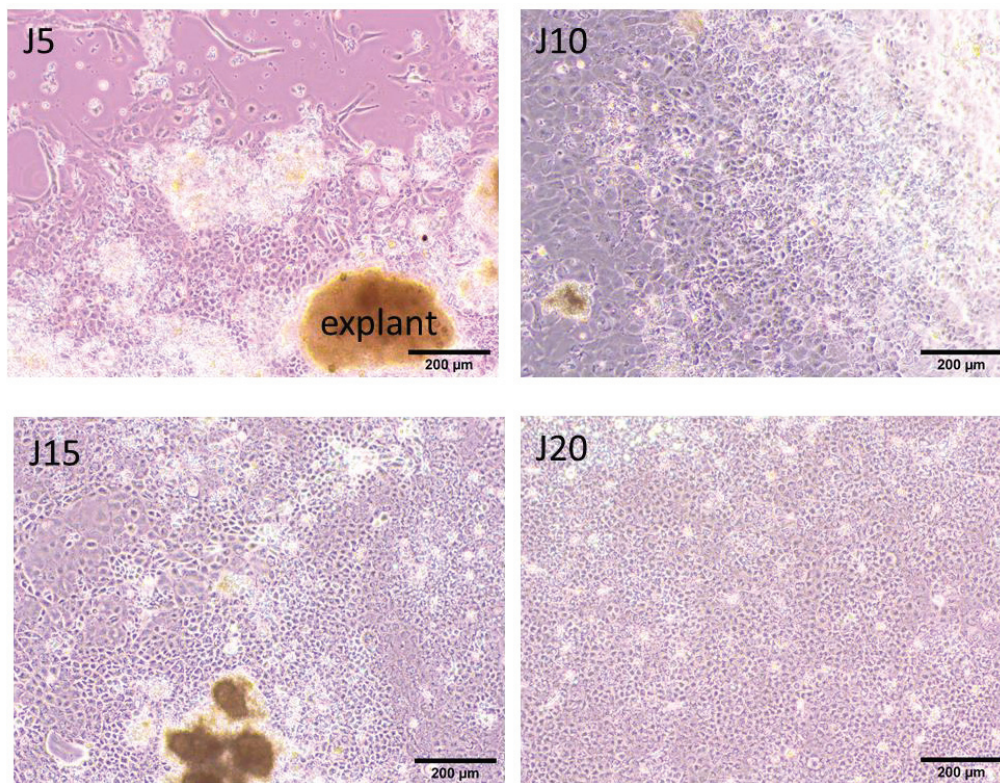


Figure 22. Croissance des cultures primaires d'épendymocytes. Lors de la mise en culture, des explants se déposent au fond des supports de culture d'où vont progressivement croître les cellules épendymaires. A J5, on voit les précurseurs sortir des explants pour remplir progressivement toute la surface entre J10 et J15. Dans cet intervalle, on enlève la thrombine du milieu pour ralentir la croissance. Les cellules épendymaires vont alors devenir mature et à J20, la plupart des cellules possèdent des cils moteurs visibles au microscope par la vibration du milieu au-dessus des cellules.

L'obtention de nos cultures se fait donc de la façon suivante. Jusqu'à six cerveaux de rats Sprague Dawley (JanvierLabs) nouveau-nés ont été disséqués autour des ventricules et groupés dans du MEM (glucose 1 g/L, sans glutamine, 21009 ThermoFischer Scientific) supplémenté avec de l'albumine de sérum bovin (BSA) 50 µg/mL (A0281, Sigma-Aldrich), de l'insuline bovine 6,25 µg/ml (I1882, Sigma-Aldrich), de la transferrine 12,5 µg/ml (T1283, Sigma-Aldrich), 1% de pénicilline/streptomycine (15140-122, Gibco) et de la Fungizone 40 µg/ml (Amphotericin B, 15290-026, Gibco). Les cerveaux ont été rincés deux fois avec le même milieu et ont été doucement dissociés mécaniquement par cinq passages avec une aiguille G-18 et cinq passages avec une aiguille G-21. Les cerveaux dissociés ont été dilués dans 4 mL de milieu/cerveau etensemencés sur des lames de culture à deux chambres Dlux (30402, SPL Life Science) préalablement couvertes avec de la fibronectine bovine 40 µg/mL (33010-018, Gibco) pour 2-3 heures à 37°C, rincées une fois avec de l'eau stérile et séchées pendant 45 minutes à

MATÉRIEL ET MÉTHODES

l'air libre. Le milieu de culture a été changé 2 jours plus tard avec du MEM supplémenté comme indiqué plus haut et changé deux fois par semaine ensuite. De la thrombine humaine 0,5 UI/mL (T6884, Sigma-Aldrich) a été ajoutée dans le milieu entre le jour 2 et 14 pour augmenter la croissance cellulaire.

b. Dissection des murs ventriculaires

Classiquement, il est possible d'étudier l'épendyme en réalisant des coupes sériées coronales ou sagittales de cerveau. L'expression de protéines peut alors être analysée par divers marquages immunohistochimiques ou immunofluorescents par une vue latérale de celui-ci. Il est possible de visualiser la répartition d'un marquage sur tous les ventricules latéraux et ses trois murs (latéraux, médiaux et dorsaux) par reconstruction 3D (Zweifel et al., 2018). Mais, afin d'étudier le marquage de molécules comme les corps basaux des cils ou les jonctions intercellulaires, il est nécessaire d'avoir une vue « en-face » du mur ventriculaire. Une technique de dissection permettant d'extraire les murs ventriculaires a été publiée en premier lieu par l'équipe d'A. Alvarez-Buylla afin d'étudier l'organisation architecturale en vue « en-face » des cellules épendymaires et des progéniteurs neuraux des ventricules latéraux de rongeurs (Mirzadeh et al., 2008, 2010b; Sawamoto, 2006). Les différentes étapes permettant d'obtenir les wholemounts sont décrites ici (**Figure 23**) et ont été inspirées de (Delgehr et al., 2015; Mirzadeh et al., 2010b). La dissection des 3^{ème} et 4^{ème} ventricules (Faubel et al., 2016; Mirzadeh et al., 2017) et l'épendyme bordant les murs du canal central de l'épendyme (Alfaro-Cervello et al., 2012) est également possible mais n'a pas été réalisée pendant ma thèse. Une fois les ventricules disséqués, les wholemounts des murs ventriculaires latéraux peuvent être utilisés en *ex-vivo* pour analyser le flux épendymaire ou pour des analyses immunohistologiques. Il est également possible de les mettre en culture pendant quelques jours afin d'étudier l'effet d'un traitement (Mahuzier et al., 2018). Pour étudier les effets des IgG-NMO, les wholemounts ont été incubés pendant 24 heures à 37°C 5% CO₂ dans du DMEM Glutamax (61965, Gibco) + 1% de pénicilline/streptomycine + 10% de sérum de veau fœtal en plaques 12 puits avec ou non les IgG à 0,2 mg/mL. Pour les cultures d'explants, nous nous sommes concentrés sur les effets des IgG-NMO de la patiente n°2 qui présentaient le plus d'effets sur les cultures et des altérations périventriculaires à l'IRM afin de réduire le nombre d'animaux.

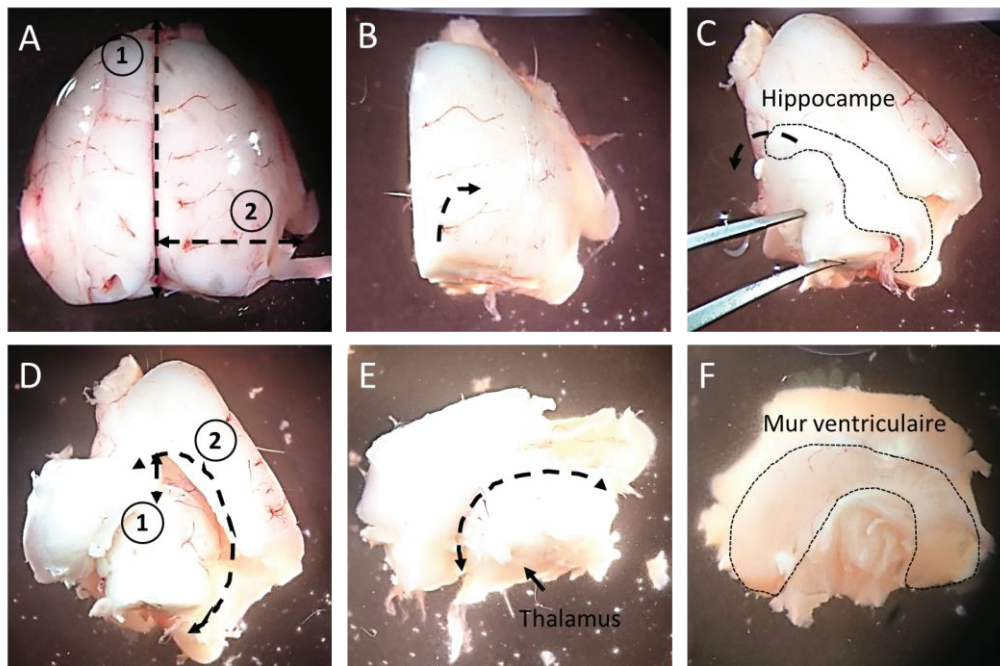


Figure 23. Dissection wholemount du ventricule latéral. A) Les deux hémisphères du cerveau sont séparés et une petite découpe postérieure est réalisée pour rendre accessible l'hippocampe. B) L'hémisphère droit est légèrement penché. C) Les adhérences entre l'hippocampe et le néocortex sont détachées afin de pouvoir l'extraire. D) Une fois extrait, le mur latéral du ventricule latéral est visible au fond du ventricule. L'hippocampe est séparé et une partie du néocortex est découpée pour dévoiler le mur ventriculaire. E) Il ne reste plus qu'à découper le thalamus pour obtenir un wholemount du ventricule latéral avec le mur épendymaire en vue « en face » (F).

3. Méthodes d'étude des effets à court terme des IgG-NMO sur l'épendyme par approche *in vitro* et *ex vivo*

a. Immunomarquages

Les procédures pour marquer les cellules épendymaires des cultures primaires et des wholemounts sont très similaires et diffèrent uniquement sur la durée de certaines étapes. Les échantillons ont été fixés au PFA 4% avec 0,1M de tampon phosphate pendant 10 minutes à température ambiante ou au méthanol à -20°C pendant 20 minutes selon la sensibilité de l'antigène. Les cellules ont été ensuite rincées trois fois 5 minutes et les wholemounts 15 minutes avec du PBS 1X (Phosphate Buffer Saline). Ensuite, les échantillons ont été incubés en solution de saturation composée de 10% de sérum de chèvre normale (NGS, S-1000, Eurobio) dilué dans du PBS 1X avec ou non du Triton 0,1-0,3% selon la sensibilité de

MATÉRIEL ET MÉTHODES

l'antigène. Après saturation, les échantillons ont été incubés la nuit à 4°C avec les solutions d'anticorps primaires dilués dans la solution de saturation. Les cellules ont été rincées trois fois 5 minutes et les wholemounts deux fois rapidement puis trois fois 20 minutes avec du PBS 1X avec ou sans triton et marqués avec les anticorps secondaires dilués dans la solution de saturation pendant 1 heure à température ambiante. Les informations concernant les anticorps primaires et secondaires sont contenues dans la Table 1 de l'article (Bigotte et al., under review). Les cellules ont été rincées trois fois 5 minutes et les wholemounts deux fois rapidement puis trois fois 20 minutes avec du PBS 1X et les noyaux ont été marqués au DAPI pendant 10 minutes. Après trois rinçages au PBS 1X, les lames ont été montées avec du liquide de montage Permafluor (TA-030-FM, ThermoFischer Scientific). Après marquage, les wholemounts ont été disséqués finement pour retirer les morceaux de tissu restant autour des ventricules afin d'isoler le mur ventriculaire et obtenir du tissu d'une épaisseur d'environ 200-300 µm. Les murs ventriculaires ont été ensuite déposés sur une lame et montés avec une lamelle et du liquide de montage. Après séchage, les marquages ont été analysés au microscope à épifluorescence (Zeiss ImagerM2) ou confocal (Zeiss LSM800).

b. Analyse du flux épendymaire

La méthode d'analyse du flux épendymaire décrite ici a été inspirée par un article publié précédemment (Mirzadeh et al., 2010b). Les wholemounts traités pendant 24 heures ou non avec les IgG-NMO ou IgG-CTRL ont été placés et fixés avec des seringues sur des boîtes de Petri coulées avec du Sylgard 184 et contenant du milieu L15 Leibovitz à 37°C placées sous un vidéomicroscope (AxioZoom V16, Zeiss). Des capillaires en verre (1,0 mm O.D. x 0,58 mm I.D.) ont été étirés et polis afin d'obtenir un biseau de 100 µm de diamètre interne. Les capillaires ont été placés dans un micro-injecteur à huile (Narishige) contrôlé avec un micromanipulateur et ont été chargés avec des microbilles fluorescentes (Yellow Green 2 µm diameter latex microspheres, 18338-5, Polysciences) diluées au 1/3200^e dans de l'eau stérile avec 5% de glycérol. La position de la pointe au-dessus du wholemount a été ajustée sous le microscope. Un grossissement de 50x, une résolution de 512x512 pixels et une fréquence de 5 images/s ont été paramétrés pour l'enregistrement des vidéos avec le logiciel Zen (Zeiss). Pour chaque séquence vidéo, une quantité d'environ 0,02 µL de solution contenant les microbilles a été déposée localement, juste au-dessus de la surface du ventricule. Après les enregistrements, certains wholemounts ont été fixés pour des marquages immunofluorescents.

c. Séquençage ARN et analyses bio-informatiques

L'extraction d'ARN, le séquençage et le rendu des tables de transcrits avec analyse différentielle ont été réalisés par la plateforme ProfileXpert et Virosan3D. Après 24 heures de traitement, l'ARN des cellules épéndymaires en culture primaire a été isolé et purifié avec un kit de purification sur colonne chromatographique (Norgen 51800). La construction des librairies a été faite à partir de 5 ng d'ARN total en utilisant le kit NEBNext® Single Cell/Low Input RNA Library Prep Kit pour Illumina® (NEB) selon les instructions du fournisseur. Chaque groupe de librairie a été déposé sur une flow cell Illumina High Output et lu avec l'Illumina Nextseq500 avec une seule lecture à 75 pb. Les images et l'association des bases ont été réalisées avec les logiciels Illumina NSC 2.0.2 et RTA 2.4.11 implantés dans la machine. Le formatage, le démultiplexing et la génération des fichiers finaux ont été faits avec Bcl2fastq v2.17.1.14. Le trimming des transcrits a été fait avec le logiciel Cutadapt (version 1.9.1) (Martin, 2011). L'abondance des transcrits a été estimée avec le logiciel Kallisto (version 0.44.0) et à partir du transcriptome *Rattus norvegicus* (Ensembl release 101 – Rno_6.0 – cDNA). Ensuite, les transcrits différentiellement exprimés ont été identifiés et comparés en utilisant le package DESeq2 de R et en utilisant le test de Wald normalisé (version 1.26.0 avec les paramètres suivants : $\text{Log}_2\text{FoldChange (Log}_2\text{FC)} \geq 1.5$ ou ≤ -1.5 et P-value ajustée (P_{adj}) ≤ 0.05) (Love et al., 2014). L'analyse fonctionnelle a été réalisée avec le logiciel GSEA (Gene Set Enrichment Analysis, version 4.1.0 – 1000 permutations, weighted enrichment statistics, exclusion des gene set supérieur à 500 et inférieur à 15) (Subramanian et al., 2005) avec les gene sets provenant de MSigDB (version 7.2 – collections de gene sets : h.all, c2.cp.reactome, c5.go.bp, c5.go.mf and c7.all). La visualisation de la carte d'enrichissement a été produite avec Cytoscape (version 3.8.2) (Shannon et al., 2003) et l'application EnrichmentMap (Node Cutoff Q-value 0.05 and Edge Cutoff 0.5) (Merico et al., 2010).

d. Extraction d'ARN et qRT-PCR

Cette procédure a été réalisée par Marie Gimenez, étudiante en stage de Master 2 que j'ai encadré pendant ma thèse. Après 24 heures de traitement, les cellules épéndymaires en culture primaire ont été rincées avec du PBS et collectées avec du Tri Reagent® (Molecular Research Center). L'ARN total a été extrait et purifié en séparant l'ADN génomique avec le kit de purification Turbo-DNA-Free (QIAGEN). La pureté et la concentration de l'ARN ont été déterminées par spectrophotométrie avec un BioDrop. 19 ng d'ARN total ont été reverse

MATÉRIEL ET MÉTHODES

transcrits en ADNc avec le kit Prime Script RT Reagent (Takara Ozyme). Les PCR quantitatives ont été réalisées avec le Roche Light Cycler 480 et le Light Cycler 480 SYBR Green 1 master mix (Roche). L'amplification par PCR des ADNc a été faite en utilisant un standard ARN poly(A) synthétique et non homologue pour grader l'efficacité de la reverse-transcriptase (Morales et al., 2006). Les courbes étalons ont été générées par dilutions en série des primers construits par Eurogentec©. Les points de croisement des courbes d'amplification pour les échantillons testés ont été convertis en copies logarithmiques par comparaison avec les courbes étalons. Douze primers de cytokines et chemokines ont été utilisés (Table 2, Bigotte et al., under review) et sélectionnés à partir de l'analyse différentielle du séquençage ARN.

4. Méthodes d'étude complémentaires des effets des IgG-NMO sur les modèles de culture et rats-NMO

a. Analyse des cellules souches sous-ventriculaire par cytométrie en flux

Afin de quantifier les différentes populations de cellules souches de la SVZ, nous avons utilisé une technique de cytométrie en flux inspirée de (Belenguer et al., 2021a). Celle-ci permet l'identification de sept populations distinctes : qNSC, pNSC, aNSC, NPC1, NPC2, NB1 et NB2 grâce à un cocktail de neuf anticorps directement couplés à des fluorochromes sur des wholemounts de ventricules latéraux de souris (**Figure 23**). Les marqueurs CD45, O4, CD31 et Ter-119 permettent d'éliminer dans un premier temps une population cellulaire nommée « Lin » contenant les microglies/macrophages, les oligodendrocytes, les cellules endothéliales et les globules rouges. Ensuite, à partir des cellules Lin⁻, les marqueurs GLAST et CD24 font un premier tri. Les cellules NPC1 sont EGFR⁺GLAST⁻CD24⁻ et les cellules NPC2 sont EGFR⁺GLAST⁺CD24⁺. Les neuroblastes sont les cellules GLAST⁻CD24⁺ dans lesquelles on différencie les NB1 EGFR⁺ et les NB2 EGFR⁻. Enfin, les astrocytes neurogéniques et matures GLAST⁺CD24⁻ sont différenciés grâce au marqueur CD9 dont la limite est définie grâce au cortex ne contenant pas d'astrocytes neurogéniques. Les astrocytes neurogéniques GLAST⁺CD24⁻CD9⁺ sont alors subdivisés en aNSC EGFR⁺, pNSC GLAST^{high}EGFR⁻ et qNSC GLAST^{low}EGFR⁻. En plus de ces sept populations cellulaires, nous avons ajouté le marqueur A2B5 pour identifier les OPC à partir des cellules Lin⁻GLAST⁻CD24⁻.

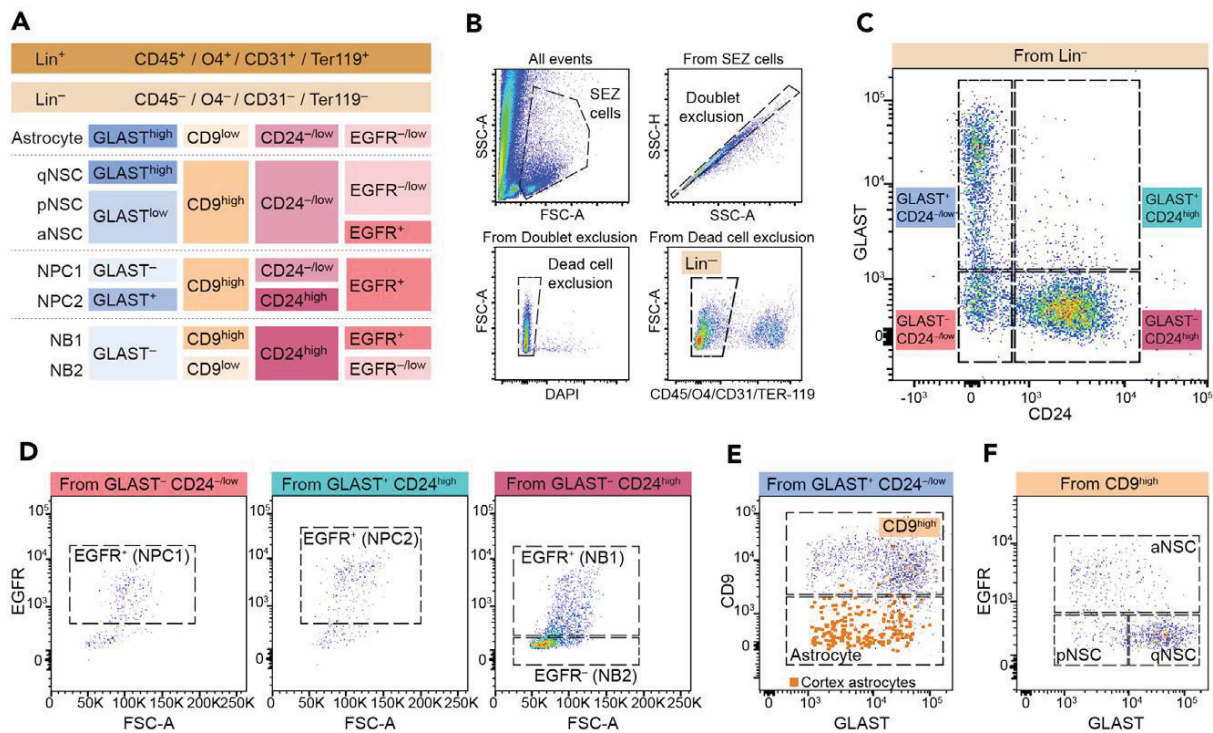


Figure 23. Classification des cellules sous-épendymaires par cytométrie en flux (Belenguer et al., 2021a). A) Panel de marqueurs utilisés pour caractériser les sous-populations de cellules souches sous-épendymaires. B) Les cellules Lin⁺ (CD45⁺O4⁺CD31⁺Ter119⁺) sont exclues de l'analyse. C) A partir des cellules Lin⁻, on distingue quatre premières populations avec les marqueurs GLAST et CD24. D) Les NPC1 sont GLAST⁻CD24⁻EGFR⁺, les NPC2 sont GLAST⁺CD24⁺EGFR⁺ et les NB1 et NB2 GLAST⁻CD24⁻EGFR⁺ et EGFR⁻ respectivement. E) Les astrocytes matures du cortex sont CD9⁻ et permettent de distinguer les astrocytes neurogéniques des astrocytes matures de la zone sous-épendymaire à partir des cellules GLAST⁺CD24⁻. F) Parmi les astrocytes neurogéniques, les aNSC sont EGFR⁺, les pNSC sont EGFR⁻GLAST^{low} et les qNSC sont EGFR⁻GLAST^{high}.

Après 24 heures de traitement, les wholemounts ont été découpés en 4-5 petits morceaux et déposés dans les tubes C (Miltenyi) avec le mix du kit de dissociation de tissu neural (Neural Dissociation Kit (T), Miltenyi) pour procéder à une dissociation lente à la trypsine au GentleMACS pendant 20 minutes (programme 37C_NTDK_1, Miltenyi). Une fois la dissociation terminée, 3 mL de solution d'inhibition de la trypsine ont été ajoutés : tampon de lavage (DMEM Glutamax supplémenté pour concentration finale en glucose 0,6 %, HEPES 5 mM et BSA 4 mg/ml) + trypsin inhibitor 100 µg/mL (T9253, Sigma). Après une centrifugation 1 minute à 100g, les cellules ont été reprises dans 1 mL de tampon de lavage. 20 à 30 passages avec un cône de P1000 ont été réalisés pour dissocier les cellules qui ont été ensuite déposées dans un filtre avec pore de diamètre 70 µm. 7 mL de tampon de lavage ont été déposés dans le tube C pour récupérer le reste de cellules accrochées et les mêmes étapes ont été réalisées

MATÉRIEL ET MÉTHODES

jusqu'au passage sur le filtre 70 µm. Les cellules ont été centrifugées pendant 10 minutes à 300g avant de réaliser une étape de clarification de la myéline par filtration sur colonne avec des billes magnétiques (Myelin Isolation Beads kit, Miltenyi). L'éluât a été centrifugé 10 minutes à 300g et lavé avec du tampon FACS (HBSS sans calcium et magnésium, EDTA 2mM, HEPES 10mM, Glucose 0,1% et BSA 0,5%). Chaque échantillon a été incubé avec les anticorps primaires couplés aux fluorochromes pendant 30 minutes. Comme le tissu provient du rat, les anticorps utilisés étaient différents : VioBlue® human anti-rat-CD45 (130-125-229, Miltenyi), mouse anti-O4 AF405 (FAB1326V, R&D systems), BV421 mouse anti-rat CD31 (744357, BD Biosciences), PE-Vio® 770 human anti-rat Ter-119 (130-109-562, Miltenyi), mouse anti-GLAST-PE (130-118-344, Miltenyi), mouse anti-rat CD9 (551808, BD Biosciences) couplé avec Percp/Cya5.5® conjugation kit (ab102911, abcam), APC-Vio® 770 human anti-rat CD24 (130-106-219, Miltenyi) , EGF-AF488 (E13345, molecular probes) et mouse anti-A2B5-APC (130-123-800, Miltenyi). Pour chaque expérimentation, deux wholamounts ont été utilisés uniquement pour les contrôles du cytomètre : un tube de cellules seules, les anticorps seuls et les FMO (Fluorescence Minus One) pour les compensations entre marquages. Un morceau de cortex a été marqué pour séparer les astrocytes matures et les NSC avec le marquage CD9. Une fois que l'incubation avec les anticorps primaires était terminée, les cellules ont été centrifugées 10 minutes à 300g et resuspendues dans 300 µL de tampon FACS pour l'analyse au cytomètre (Canto II, Beckton-Dickinson, San Diego, CA, USA) équipé avec trois lasers (488, 633, 405 nm) et en utilisant les logiciels BD FACS-Diva™ et FlowJo (version 10 by Flowjo LLC, OR, USA).

b. Méthode d'étude de l'effet des IgG-NMO à long terme sur l'épendyme *in vivo*

Pour étudier les effets à long terme des IgG-NMO sur l'épendyme, nous avons utilisé un modèle *in vivo* de la NMO qui a été développé au laboratoire et appelé le rat-NMO. Ce modèle consiste en l'infusion continue pendant 7 jours d'IgG purifiées dans les ventricules latéraux via une canule reliée à une micro-pompe osmotique contenant les IgG (Marignier et al., 2016).

Rats-NMO : procédure expérimentale et chirurgie

Les procédures expérimentales ont été réalisées en accordance avec la directive européenne 2010/63/EU. Le protocole (APAFIS#20496) a été évalué par le comité d'éthique en expérimentation animale en neurosciences de Lyon (CELYNE n°42) et approuvé par le

ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation en application de l'article R.214-87 à R.214-126 du code rural et de la pêche maritime. 21 rats Sprague Dawleys âgés de 2 mois (JanvierLabs, Le Genest Saint Isle, France) ont été inclus dans ce projet. Ils ont été acclimatés 7 jours avant la procédure expérimentale dans l'animalerie du CRNL (DDA69675-01). Huit rats ont reçu les IgG-NMO du patient numéro 2 (appelés rats-NMO), six rats ont reçu les IgG-CTRL (appelés rats-CTRL) et sept rats ont reçu du sérum physiologique (rats-NaCl).

Les procédures expérimentales pour la chirurgie ont été réalisées comme précédemment décrites (Marignier et al., 2016). Les kits d'infusions cérébraux (pompes osmotiques ALZET, Charles River, France) étaient préparés stérilement avant la chirurgie. Les mini-pompes osmotiques étaient chargées avec 2 mg/mL d'IgG purifiées diluées dans du DMEM (61965, Gibco) ou avec de la solution saline NaCl et étaient gardées dans de la solution saline stérile jusqu'à implantation. Les rats ont été anesthésiés avec de l'isoflurane 0,5-2% (ISO-VET®, Piramal Critical Care), 1% d'oxygène et installés sur un cadre stéréotaxique. Des injections sous-cutanées d'analgésiques (Lurocaïne®, Vetoquinol, France) ont été administrées avant l'incision du scalp et le crâne nettoyé et séché. Les coordonnées stéréotaxiques -0,7 mm anteropostérieur et -1,7 mm médiolatéral par rapport au Bregma ont été utilisées pour localiser le ventricule latéral droit. Après trépanation, la canule du kit d'infusion cérébral a été implantée et fixée au crâne avec de la Superglue et couverte de ciment dentaire (SuperBond®, C&B Sun Medical) pour minimiser l'abrasion cutanée. La mini-pompe connectée à la canule a été ensuite placée en sous-cutanée dans le dos de l'animal. La peau a été suturée et l'animal surveillé jusqu'au réveil. Une injection sous-cutanée d'analgésique (Buprecare®, Axience, France) a été réalisée juste après la chirurgie et 1 jour après. Le bien-être animal a été contrôlé jusqu'à la fin de la procédure expérimental 7 jours après la chirurgie.

A la fin de la procédure expérimentale, les animaux ont été sacrifiés par anesthésie gazeuse à l'isoflurane et injection létale de pentobarbital (Euthasol i.p. 1,5 mL/kg). Afin de vérifier que le contenu de la pompe a bien diffusé dans les ventricules, nous avons vérifié qu'elle était vide à chaque fois et un prélèvement de sang artériel a été effectué pour tester la présence des anti-AQP4 dans le sang par *cell-based assay* comme précédemment (Marignier et al., 2016). Après perfusion avec une solution saline, les animaux ont été décapités afin de récupérer le cerveau, la moelle épinière et les nerfs optiques. Le cerveau et la moelle épinière ont été congelés à -80°C directement après prélèvement dans une solution de méthylcyclohexane. La tête a été

MATÉRIEL ET MÉTHODES

plongée dans une solution de PFA 4% pour récupérer les nerfs optiques 1 semaine après. Après 1 semaine, les nerfs optiques ont été conservés dans une solution de sucre 30% jusqu'à flottaison puis congelés à -80°C. Les cerveaux fraîchement congelés ont ensuite été découpés au cryostat (coupes de 10 µm d'épaisseur) et montées sur lames superfrost en condition RNase free conservées à -20°C pour effectuer des marquages immunohistochimiques ou pour prélèvement par ponction laser pour extraction d'ARN.

Immunohistochimie

La méthode de marquage pour les coupes de cerveau des rats est similaire à celle utilisée pour marquer les cultures ou les wholemounts (voir plus haut). Les anticorps et leurs dilutions sont également les mêmes. Après montage, les marquages ont été analysés au microscope à épifluorescence (Zeiss ImagerM2) ou confocal (Zeiss LSM800).

Isolation des cellules épendymaires et extraction d'ARN pour analyse RNAseq

Immédiatement après coupage au cryostat, les lames destinées à l'extraction d'ARN ont été placées dans la carboglace et congelées à -80°C. Un total de trois lames par animal et de trois animaux différents par condition (NaCl, CTRL-IgG et NMO-IgG) a été utilisé. Après un maximum de six semaines, les lames ont été fixées par déshydratation à l'alcool en plusieurs bains successifs et colorées au Crésyl violet : 30s éthanol 95%, 30s éthanol 75%, 30s éthanol 50%, 30s Crésyl violet (1 mg/mL), 30s éthanol 50%, 30s éthanol 75%, 30s éthanol 95%, deux fois 30s éthanol 100% et deux fois 2 minutes 30 xylène. Après fixation, les cellules épendymaires des bords dorsaux et latéraux du ventricule latéral ont été isolées par capture laser sur un film thermoplastique (**Figure 24**, LCM, Arcturus PixCell II, laser spot size = 7.5 µm, pulse power = 63 mW). Le film thermoplastique contenant les cellules capturées a été gardé à -20°C jusqu'à l'extraction d'ARN. L'extraction d'ARN a été réalisée en utilisant une colonne chromatographique avec un kit d'extraction d'ARN (Norgen 51800). Les contrôles de qualité, la construction des bibliothèques et toutes les étapes de séquençage de l'ARN et de traitement informatique étaient les mêmes que pour les cultures.

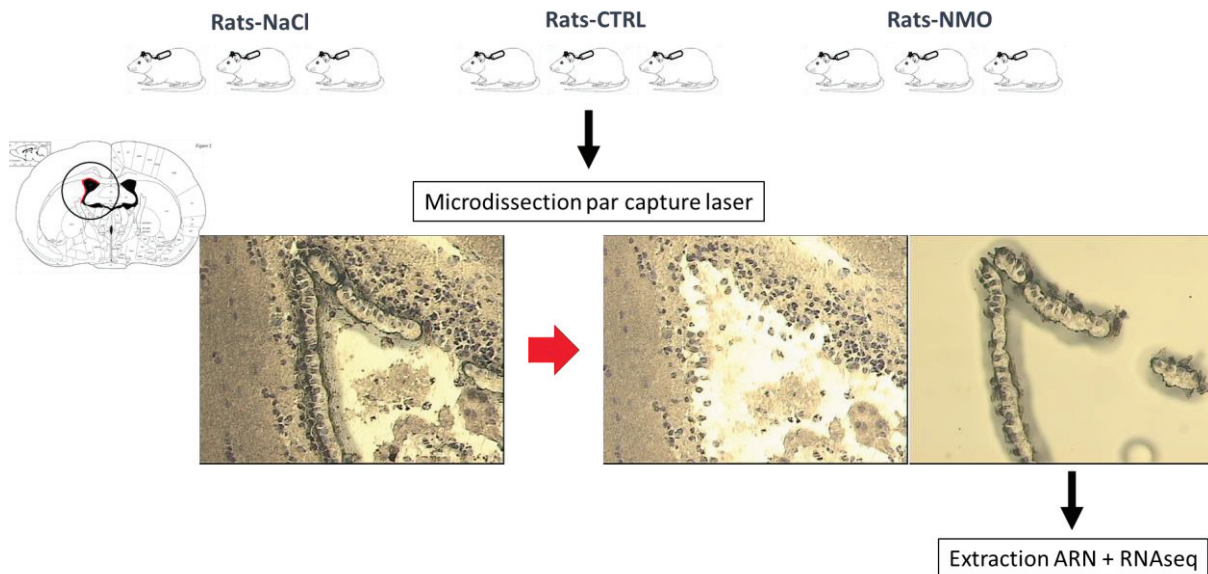


Figure 24. Capture par microdissection laser de l'épendyme. Les cellules épendymaires des bords dorsaux et latéraux sont identifiées grâce au marquage Crésyl violet et isolées sur le film thermoplastique par chauffage avec le laser. Les cellules ainsi accrochées sont ensuite gardées pour l'extraction et le séquençage ARN.

5. Analyses statistiques

Toutes les analyses de quantification à partir des images ou vidéos de microscope ont été réalisées en aveugle. Les analyses des images de microscopes ont été faites avec le logiciel Fiji (ImageJ, National Institutes of Health). Les graphes et les analyses statistiques ont été faits avec Prism 7 (Graphpad) et le logiciel R sous l'environnement Rstudio avec les packages ggplot2 et circstat. Dans les graphes, les médianes sont montrées et les barres d'erreurs correspondent aux intervals de confiance $\pm 95\%$. Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé après avoir testé la normalité des données au préalable avec test Shapiro-Wilk. Le test ANOVA a été utilisé lorsque la normalité était atteinte. Le test post-hoc de comparaison multiple de Dunnett a été utilisé en complément. Le niveau de significativité est indiqué comme ceci : * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.001$ and **** = $P \leq 0.0001$.

RÉSULTATS PRINCIPAUX

RÉSULTATS PRINCIPAUX

Les principaux résultats obtenus durant ma thèse ont été rassemblés dans un article actuellement en révision dans *Brain Communications*. Dans cet article, nous présentons les effets majeurs des IgG-NMO sur les cellules épendymaires des cultures primaires et des cultures d'explants de ventricules latéraux de rats après 24 heures de traitement. Nous avons évalué leurs effets sur trois fonctions majeures de l'épendyme : 1) les échanges métaboliques par l'analyse de l'expression de l'AQP4 et la Cx43 ; 2) la régulation du flux du LCS en analysant le battement ciliaire et la polarisation planaire ; et 3) la régulation des cellules souches sous-épendymaires en les quantifiant. Pour finir, nous avons analysé le transcriptome des cellules épendymaires pour mettre en évidence d'éventuelles altérations pour lesquelles nous n'avions pas d'a priori.

1. Agglomération de l'AQP4 et gonflement des épendymocytes

Tout d'abord, nous avons évalué les effets des IgG-NMO sur l'expression de l'AQP4. Le modèle de culture primaire nous a permis de tester les IgG-NMO de sept patients différents qui ont induit une agglomération de l'AQP4 à la membrane avec un effet plus ou moins marqué selon les patients sur les cultures primaires. Les cellules semblaient gonflées après traitement avec les IgG-NMO mais le modèle de culture primaire ne nous permettait pas d'évaluer la taille des cellules car elles peuvent occuper librement l'espace dans les supports de culture. Nous avons donc utilisé le modèle de culture d'explant de ventricules latéraux de rats adultes qui est plus physiologique. Nous avons utilisé les IgG du 2^{ème} patient (NMO₂-IgG) ayant l'effet le plus marqué sur les cultures primaires et avons montré qu'elles induisaient aussi une agglomération membranaire de l'AQP4. En comparaison avec les cellules non-traitées (NT) et traitées avec les IgG-CTRL, les cellules épendymaires étaient élargies après traitement avec les NMO₂-IgG. Ces résultats montrent que les effets sur l'expression de l'AQP4 sont variables entre les patients et suggèrent que les IgG-NMO peuvent induire une altération de la morphologie des épendymocytes ainsi que la dynamique des échanges aqueux.

2. Modification de l'expression des jonctions communicantes

Les jonctions communicantes permettent de réguler les échanges métaboliques et de synchroniser les cellules épendymaires entre elles. Elles ont donc un rôle crucial pour le maintien des fonctions épendymaires. Nous avons précédemment montré que les IgG-NMO

altéraient l'expression et la communication intercellulaires via les jonctions communicantes chez l'astrocyte (Richard et al., 2020). Après 24 heures de traitement avec les IgG-NMO des sept patients différents, nous avons montré que la taille des agrégats de la Connexin-43 (la jonction communicante la plus connue de l'épendyme) était augmentée en comparaison avec les groupes contrôles suggérant que la communication intercellulaire épendymaire pouvait être altérée par les IgG-NMO.

3. Altération de la motilité et de la polarisation des cils

La fonction la plus connue des cellules épendymaires est de réguler la circulation du flux du LCS par le battement de leurs touffes de cils moteurs (Del Bigio, 2010; MacDonald et al., 2021). Afin de savoir si des atteintes de ces fonctions sont présentes dans la NMO, nous avons étudié la capacité des cellules épendymaires des explants de ventricules latéraux à propulser correctement des microbilles fluorescentes déposées à la surface du tapis épendymaire après 24 heures de traitement avec les NMO₂-IgG. Par rapport aux groupes contrôles, la vitesse et la directionnalité des billes étaient réduites par les NMO₂-IgG, signe d'une altération de la motilité ciliaire des cellules épendymaires. Pour comprendre l'origine de ce dysfonctionnement, nous avons évalué la structure des cils par marquages immunohistochimiques après traitement avec les NMO₂-IgG. Nous n'avons pas noté d'altérations de la structure du cil en lui-même. En revanche, en marquant les corps basaux des cils, nous avons observé que les NMO₂-IgG ont réduit la polarité translationnelle des cellules épendymaires, pouvant expliquer ainsi les altérations de la motilité.

4. Activation de la zone sous-épendymaire

Des altérations induites par les IgG-NMO des fonctions d'échanges homéostatiques ou de régulation de la circulation du LCS opérée par les cellules épendymaires, ou un ciblage direct par les IgG-NMO par diffusion à travers les cellules épendymaires pourraient altérer la survie et la prolifération des cellules souches sous-épendymaires. Nous avons donc quantifié les cellules sous-épendymaires par des marquages immunohistochimiques après traitement des explants par les NMO₂-IgG. Curieusement, les NMO₂-IgG ont induit une augmentation de la prolifération cellulaire sous-épendymaire mesurée par le marquage Ki67. Nous avons

RÉSULTATS PRINCIPAUX

également observé une augmentation du nombre de prolongements monociliés des progéniteurs astrocytaires (les cellules B1). Et enfin, nous avons observé une densification du réseau de neuroblastes sous-épendymaires grâce au marquage doublecortin. Les IgG-NMO semblent donc activer la niche sous-épendymaire.

5. Réaction inflammatoire des épendymocytes

Afin d'évaluer les modifications à l'échelle transcriptomique induites par les IgG-NMO sur les cellules épendymaires, nous avons réalisé un séquençage ARN (RNAseq) après traitement des cultures primaires d'épendymocytes avec NMO₂-IgG et les IgG-CTRL. En comparaison avec les cellules non traitées, les NMO₂-IgG ont drastiquement induit la surexpression de groupes de gènes impliqués dans l'inflammation et également dans le stress cellulaire, la prolifération cellulaire et l'assemblage des jonctions communicantes. Même si ces deux dernières appuient les observations précédentes, l'activation de gènes impliqués dans l'inflammation était majoritaire et nous a incité à l'étudier plus précisément. Comparé à la condition non-traitée, les IgG-CTRL ont également induit l'activation de groupes de gènes impliqués dans l'inflammation suggérant que les IgG peuvent induire un effet pro-inflammatoire sur l'épendyme de manière non spécifique. Nous avons donc comparé les effets des NMO₂-IgG et des IgG-CTRL séparément par rapport aux cellules non traitées pour distinguer ces deux réponses inflammatoires. En analysant les gènes des cytokines significativement uprégulées ou downrégulées dans nos tables de séquençage ARN et par confirmation par rtqPCR ensuite, nous avons identifié un pool de cytokines spécifiquement produites en réponse aux NMO₂-IgG par rapport aux IgG-CTRL et aux cellules non-traitées. Ces résultats ont notamment été obtenus avec l'aide d'une étudiante en stage de master 2 que j'ai encadré pendant 6 mois (Marie Giminez). Les cytokines TNF- α , CXCL9, CXCL13, CCL12 étaient uprégulées et l'IL6 downrégulée. Ces résultats indiquent que les cellules épendymaires sécrètent des cytokines pro-inflammatoires en réponse aux IgG-NMO qui sont notamment impliquées dans le recrutement de cellules immunes.

6. Conclusion

Pour résumer, nous avons montré que, à court terme, les IgG-NMO altèrent morphologiquement et fonctionnellement les cellules épendymaires, activent la zone sous-épendymaire et provoquent une réaction pro-inflammatoire.

ARTICLE

Ependyma: a new target for autoantibodies in Neuromyelitis Optica?

Maxime Bigotte¹, Marie Gimenez¹, Adamantia Deligiannopoulou¹, Aseel El Hajj¹, Severine Croze², Abdelghafar Goumaidi³, Gael Malleret¹, Paul Salin¹, Pascale Giraudon¹, Anne Ruiz¹,
Romain Marignier^{1,4,5}

Author affiliations:

1 INSERM U1028, CNRS UMR 5292, Claude Bernard Lyon 1 University, FORGETTING Team - Lyon Neuroscience Research Center, Bron, France

2 ProfileXpert, genomic and microgenomic service, Claude Bernard Lyon 1 University, SFR santé LYON-EST, UCBL-INSERM US 7-CNRS UMS 3453, Lyon, France

3 Viroscan3D SAS, Lyon, France

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

5 Centre de référence des maladies inflammatoires rares du cerveau et de la moelle (MIRCEM), Lyon, France

Correspondence to: Pr. Romain Marignier

Centre de référence des maladies inflammatoires rares du cerveau et de la moelle. Service de neurologie, sclérose en plaques, pathologies de la myéline et neuro-inflammation. Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer, 59 boulevard Pinel, 69677 Bron cedex, France.

E-mail: romain.marignier@chu-lyon.fr

Running title: Ependymal cell dysfunctions in Neuromyelitis Optica

Keywords: ependymal cell; neuromyelitis optica; aquaporin-4; cilia; subventricular zone

Abbreviations: AQP4 = Aquaporin-4; BBB = Blood-Brain Barrier; CCL = C-C motif Chemokine Ligand; CXCL = C-X-C motif Chemokine Ligand; CXCR = C-X-C motif Chemokine Receptor; EAE = Experimental Autoimmune Encephalomyelitis; GFAP = Glial Fibrillary Acidic Protein; IgG = Immunoglobulin G; IL = Interleukin; KO = Knock Out; LCA5 = Leber Congenital Amaurosis; NSC = Neural Stem Cell; NMO = Neuromyelitis Optica; OAP = Orthogonal Array of Particles; OPC = Oligodendrocyte Precursor Cell; qRT-PCR = quantitative Real Time PCR; SV-NSCs = SubVentricular Neural Stem Cells; TNF = Tumor Necrosis Factor.

Abstract

Neuromyelitis Optica (NMO) is an autoimmune demyelinating disease of the central nervous system characterized by the presence of autoantibodies (called NMO-IgG) targeting aquaporin-4 (AQP4). AQP4 is expressed at the perivascular foot processes of astrocytes, in the glia limitans but also at the ependyma. Most studies have focus on studying the pathogenicity of NMO-IgG on astrocytes and NMO is now considered an astrocytopathy. However, periventricular lesions are observed in NMO suggesting that ependymal cells could also be targeted by NMO-IgG. Ependymal cells regulate CSF-parenchyma molecular exchanges, CSF flow and is a niche for subventricular neural stem cells. Our aim was to examine the effect of antibodies from NMO patients on ependymal cells.

We exposed two models, i.e., primary culture of rat ependymal cells and explant cultures of rat lateral ventricular wall wholemounts, to purified IgG from NMO patients (NMO-IgG) for 24 hours. We then evaluated the treatment effect using immunolabeling, functional assays, ependymal flow analysis and bulk RNA sequencing. For each experiment, the effects were compared to purified IgG from healthy donor (CTRL-IgG) and non-treated cells.

We found that: i) NMO-IgG induced AQP4 agglomeration at the surface of ependymal cells, and induced cell enlargement in comparison to CTRL-IgG ($P < 0.001$). In parallel, it induced an increase in gap junction connexin-43 plaque size ($P < 0.0001$) and a decrease of intercellular communication ($P < 0.0001$); ii) NMO-IgG altered the orientation of ciliary basal bodies ($P < 0.001$) and functionally impaired cilia motility ($P < 0.0001$); iii) NMO-IgG activated the proliferation of subventricular neural stem cells ($P < 0.01$); and iv) NMO-IgG treatment upregulated the expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines in the transcriptomic analysis.

Our study showed that NMO-IgG can trigger an early and specific reactive phenotype in ependymal cells, with functional alterations of intercellular communication and cilia, activation of the subventricular stem cell proliferation and the secretion of pro-inflammatory cytokines. These findings suggest a key role for ependymal cells in the early phase of NMO lesion formation.

Introduction

Neuromyelitis Optica (NMO) is a rare neuroinflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) mostly characterized by optic nerve and spinal cord lesions.[53] NMO was previously considered as a subtype of multiple sclerosis until highly specific autoantibodies (NMO-IgG) were found in a large majority of patients.[19] NMO-IgG targets aquaporin 4 (AQP4), the main water channel of the brain expressed on astrocytic basal foot processes, the subarachnoid glia limitans and ependyma.[34] Since then, the pathogenic role of NMO-IgG has been evaluated, leading to the consensus that NMO is a primary astrocytopathy.[17, 22] Histopathological evaluation revealed that six different types of astrocytic lesions can be found concomitantly or depending on the clinical evolution, suggesting that multiple pathogenic mechanisms can support the link between NMO-IgG-induced astrocytopathy and tissue injury leading to demyelination and axonal loss. [32, 48] These mechanisms include direct and bystander complement-dependent cytotoxicity, and bystander antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.[10] In parallel, NMO-IgG can also be directly pathogenic by inducing pro-inflammatory cytokine secretion, extracellular glutamate release or glial communication via gap junctions alteration.[16, 25, 26, 38] Thus, the pathogenic role of NMO-IgG on astrocytes is well documented. However, little is known about the effects of NMO-IgG on ependymocytes, that also express AQP4.

Ependyma is an epithelial layer composed of cuboid multiciliated cells called ependymocytes that line all the inner cavities of the brain filled with cerebrospinal fluid (CSF). At the interface between CSF and CNS parenchyma, ependymal cells regulate important homeostatic functions such as molecular exchanges, CSF propulsion via synchronous ciliary beating and subventricular neural stem cell (SV-NSC) survival and proliferation.[8, 29] These functions, mediated by cilia are in part supported by gap junction communication.[55] Structural and functional alterations of ependymal cells has been observed in neuroinflammatory models such as stroke or in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).[36, 54] In these models, ependymal cells presented an over expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), cell enlargement similarly to astroglial reactivity, functional and structural alterations of cilia and stimulation of SV-NSC proliferation.

There is evidence for ependymal alterations in NMO. Periventricular inflammation has been observed in MRI studies and is included in the international diagnosis criteria for NMO.[3, 20,

53] Moreover, a histopathological study of post-mortem tissues showed granulocytes infiltration, microglial reactivity, subependymal gliosis, ependymal cell loss and morphological alteration in NMO patients.[13] In this study, 56% of NMO patients presented loss of AQP4 in ependyma and 38% presented complement deposition. However, the role of autoantibodies in this alteration has not been evaluated.

In the present study we hypothesized that, as for astrocytes, purified antibodies from NMO patients, can act, *per se*, as cellular modulators and alter ependymal cells' morphology and functions.

Materials and methods

NMO patient and IgG purification

Plasmapheresis were obtained from patients with NMO spectrum disorder selected from the French NMO cohort NOMADMUS and stored at NeuroBioTec (Biological Resource Centre of the *Hospices Civils de Lyon*). Seven patients tested positive for AQP4-IgGs (named NMO₁-IgG to NMO₇-IgG for this study) were included. We also used a pool of control plasma collected from healthy blood donors at *Etablissement Français du Sang* (CTRL-IgG). IgGs were purified from plasma and plasmapheresis on Protein-A Sepharose 4 Fast Flow™ beads (P9424 Sigma-Aldrich), eluted with glycine 0.1 M buffer pH 2.8 and then neutralized in Tris 1.5 M pH 8.8. Sample titers ranged from 5 to 10 mg/mL and were diluted to 2 mg/mL prior using in primary cultures and explants of adult rat lateral ventricles. To evaluate their ability to bind to AQP4, NMO-IgGs were incubated for 24 hours on ependymal cells from primary cultures of ependymocytes and on ventricles from adult Sprague Dawley rats' brain slices, and co-stained for human IgG and AQP4 (Supplementary Fig. 1).

Primary culture of rat ependymocytes

Primary cultures of ependymocytes were obtained as previously described.[49, 51] Up to 6 brains of freshly newborn Sprague Dawley pups were quickly dissected to isolate ventricles and pulled in MEM (1g/L glucose, no L-glutamine, 21090 ThermoFisher Scientific) supplemented with Bovin Serum Albumin (BSA) 50 µg/mL (A0281 Sigma-Aldrich), bovin insulin 6.25 µg/mL (I1882 Sigma Aldrich), human transferrin 12.5 µg/mL (T1283 Sigma-Aldrich), 1% penicillin/streptomycin (15140-122 Gibco) and fungizone 40 µg/mL (Amphotericin B 15290-026 Gibco). Brains were rinsed 3 times with the same medium and

were gently mechanically dissociated by 5 passages in a G-18 syringe and 5 passages in a G-21 syringe. Dissociated brains were diluted in 4 mL of medium/brain and seeded in coated culture supports. Dlux 2 chamber culture slices (30402 SPL Life Science) were coated with 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bovin fibronectin (33010-018 Gibco) for 2-3 hours in a 37°C 5% CO₂ incubator, rinsed 1 time with MEM and air dried 45 minutes. The culture medium was first changed 2 days later with MEM supplemented as described previously, with 0.5% penicillin/streptomycin and fungizone 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and then changed 2 times a week. Human thrombin 0.5 IU/ml (T6884 Sigma) was added from day 2 to 14 to increase cell growth.

Explant culture of adult rat lateral ventricular walls

For the explant culture of dissected rat lateral ventricular wall wholemounts, 2 months old male Sprague Dawley rats (JanvierLabs) were deeply anesthetized with 5% isoflurane and guillotined. Wholemount dissection of adult rat lateral ventricles was performed as previously described.[30] Briefly, brains were placed on a petri dish covered with a plastic polymer (Sylgard 184) under a stereomicroscope in 37°C heated L15 Leibovitz medium (114155 Gibco). Hemispheres were separated and a small portion of the posterior part of the brain was removed allowing the separation of the hippocampus and the neocortex. The hippocampus and the neocortex were gently detached until extraction of the hippocampus. This manipulation allowed to isolate the lateral ventricles which were then isolated. Finally, ventricular wall wholemounts were cultured during 24 hours with or without IgG treatment at 0.2 mg/ml in DMEM Glutamax (61965 Gibco) + 1% penicillin/streptomycin +10% fetal calf serum in 12 well plates in a 37°C and 5% CO₂ incubator. After 24 hours treatment, wholemounts were used for ependymal flow assay or for immunolabeling.

Ependymal flow assay

Wholemounts treated for 24 hours in explant cultures (see the procedure above) were placed and fixed with needles on a petri dish with Sylgard 184 filled with 37°C L15 Leibovitz under a videomicroscope (AxioZoom V16, Zeiss). Borosilicate glass capillaries (1.0 mm O.D. x 0.58 mm I.D.) were pulled and processed to obtain a 100 μm internal diameter beveled tip. Capillaries were placed in an oil microinjector (Narishige) placed on a micromanipulator and filled with fluorescent microbeads (Yellow Green 2 μm diameter latex microspheres, 18338-5, Polysciences). The position of the tip was adjusted on the wholemount using the microscope. A magnification of 50x and a resolution of 512x512 pixels were used for the recording using

the Zen software (Zeiss). The time exposition was adjusted to capture a maximum of image/s (5 fps). At each sequence of video recording, a quantity of about 0.02 μ l of the solution containing the microbeads was applied locally, slightly above the surface of the ventricle. After video recording, some wholemounts were fixed for immunolabeling.

Immunolabeling

The procedure for the immunolabeling of primary ependymocyte cultures and wholemounts of lateral ventricles were very similar and differed only for the duration of certain steps. Cultured cells were fixed with 4% PFA in 0.1M Phosphate Buffer for 10 minutes at room temperature and 20 minutes for wholemounts; or methanol at -20°C for 10 minutes for cells or wholemounts depending on the antigen sensitivity to the fixation method. Cells were rinsed three times for 5 minutes and wholemounts during 15 minutes with 1X Phosphate Buffer Saline (PBS). Then, samples were incubated with a saturating solution composed of 1X PBS with or without 0.1-0.3% Triton X-100 (PBST 0.1-0.3%), depending on antigen sensitivity, and 10% Normal Goat Serum (NGS, S-1000, Eurobio). Samples were incubated with primary antibodies diluted in saturating solution overnight at 4°C. Cells were rinsed three times for 5 minutes with PBST 0.1-0.3% and wholemounts were rinsed two times quickly and three times 20 minutes with PBST 0.1-0.3% at room temperature. Samples were then incubated with secondary antibodies diluted in saturating solutions for 1 hour at room temperature. Targets, hosts, references and dilutions of primary and secondary antibodies are listed in Table 1. Cells were rinsed two times with PBST 0.1-0.3% and one time with PBS for 10 minutes, and wholemounts were rinsed two times quickly and two times with PBST 0.1-0.3% and one time with PBS for 20 minutes at room temperature. Nuclei were stained with DAPI. Finally, samples were mounted with Permafluor (TA-030-FM, ThermoFisher Scientific) and covered with coverslips for microscopy.

After immunolabeling of wholemounts, further steps of dissection were performed to obtain a piece of tissue 200-300 μ m thick for slide mounting. Remaining pieces of tissue around the ventricles were cut and the lateral ventricles were gently separated from the rest of the brain by cutting with a short knife just behind it. Wholemounts were then placed on slides, embedded with mounting medium (Permafluor TA-030-FM, ThermoFisher Scientific) and covered with coverslips.

Isolation of ependymal cells from primary cultures for RNA sequencing

After 24 hours treatment with CTRL-IgG or NMO-IgG, ependymal cells from primary cultures were rinsed with 1X Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Gibco 14065), detached with accutase (A6964 Sigma) 5-10 minutes at 37°C, then centrifugated 5 minutes at 1400 rpm and suspended in PBS ($\approx 10\,000$ cells/ml). Viable cells were selected by fluorescence activated cell sorting (FACS) and sorted with propidium iodide (PI; 50 μ g/ml) at the cytometry platform of the Lyon Cancer Research Center (CRCL – Inserm U1052 – CNRS 5286). The most common marker for mature ependymal cells is FoxJ1.[29](Meunier et al., 2020) However, FoxJ1 expression is nuclear rendering its isolation by FACS sorting not suitable for RNA sequencing. Since we quantified approximately 91% of FoxJ1⁺ cells in our primary cultures (Supplementary Fig. 2), we decided to select viable PI⁺ cells for RNA sequencing. After cell sorting, cells were kept in the RL buffer (Norgen 51800) at -20°C prior to RNA extraction.

RNA sequencing and bioinformatic analyses

RNA from primary cultures was isolated and purified using a spin column chromatography with the single cell RNA purification kit (Norgen 51800). Library construction was carried out from 5 ng of total RNA using NEBNext® Single Cell/Low Input RNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB) according to the manufacturer's instructions. Each group of libraries was applied to an Illumina flow cell High Output and run on the Illumina Nextseq500 as a 75 pb single read. Image analysis and base calling was carried out using the NCS 2.0.2 and RTA 2.4.11 Illumina software suite implemented on the Illumina sequencing machine. Final file formatting, demultiplexing, and fastq generation were carried out using Bcl2fastq v2.17.1.14. Trimming of reads was performed using Cutadapt software (version 1.9.1 - with parameters -m 50 -q 30,30).[27] The abundance of transcripts was estimated by Kallisto software (version 0.44.0 - with parameters --bias)[6] using the *Rattus norvegicus* transcriptome (Ensembl release 101 - Rnor_6.0 - cDNA). Then, differentially expressed transcripts were identified using the R package DESeq2 which implements a negative binomial model and a Wald test on the data normalized by an internal median ratio procedure (version 1.26.0 - with default parameters and the following thresholds: Log2FoldChange (Log2FC) ≥ 1.5 or ≤ -1.5 and adjusted P (Padj) ≤ 0.05).[21] Functional analysis was performed by Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) with the GSEA software (version 4.1.0 – 1000 permutations, weighted enrichment statistics, gene

set exclusion max size 500 and min size 15)[46] with gene sets from the MSigDB (version 7.2 – gene set collections: h.all, c2.cp.reactome, c5.go.bp, c5.go.mf and c7.all).[46] Enrichment map visualization of GSEA was produced with Cytoscape software (version 3.8.2)[43] and the EnrichmentMap app (Node Cutoff Q-value 0.05 and Edge Cutoff 0.5).[28]

RNA isolation and qRT-PCR

After 24h treatment, ependymal cells were washed with D-Phosphate Buffered Saline (D-PBS) and were collected using Tri Reagent® RNA/DNA/Protein Isolation Reagent (Molecular Research Center) treatment. Total cellular RNAs were extracted using TRI-Reagent® and RNAs were purified by removing genomic DNA using Turbo-DNA-Free Purification Kit (QIAGEN). RNA purity and concentration were determined spectrophotometrically using a BioDrop. 19 ng of total RNA was reverse transcribed to cDNA using the Prime Script RT Reagent Kit (TAKARA OZYMÉ) using Oligo dT Primers and random hexamer primers. Quantitative PCR was performed on a Roche Light Cycler 480 using the Light Cycler 480 SYBR Green 1 master mix. PCR amplification of cDNA was carried out by using a synthetic and nonhomologous poly(A) standard RNA (smRNA) in order to scale the efficiency of the reverse-transcriptase.[33] Standard curves were generated using serial dilutions of primers designed by Eurogentec©. Crossing points on the amplification curves for experimental samples were converted to log copies by comparison to the standard curve. Primers for 12 cytokine and chemokine genes were used (Table 2) and selected based on RNAseq differential analysis (Fig. 5A).

Statistical analyses

All analyses of the microscope images were performed in a blinded fashion. Image analyses were performed with the Fiji software (National Institutes of Health). Graphs and statistical tests were done using Prism 7.0 GraphPad.inc software or R software under Rstudio environment using the package ggplot2 and circstat. Graphs are plotted as medians + 95% CI histograms or violin plots + median. For the comparison between multiple groups, non-parametric Kruskal-Wallis's test was used considering the non-normal distribution (Shapiro-Wilk test) of the data. Dunnet's post-hoc multiple comparison tests were performed to reveal differences between non-treated groups and IgG-treated groups. The level of significance is indicated as follows: * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.001$ and $P \leq 0.0001$.

Data availability

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

Results

Purified IgG from NMO patients induce AQP4 expression alteration and cell enlargement in ependymal cells

To evaluate the effects of NMO-IgG on AQP4 expression in ependymal cells, primary cultures were treated during 24 hours with NMO-IgG purified from 7 different NMO patients (called NMO₁-IgG to NMO₇-IgG) and compared to non-treated (NT) or CTRL-IgG (a purified pool from healthy donors) conditions. In NT and CTRL-IgG conditions, AQP4 was distributed uniformly along lateral membranes (Fig. 1A). After NMO-IgG treatment, AQP4 was aggregated at the lateral membrane for 5/7 patients with the NMO₂-IgG presenting the strongest effect (Fig. 1A, B). Interestingly, this patient was also the only one presenting periventricular lesion around lateral ventricles and 4th ventricle visible on cerebral MRI performed before plasma exchange (Supplementary Fig. 3). Treatments of different durations with NMO₂-IgG were tested (1, 3, 24 and 48 hours). AQP4 started to agglomerate at 3 hours for NMO₂-IgG, but the clearer result was visualized at 24 hours (Supplementary Fig. 4). Cultured ependymal cells appeared to increase in size after NMO-IgG treatment. To confirm this increase in size, we examined dissected wholemounts of adult rat lateral ventricles that were exposed during 24 hours with NMO₂-IgG and fixed for immunolabeling and visualization by confocal microscopy. We only used NMO₂-IgG to reduce the number of animals used. In NT or CTRL-IgG conditions, AQP4 was also expressed at the lateral membrane of ependymal cells and as expected, NMO₂-IgG induced AQP4 agglomeration (Fig. 1C). A clear difference in cell size was found in the NMO₂-IgG condition, compared to the control conditions (Fig. 1D, NT = 101.44 ± 2.34 ; CTRL-IgG = 99.67 ± 2.23 ; NMO₂-IgG = $139.83 \pm 3.54 \mu\text{m}^2$). To summarize, *in vitro* and *ex vivo* experiments showed that NMO-IgG induced AQP4 agglomeration in a patient-dependent manner and cell size enlargement.

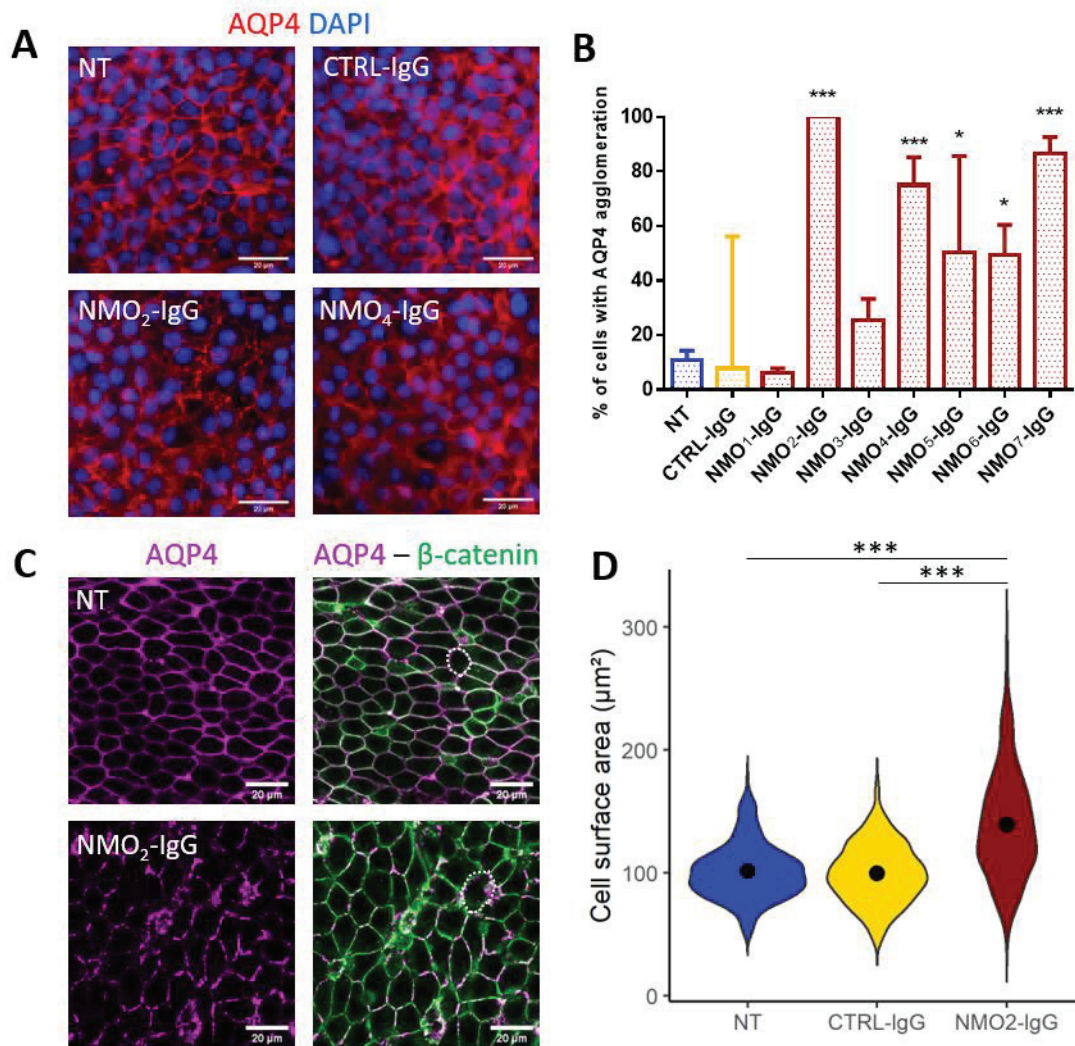


Figure 1 NMO-IgG induced AQP4 agglomeration and ependymal cell enlargement. (A) Microphotographies of primary ependymal cell cultures after 24 hours treatment with CTRL-IgG, NMO₂-IgG, NMO₄-IgG or non-treated (NT) cells labeled for AQP4 (red) and DAPI (blue). In NT and CTRL-IgG conditions, AQP4 is uniformly expressed at the lateral membranes, but not in NMO₂-IgG where AQP4 is agglomerated. NMO₄-IgG presented an intermediate effect on AQP4 agglomeration. (B) The percentage of cells presenting AQP4 agglomeration in microphotographies was increased for 5/7 NMO-IgG (2, 4, 5, 6 and 7) compared to NT (histogram = median + 95% CI, $n = 3$ cultures, 10 fields analyzed/condition). (C) Confocal images of wholemount lateral ventricle wall explants cultured and treated during 24 hours with CTRL-IgG or NMO₂-IgG labeled for AQP4 (magenta) and β -catenin for lateral membranes (green). (D) Violin plots of the cell area (μm^2) of ependymal cells (black dots = median). Cell area was measured (white dot circles as example in C) in confocal images and was increased by NMO₂-IgG (NT: $n = 4$, CTRL-IgG: $n = 3$, NMO₂-IgG: $n = 5$ explants; 10 fields analyzed/explant). Kruskal-Wallis and Dunn's *post hoc* test (all conditions vs NT) were used.

Purified IgG from NMO patients induce alteration of gap junction expression in ependymal cells

Gap junctions are important molecular supports of ependymal cell functions and gap junction alterations has been linked to astrocyte dysfunction induced by NMO-IgG.[38] To test if gap junctions are also affected by NMO-IgG in cultured ependymal cells, we analysed the effects of several NMO-IgG on the expression of Connexin 43 (Cx43), the main gap junction of ependymal cells, on primary cultures after 24 hours treatment.[31] In NT cultures, Cx43 was expressed as agglomerates at the lateral membrane (Fig. 2A). Compared to NT or CTRL-IgG treated cells, NMO-IgG increased Cx43 spot size in a patient-dependent manner (Fig. 2B, NT = 0.218 ± 0.035 ; CTRL-IgG = 0.295 ± 0.069 ; NMO1-IgG = 0.233 ± 0.029 ; NMO2-IgG = 0.348 ± 0.042 ; NMO3-IgG = 0.346 ± 0.067 ; NMO4-IgG = 0.325 ± 0.053 ; NMO5-IgG = 0.303 ± 0.039 ; NMO6-IgG = 0.283 ± 0.031 ; NMO7-IgG = $0.282 \pm 0.038 \mu\text{m}^2$). These results suggest that NMO-IgG modulate Cx43 expression reducing gap junction communication.

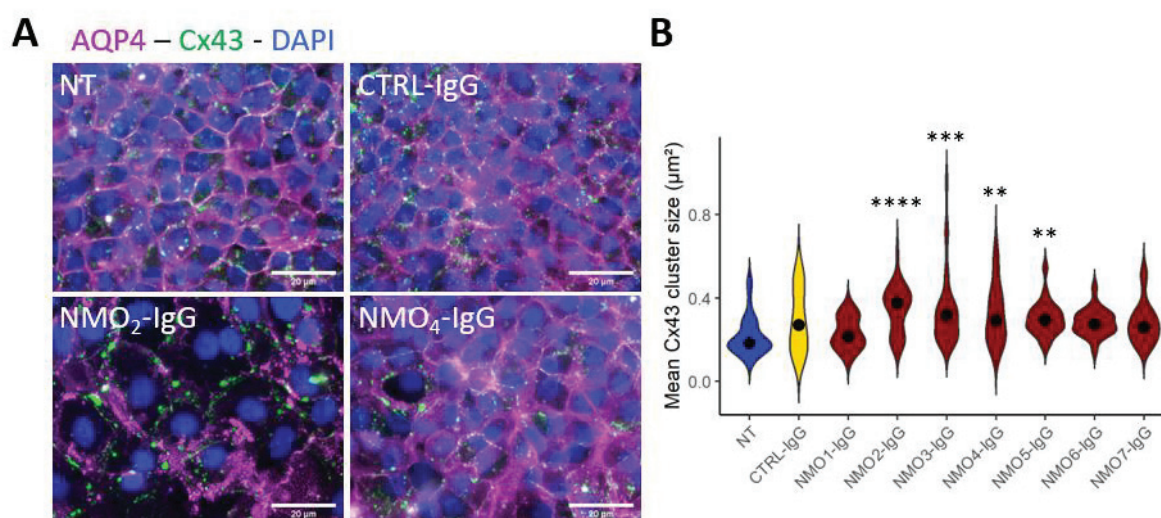


Figure 2 NMO-IgG induced gap junction expression and function impairments. (A) Microscope images of ependymal cells labeled for AQP4 (magenta) and Cx43 (green) after 24 hours of treatment with CTRL-IgG or NMO-IgG showing Cx43 particles increased size. (B) Violin plot of the mean Cx43 particle size (μm^2) after 24 hours treatment (black dots = median). NMO-IgG increased Cx43 particles size in a patient dependent manner ($n = 3$ cultures, 10 fields analyzed/condition). Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc multiple comparison were used (all conditions vs NT).

Purified IgG from NMO patients induce ependymal cell cilia motility impairments and planar polarity disruption

Cilia are of utmost importance for the regulation of ependymal cell functions. To test if NMO-IgG functionally alters the motility of ependymal cell cilia, we performed an ependymal flow assay by depositing a small amount of fluorescent microbeads on the surface of wholemounts of adult rat lateral walls, after 24 hours treatment with NMO₂-IgG or CTRL-IgG. We recorded the bead's trajectories using a videomicroscope (Video 1 and 2, online resource) and measured the speed and the directionality of the bead diffusion. Directionality was defined as the ratio between the distance between the first position and the last position of the bead (d) on the total length of bead's trajectory (D), and the speed was calculated by dividing D by the time (Fig. 3A). In NT conditions, beads deposited as shown in the scheme (Fig. 3B) were propelled ventro-rostrally (Fig. 3A). In NT and CTRL-IgG conditions, beads' speed was 253.2 ± 8.4 and 257.3 ± 10.4 $\mu\text{m/s}$ respectively, whereas NMO₂-IgG significantly reduced the bead's speed to 212.8 ± 9.3 $\mu\text{m/s}$ compared to both NT and CTRL-IgG (Fig. 3C). Similarly, NMO₂-IgG also reduced the directionality in comparison to NT and CTRL-IgG (Fig. 3D, NT = 0.924 ± 0.006 ; CTRL-IgG = 0.921 ± 0.007 ; NMO₂-IgG = 0.896 ± 0.007).

Ependymal planar polarity, which is the orientation of motile cilia from neighboring cells in the same direction, is essential for the proper propelling of CSF or microbeads.[45, 47] To test if NMO-IgG alters the planar organization of ependymal cilia, we examined the planar polarity on the ventricular wall wholemounts after 24 hours treatment with CTRL-IgG and NMO₂-IgG labeled for β -catenin (a marker of intercellular junctions) and γ -tubulin (a marker of ciliary basal bodies) using confocal microscopy. Basal body patch angles (BBPA) were measured by drawing arrows from the center of ependymal cells towards basal body patch centers. For each confocal image, each BBPA was subtracted to the median of the field. The planar polarity was measured as the distribution of BBPA deviations to median. In NT wholemounts, the distribution of BBPA deviations to median was not uniform confirming polarity (Fig. 3E, F). For CTRL-IgG and NMO₂-IgG treated wholemounts, the distribution of BBPA deviations to median was dispersed in comparison to NT wholemounts meaning polarity disruption (Fig. 3E, F). The mean BBPA deviation was significantly different between NT and NMO₂-IgG but not CTRL-IgG treated wholemounts (NT = $50.39 \pm 8.61^\circ$; CTRL-IgG = $61.39 \pm 7.85^\circ$; NMO₂-IgG = $77.18 \pm 8.04^\circ$) suggesting that the planar polarity disruption is stronger for NMO₂-IgG than for CTRL-IgG (Fig. 3E). Globally, we showed that NMO-IgG altered cilia motility and the

planar polarization of cilia tufts but did not alter the structural morphology of cilia (data not shown). In conclusion, NMO-IgG may impair cilia ability to propel CSF by disrupting the orientation of cilia tufts.

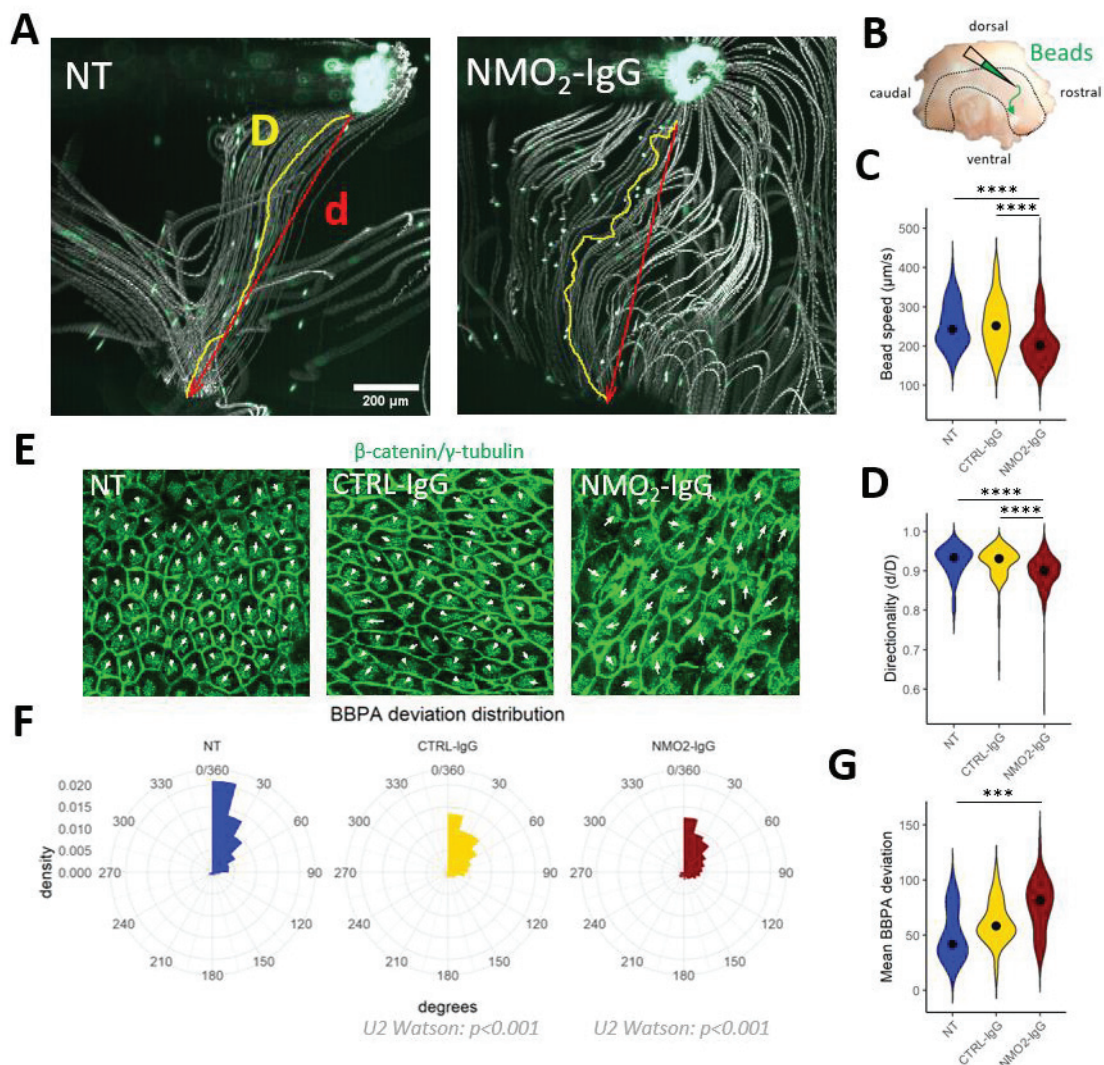


Figure 3 NMO-IgG altered cilia motility and the planar polarity of cilia. (A) Videomacroscopic overtime stacks of fluorescent microbead trajectories applied on the surface of cultured wholemounts after 24 hours treatment. The trajectory (D, yellow line) and the distance between the start and end point of cilia propelled beads (d, red line) were measured. (B) Schematic view of the bead deposition localization on the wholemounts. Violin plot showing that the bead's speed ($\mu\text{m/s}$) (C) and the directionality (d/D) (D) were significantly reduced after NMO₂-IgG treatment ($n = 6$ explants) compared to NT ($n = 6$ explants) and CTRL-IgG ($n = 5$ explants) (black dots = median, 3 videos analyzed/condition, 10 beads/video). (E) Confocal images of cultured lateral wall explants treated 24 hours with CTRL-IgG or NMO₂-IgG. Cilia basal bodies were labeled with γ -tubulin and intercellular junctions with β -catenin (both green). Vectors were drawn between cell center and basal body patches (white

arrows). (F) Basal body patch angle (BBPA) deviations to the median of each field are plotted on radial charts (angles in degrees). The distribution of BBPA in NT was uniform (Watson's Test for Circular Uniformity: $U = 46.7227$; $P < 0.001$) and was heterogeneously distributed in CTRL-IgG ($n = 5$ explants) and NMO₂-IgG ($n = 7$ explants) conditions compared to NT ($n = 6$ explants, Watson's Two-Sample Test of Homogeneity: NT vs Ctrl-IgG: $U_2 = 0,6417$; $P < 0,001$; NT vs NMO-IgG: $U_2 = 2,5419$; $P < 0,001$, 5 fields analyzed/condition). (G) Violin plot showing that the mean BBPA deviation to median was significantly different between NMO₂-IgG and NT but not between CTRL-IgG and NT (black dots = median). Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc multiple comparison.

Activation of subventricular neural stem cells proliferation after

The subventricular neural stem cells (SV-NSCs) has been shown to proliferate in different neuroinflammatory conditions.[36, 54] However, the response of SV-NSCs is still unclear in NMO models.[12] Here, we evaluated the effects of NMO-IgG treatment during 24 hours on wholemount explant cultures. In the ependymal layer, quiescent neural stem cells (qNSCs) called B1 cells are able to produce precursors for neuroblasts and glial cells and project one process harbouring a single sensory cilium that is easily identified at the center of ependymal surrounding pinwheels (Fig. 4A, yellow square).[31] After 24 hours treatment, NMO₂-IgG increased the number of B1 processes compared to NT and CTRL-IgG conditions (Fig. 4A, B ; NT = 33.79 ± 5.88 ; CTRL-IgG = 48.83 ± 10.65 ; NMO₂-IgG = 68.21 ± 8.39 number of B1 processes). The number of proliferating cells under the ependymal layer was measured with the marker of proliferation Ki67. The percentage of subventricular Ki67 cells was increased after NMO₂-IgG treatment compared to NT and CTRL-IgG treatment (Fig. 4A-C, NT = $7.29 \pm 1.48\%$; CTRL-IgG = $10.55 \pm 3.55\%$; NMO₂-IgG = $17.49 \pm 5.45\%$). Thus, NMO-IgG may activate qNSCs or other progenitor cells to produce neural progenitors in the subventricular zone. Most cells produced by the SVZ in rodents are neuroblasts and their migration is dependent of ciliary beating and polarity.[40] Therefore, cultured explants were labeled for doublecortin (DCX) allowing visualization of the migratory neuroblast network. After treatment with NMO₂-IgG, the network was denser compared to NT or CTRL-IgG conditions (Fig. 4D). These results suggest that NMO-IgG increased the proliferation of migrating neuroblasts in the subventricular zone.

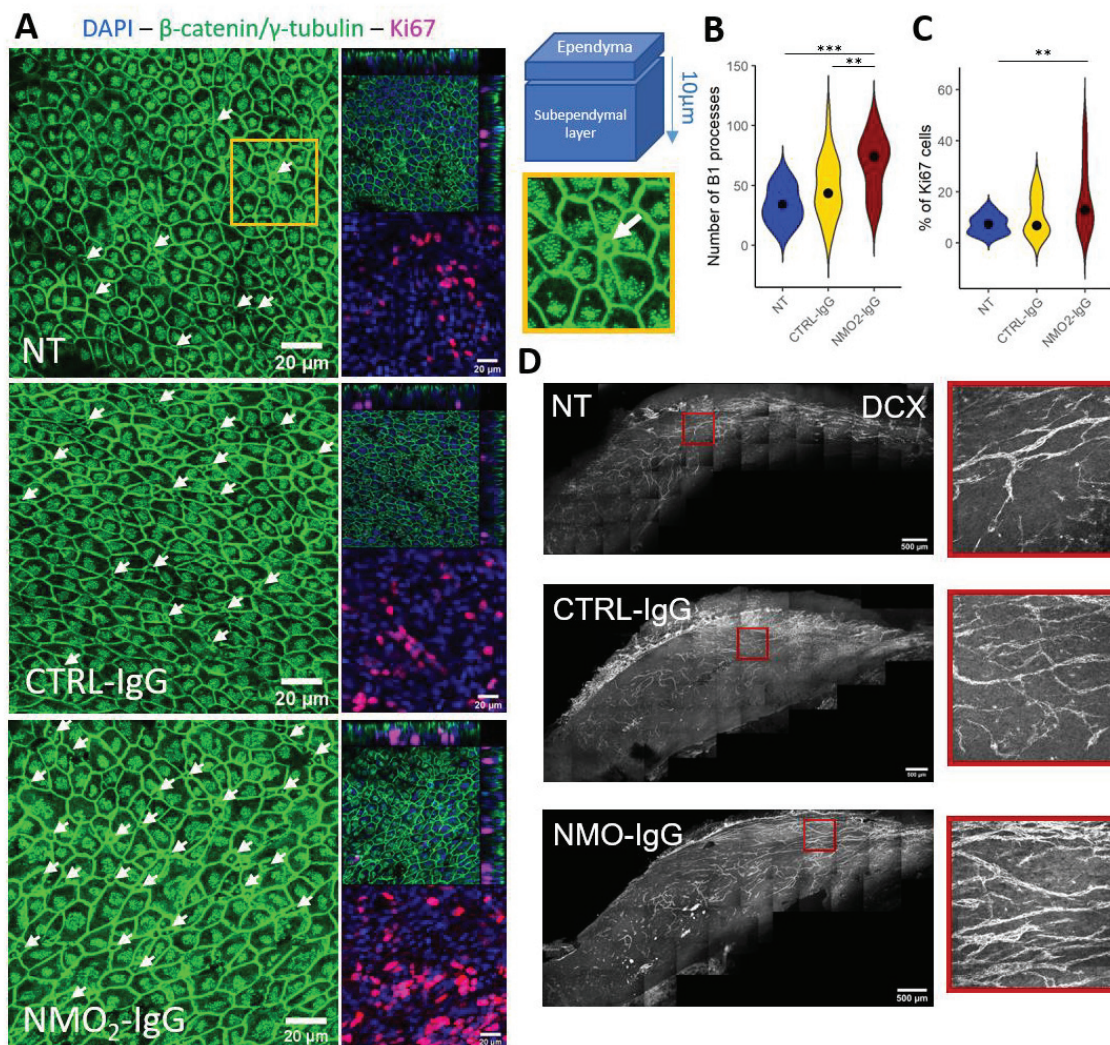


Figure 4 NMO-IgG induced subventricular stem cell proliferation in lateral wall explant culture. (A) Confocal images of ventricular wall wholemounts treated during 24 hours with CTRL-IgG or NMO₂-IgG and labeled for β -catenin and γ -tubulin (green), Ki67 (magenta) and DAPI (blue). B1 qNCS processes were identified with their monocilium (white arrow) in the center of pinwheels (yellow square). Subependymal Ki67⁺ were counted until 10 μ m under the ependymal layer (as shown in the orthogonal views and in the schematic). (B) Violin plot showing that NMO₂-IgG increased the number of B1 NSCs processes compared to NT and CTRL-IgG (NT: $n = 6$, CTRL-IgG: $n = 5$, NMO₂-IgG: $n = 7$ explants; black dots = mean, 5 fields analyzed/condition). (C) Violin plot showing that the number of proliferating subventricular was significantly increased by NMO₂-IgG compared to NT (NT: $n = 5$, CTRL-IgG: $n = 4$, NMO₂-IgG: $n = 5$ explants; black dots = median, 5 fields analyzed/condition). Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc multiple comparison. (D) Tiled confocal images of cultured lateral wall explants after treatment with CTRL-IgG and NMO₂-IgG labeled for doublecortin (DCX) allowing visualization of the migratory neuroblast network. The DCX network was denser after NMO₂-IgG treatment as shown in the zoomed images in the red squares.

Inflammatory response induced by purified IgG from NMO patients in ependymal cells

We performed a transcriptional analysis by RNA sequencing of ependymal cells from primary cultures and compared NT, CTRL-IgG and NMO₂-IgG treated cells. CTRL-IgG significantly increased the expression of 118 transcripts and decreased the expression of 80 transcripts compared to NT and NMO₂-IgG increased the expression of 295 transcripts and decreased the expression of 70 transcripts compared to NT (Supplementary Fig. 5A, B). In all the genes differentially expressed by CTRL-IgG and NMO₂-IgG, 27% were in common, 18.5% were specific to CTRL-IgG and 54.5% were specific to NMO₂-IgG (Supplementary Fig. 5C, online resource). Even if a high proportion of transcripts were commonly upregulated or downregulated, these results suggest that “healthy” IgGs induced a specific transcriptomic response by ependymal cells that was not found for the NMO pathogenic ones. To investigate the functional differences between CTRL-IgG and NMO₂-IgG compared to NT, we performed a gene set enrichment analysis (GSEA). NMO₂-IgG upregulated gene sets related to immune system activity (23 gene sets more than CTRL-IgG), cell cycle regulation, cellular response to stress and gap junction assembly (Supplementary Fig. 5D). Interestingly, we found one gene set related to intraciliary transport downregulated in NMO₂-IgG vs NT (Supplementary Fig. 6A, *FDR q-value* = 0.63 and *P* = 0.002, online resource), with a significant decrease in the Log₂FC for *Lca5* (Supplementary Fig. 6B, NT vs NMO₂-IgG (*P*_{adj} < 0.01, online resource), NT vs CTRL-IgG (non-significant) and NMO₂-IgG vs CTRL-IgG (*P*_{adj} < 0.001)).

Since there was a strong upregulation of gene sets related to inflammatory processes revealed by the GSEA, we then determined whether NMO-IgG induces a chemokine/cytokine response of ependymal cells by analyzing the RNAseq data and with qRT-PCR. In the RNAseq differential analysis, a panel of 11 cytokines has been selected (Fig. 5A - |Log₂FC| ≥ 1.5 or *P*_{adj} < 0.05 in at least one comparison (NMO₂-IgG vs NT, CTRL-IgG vs NT or NMO₂-IgG vs CTRL-IgG). NMO₂-IgG increased IL10, IL33, CXCL1, CXCL3, CXCL9, CXCL13, CCL2, CCL6 and CCL19, and downregulated IL6 compared to NT (Fig. 5A). NMO₂-IgG upregulated all these cytokines when compared to CTRL-IgG (Fig. 5A). To confirm these results, we performed qRT-PCR after 24 hours treatment on primary ependymal cell cultures. IL6 was significantly downregulated by CTRL-IgG and NMO₂-IgG and TNF-α, CXCL9, CXCL13 and CCL12 was significantly upregulated by NMO₂-IgG (Fig. 5B).

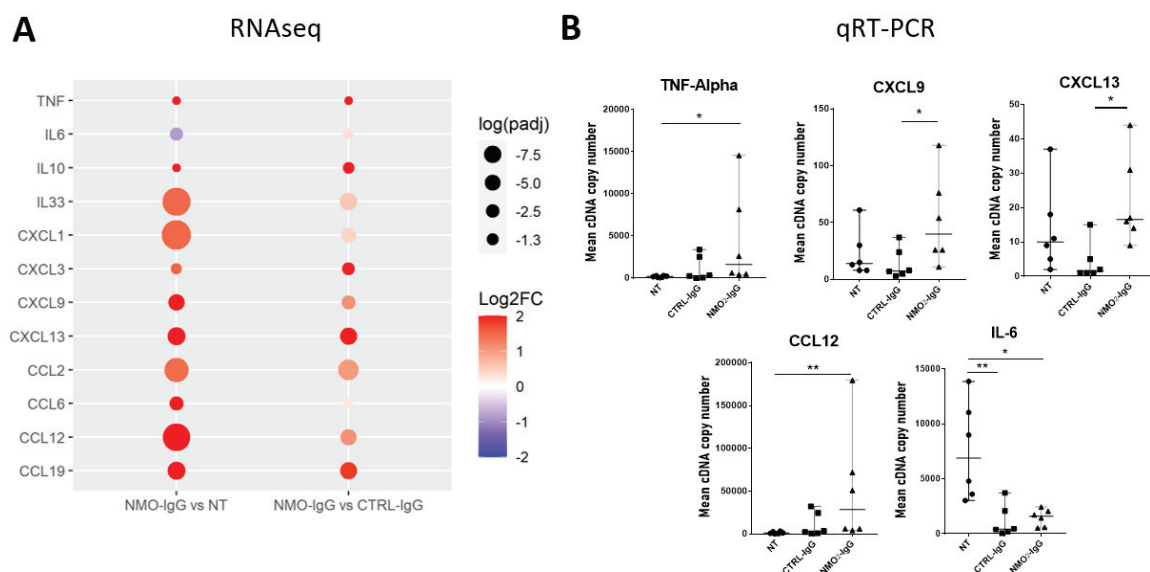


Figure 5 NMO₂-IgG induced the expression of a specific panel of cytokines in ependymal cells. (A) Dot-plot showing the different cytokines upregulated or downregulated in at least one comparison between NMO₂-IgG vs NT, CTRL-IgG vs NT or NMO₂-IgG vs CTRL-IgG treated primary ependymal cell cultures ($|\text{Log}_2\text{FC}| \geq 1.5$ or $P_{adj} \leq 0.05$ ($\log(0.05) = 1.3$)). NMO₂-IgG increased TNF- α , IL10, IL33, CXCL1, CXCL3, CXCL9, CXCL13, CCL2, CCL6 and CCL19 compared to NT and CTRL-IgG, and downregulated IL6 compared to NT but not CTRL-IgG (B) Dot plots of the number of cDNA copies obtained by qRT-PCR after 24 hours treatment with CTRL-IgG or NMO₂-IgG for the cytokines selected in A. IL6 was significantly downregulated by CTRL-IgG and NMO₂-IgG and TNF- α , CXCL9, CXCL13 and CCL12 were significantly upregulated by NMO₂-IgG. Kruskal-Wallis's test and Dunn's post hoc multiple comparison (plot = median + 95% CI, $n = 3$ cultures, 2 duplicates/culture).

Discussion

We showed that purified IgG from NMO patients altered ependymal cell morphology and functions, both on primary culture of ependymal cells and on adult rat lateral ventricle explants. This changes included: i) AQP4 agglomeration at the lateral membrane accompanied by an increase of ependymal cell size; ii) alteration of gap junction expression and functions, with the increase of Cx43 particle size; iii) depolarisation of ciliary basal bodies and alteration of cilia motility in an ependymal flow assay; iv) activation of the subventricular neural stem cell niche with an increase of B1 processes, an increase of Ki67 dividing cells and a densification of the migrating neuroblast network in the subependymal zone; v) strong activation of transcriptomic pathways linked to cell proliferation and to immune system activity, associated to a specific

cytokine/chemokine profile. In summary, we showed that NMO-IgG triggered a reactive phenotype in ependymal cells as shown by cell enlargement and function impairments, an activation of the subventricular zone and a production of inflammatory cytokines and chemokines.

NMO-IgG binding to AQP4 on astrocyte leads to various outcomes such as cell death and necrosis, downregulation of AQP4 and GFAP expression, gliosis with GFAP overexpression, or astrocytic dysfunction with preserved AQP4 and GFAP.[32] These outcomes are highly dependent of the disease course and the lesion site in the CNS, but also on the AQP4 isoform prevailing (M1 or M23).[14, 48] The M23 isoform is the major constituent of the transmembrane structures called orthogonal array of particles (OAPs) visible by electronic microscopy.[50] NMO-IgG internalizes more easily the M1 isoform than the M23 isoform whereas the M23 targeting induces the enlargement of OAPs.[14] For ependyma, different outcomes were also observed in an animal model and in patient tissue where ependymal denudation and ependymal preservation with AQP4 loss and complement deposition were co-observed in the same samples.[2, 13] Here, we showed AQP4 agglomeration at the lateral membrane in ependymal cells after NMO-IgG treatment. The expression ratio of the different isoforms of AQP4 in ependymal cells has not been evaluated but the strong presence of OAPs on ependymal cells suggest that AQP4 agglomerates might resist internalization in ependymal cells as it is for astrocytes.[23] The increase of ependymal cell size suggests an impairment of cell volume homeostasis due to an alteration of water regulation. However, such ependymal cell size increase was also observed in response to inflammatory stimuli in mice models of EAE and stroke.[36, 54] Therefore, we cannot assure the water balance is impaired, and it might rather correspond to a reactive phenotype harboured by ependymal cells.[36, 54] In contrast to the ependymal denudation observed in post-mortem tissue of NMO patients, we did not observe any loss of ependymal cells.[13] The cell viability was not decreased after NMO-IgG treatment (data not shown) and we did not find activation of apoptotic or necrotic pathways in our RNAseq analysis. The difference may be explained by the fact that we did not use complement in our models and this suggests that although NMO-IgG alone can modulate ependymal cell functions and disorganise AQP4 expression, the complement is necessary to trigger ependymal cell death and denudation.[9]

We found that NMO-IgG impair cilia motility and basal body planar polarity. Several hypotheses can be proposed for such ependymal dysfunction. First, the agglomeration of AQP4

and the enlargement of ependymal cells could induce cytoskeletal disorganization or provide a non molecular mechanical signal inducing the delocalization of planar cell polarity regulators.[24, 47] Second, it has been shown that Cx43 expression and calcium waves propagated through gap junctions regulates the maintenance of cilia motility.[55] Consequently, the gap junction communication deficit we observed in our model could explain by itself the effects on cilia motility. Third, cilia motility deficits and impairment of cilia orientation were observed in other neuroinflammatory models suggesting a direct impact of inflammation in cilia motility and basal body polarization.[36, 54] Therefore, gliotic activation and inflammation induced in ependymal cells by NMO-IgG could alter cilia motility and basal body orientation. Another hypothesis emerged from the RNAseq data analysis showing a strong downregulation of LCA5. LCA5 is involved in Leber congenital amaurosis (LCA) which causes childhood blindness via cell death of retinal photoreceptor.[15] KO of LCA5 caused photoreceptor dystrophy due to intraciliary transport trafficking deficit. This deficit was linked to mislocalization of Ift88, a protein regulating intraflagellar trafficking of proteins.[37] Intraflagellar transport is essential for the development and the maintenance of flagella and cilia via the trafficking of cilia components, signalling molecules or membrane channels.[5] Our results suggest that cytoskeletal or homeostatic changes could impair intraciliary trafficking and thus be linked to cilia motility alteration.

Evaluating the integrity of neurogenic niches in demyelinating diseases is primordial if one wants to stimulate neurogenesis to repair injured areas. Periependymal lesions in NMO suggest that the subventricular niche may be compromised, lacking the ability to produce new cells for tissue repair.[35] Sera from NMO patients can enhance the production by SVZ neurospheres of GFAP+ cells but reduce that of Tuj1+ (neurons) and Olig2+ (OPC) cells.[12] Similarly, we found that NMO-IgG activates the proliferation of subventricular cells and of qNSCs. NMO-IgG might have an effect not only directly on NSCs but also indirectly on targeting ependymocytes and astrocytes, leading to the release of inflammatory cytokines or transcription factors. The increase proliferation of B1 astrocytes could be due to a direct targeting by NMO-IgG but not to anti-AQP4 antibodies since these cells does not express AQP4 [56]. Belenguer et al. showed that TNF- α regulates VZ-NSCs differentiation and proliferation.[4] Therefore, the production of TNF- α by ependymal cells in response to NMO-IgG observed in our model could explain the proliferation of qNSCs. In addition, it is known that ciliary beating and the correct propulsion of CSF regulate the organization of rostral migratory stream of neuroblast

produced in the SVZ migrating towards the olfactory bulb.[40] Therefore, the deficit in ciliary beating shown in this study suggests that the rostral migratory stream might be impaired, hence compromising neuroblast migration. Since the migrating neuroblast network was denser, it suggests that neuroblast might stagnate. Parallely, reducing CSF circulation may lead to accumulation of transcription factors and inflammatory molecules activating the subventricular niche. However, this over activation of the niche may lead in long-term exhaustion of precursor cells and reduce neural and glial repair.

Our findings support an early role for ependymocyte impairments in the NMO pathogenesis. In agreement, Guo et al. proposed a suit of events beginning with NMO-IgG altering choroid plexus's epithelial cells expressing AQP4 and favoring CSF entry of NMO-IgG.[13] Since ependymal cells harbour low levels of tight junctions, NMO-IgG present in the CSF could then easily reach and bind AQP4 expressed at the basolateral membrane of ependymal cells and subventricular astrocytes.[52] Astrocytes might thus be first targeted and fragilized by NMO-IgG penetrating parenchyma through the ependymal interface, leading to a blood-brain barrier (BBB) weakening from the inside. Our previous work supports this hypothesis. Indeed, we showed accumulation of rat IgG in periventricular areas in a NMO rat model and that purified IgG from NMO patients could alter BBB permeability, suggesting that the entry of rat IgG in parenchyma was due to BBB weakening. Since NMO-IgG was administered directly in the ventricles, BBB weakening could occur internally via CSF to parenchyma entry of NMO-IgG.[7] Furthermore, we found an upregulation of chemokines, namely CXCL9, CXCL13 and CCL12 that are known to stimulate the activation and recruitment of T-cells, B-cells and macrophages respectively, and has been shown to be elevated in the CSF of NMO patients or after NMO-IgG treatment of astrocytes.[1, 16, 18] Thus ependymal cells produced pro-inflammatory chemokines that possibly participate in the recruitment of invading immune cells towards periventricular lesions in the acute phase of NMO. The idea that the CSF presence of NMO-IgG is pathogenic is reinforced by the fact that the detection of NMO-IgG in the CSF during attacks correlates with astrocytic damage, BBB breakdown and the release of proinflammatory cytokines and chemokines in patients.[39] In addition, troubles in CSF circulation could contribute to the NMO pathogenesis by a lack of clearance of toxic wastes and autoantibodies. Furthermore, in a MRI study, the lateral and 3rd ventricle volumes were increased in NMO patients compared to a control group.[41]

This study presented some limits. First, it is probable that in NMO several auto-antibodies are involved in the pathophysiology (e.g. anti-nuclear or anti-neutrophils).[11] In addition, AQP4-Ab autoreactivity is probably polyclonal in the human disease. Thus, we decided, on purpose, to use IgG from NMO patients that reflect the diversity of the process and we can not exclude that some alterations could be mediated by other antibodies in our models. Second, after NMO-IgG treatment *in vitro*, there was an upregulation of gene sets linked to cell proliferation (Supplementary Fig. 5D). However, brain ependymal cells does not proliferate in physiological conditions and neither in pathological conditions.[42, 44] Since we did not observe proliferation in the *ex vivo* model, this effect might be due to the culture conditions.

Conclusion

Using original *in vitro* and *ex vivo* models, merging proteomic, transcriptomic and functional evaluation, we showed that ependymal cells in contact with autoantibodies from NMO patients become reactive and display rapid morphological and functional changes that could enhance and facilitate tissue injury. This study provides a new perspective on NMO that should be considered not only as an astrocytopathy but also as an ependymocytopathy, and opens the path for targeted modulation therapy on ependyma.

Acknowledgements

We thank NeuroBioTec (Hospices Civils de Lyon, France) for providing NMO patients' samples and plasmaphereses. We thank Nathalie Spassky (ENS Paris, France) for her advices on wholemount dissection and immunolabeling. We thank Olivier Raineteau (SBRI Lyon, France) for his help with GSEA.

Funding

The present study is supported by a grand from the ARSEP Foundation.

Competing interests

The authors report no competing interests.

References

1. Alvarez E, Piccio L, Mikesell RJ, Klawiter EC, Parks BJ, Naismith RT, Cross AH (2013) CXCL13 is a biomarker of inflammation in multiple sclerosis, neuromyelitis optica, and other neurological conditions. *Mult Scler* 19:1204–1208. doi: 10.1177/1352458512473362
2. Asgari N, Khorooshi R, Lillevang ST, Owens T (2013) Complement-dependent pathogenicity of brain-specific antibodies in cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroimmunology* 254:76–82. doi: 10.1016/j.jneuroim.2012.09.010
3. Banker P, Sonni S, Kister I, Loh JP, Lui YW (2012) Pencil-thin ependymal enhancement in neuromyelitis optica spectrum disorders. *Multiple Sclerosis Journal* 18:1050–1053. doi: 10.1177/1352458511431730
4. Belenguer G, Duart-Abadia P, Jordán-Pla A, Domingo-Muelas A, Blasco-Chamarro L, Ferrón SR, Morante-Redolat JM, Fariñas I (2021) Adult Neural Stem Cells Are Alerted by Systemic Inflammation through TNF- α Receptor Signaling. *Cell Stem Cell* 28:285-299.e9. doi: 10.1016/j.stem.2020.10.016
5. Blacque OE, Cevik S, Kaplan OI (2008) Intraflagellar transport: from molecular characterisation to mechanism. *Front Biosci* 13:2633–2652. doi: 10.2741/2871
6. Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L (2016) Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol* 34:525–527. doi: 10.1038/nbt.3519
7. Cobo-Calvo A, Ruiz A, Richard C, Blondel S, Cavagna S, Strazielle N, Ghersi-Egea J-F, Giraudon P, Marignier R (2020) Purified IgG from aquaporin-4 neuromyelitis optica spectrum disorder patients alters blood-brain barrier permeability. *PLoS ONE* 15:e0238301. doi: 10.1371/journal.pone.0238301
8. Del Bigio MR (2010) Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathologica* 119:55–73. doi: 10.1007/s00401-009-0624-y
9. Diamond B, Huerta PT, Mina-Osorio P, Kowal C, Volpe BT (2009) Losing your nerves? Maybe it's the antibodies. *Nat Rev Immunol* 9:449–456. doi: 10.1038/nri2529
10. Duan T, Verkman AS (2020) Experimental animal models of aquaporin-4-IgG-seropositive neuromyelitis optica spectrum disorders: progress and shortcomings. *Brain Pathol* 30:13–25. doi: 10.1111/bpa.12793

11. Ducloyer J-B, Marignier R, Wiertlewski S, Lebranchu P (2021) Optic neuritis classification in 2021. *Eur J Ophthalmol* 11206721211028050. doi: 10.1177/11206721211028050
12. Gómez-Pinedo U, García-Ávila Y, Gallego-Villarejo L, Matías-Guiu JA, Benito-Martín MS, Esteban-García N, Sanclemente-Alamán I, Pytel V, Moreno-Jiménez L, Sancho-Bielsa F, Vidorreta-Ballesteros L, Montero-Escribano P, Matías-Guiu J (2021) Sera from Patients with NMOsD Reduce the Differentiation Capacity of Precursor Cells in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci* 22:5192. doi: 10.3390/ijms22105192
13. Guo Y, Weigand SD, Popescu BF, Lennon VA, Parisi JE, Pittock SJ, Parks NE, Clardy SL, Howe CL, Lucchinetti CF (2017) Pathogenic implications of cerebrospinal fluid barrier pathology in neuromyelitis optica. *Acta Neuropathologica* 133:597–612. doi: 10.1007/s00401-017-1682-1
14. Hinson SR, Romero MF, Popescu BFG, Lucchinetti CF, Fryer JP, Wolburg H, Fallier-Becker P, Noell S, Lennon VA (2012) Molecular outcomes of neuromyelitis optica (NMO)-IgG binding to aquaporin-4 in astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:1245–1250. doi: 10.1073/pnas.1109980108
15. den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, Cremers FPM (2008) Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res* 27:391–419. doi: 10.1016/j.preteyeres.2008.05.003
16. Howe CL, Kaptzan T, Magaña SM, Ayers-Ringler JR, LaFrance-Corey RG, Lucchinetti CF (2014) Neuromyelitis optica IgG stimulates an immunological response in rat astrocyte cultures. *Glia* 62:692–708. doi: 10.1002/glia.22635
17. Kira J (2011) Autoimmunity in neuromyelitis optica and opticospinal multiple sclerosis: Astrocytopathy as a common denominator in demyelinating disorders. *Journal of the Neurological Sciences* 311:69–77. doi: 10.1016/j.jns.2011.08.043
18. Koper OM, Kamińska J, Grygorczuk S, Zajkowska J, Kemonia H (2018) CXCL9 concentrations in cerebrospinal fluid and serum of patients with tick-borne encephalitis. *Arch Med Sci* 14:313–320. doi: 10.5114/aoms.2016.58667

19. Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, Nakashima I, Weinshenker BG (2004) A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *The Lancet* 364:2106–2112
20. Long Y, Chen M, Zhang B, Gao C, Zheng Y, Xie L, Gao Q, Yin J (2014) Brain gadolinium enhancement along the ventricular and leptomeningeal regions in patients with aquaporin-4 antibodies in cerebral spinal fluid. *Journal of Neuroimmunology* 269:62–67. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.02.006
21. Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
22. Lucchinetti CF, Guo Y, Popescu BFGH, Fujihara K, Itoyama Y, Misu T (2014) The Pathology of an Autoimmune Astrocytopathy: Lessons Learned from Neuromyelitis Optica: Autoimmune Astrocytopathy. *Brain Pathology* 24:83–97. doi: 10.1111/bpa.12099
23. Mack A, Neuhaus J, Wolburg H (1987) Relationship between orthogonal arrays of particles and tight junctions as demonstrated in cells of the ventricular wall of the rat brain. *Cell Tissue Res* 248:619–625. doi: 10.1007/bf00216492
24. Mahuzier A, Shihavuddin A, Fournier C, Lansade P, Faucourt M, Menezes N, Meunier A, Garfa-Traoré M, Carlier M-F, Voituriez R, Genovesio A, Spassky N, Delgehyr N (2018) Ependymal cilia beating induces an actin network to protect centrioles against shear stress. *Nat Commun* 9:2279. doi: 10.1038/s41467-018-04676-w
25. Marignier R, Nicolle A, Watrin C, Touret M, Cavagna S, Varrin-Doyer M, Cavillon G, Rogemond V, Confavreux C, Honnorat J, Giraudon P (2010) Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury. *Brain* 133:2578–2591. doi: 10.1093/brain/awq177
26. Marignier R, Ruiz A, Cavagna S, Nicole A, Watrin C, Touret M, Parrot S, Malleret G, Peyron C, Benetollo C, Auvergnon N, Vukusic S, Giraudon P (2016) Neuromyelitis optica study model based on chronic infusion of autoantibodies in rat cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroinflammation* 13. doi: 10.1186/s12974-016-0577-8
27. Martin M (2011) Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads. 10–12

ARTICLE

28. Merico D, Isserlin R, Stuecker O, Emili A, Bader GD (2010) Enrichment map: a network-based method for gene-set enrichment visualization and interpretation. *PLoS One* 5:e13984. doi: 10.1371/journal.pone.0013984
29. Meunier A, Sawamoto K, Spassky N (2020) Chapter 42 - Ependyma. In: Rubenstein J, Rakic P, Chen B, Kwan KY (eds) *Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS (Second Edition)*. Academic Press, pp 1021–1036
30. Mirzadeh Z, Doetsch F, Sawamoto K, Wichterle H, Alvarez-Buylla A (2010) The Subventricular Zone En-face: Wholemount Staining and Ependymal Flow. *Journal of Visualized Experiments*. doi: 10.3791/1938
31. Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2008) Neural Stem Cells Confer Unique Pinwheel Architecture to the Ventricular Surface in Neurogenic Regions of the Adult Brain. *Cell Stem Cell* 3:265–278. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.004
32. Misu T, Höftberger R, Fujihara K, Wimmer I, Takai Y, Nishiyama S, Nakashima I, Konno H, Bradl M, Garzuly F, Itoyama Y, Aoki M, Lassmann H (2013) Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica. *Acta Neuropathologica* 125:815–827. doi: 10.1007/s00401-013-1116-7
33. Morales A, Bonnet C, Bourgoin N, Touvier T, Nadam J, Laglaine A, Navarro F, Moulin C, Georges B, Pequignot J-M, Bezin L (2006) Unexpected expression of orexin-B in basal conditions and increased levels in the adult rat hippocampus during pilocarpine-induced epileptogenesis. *Brain Res* 1109:164–175. doi: 10.1016/j.brainres.2006.06.075
34. Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP (1997) Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *Journal of Neuroscience* 17:171–180
35. Pittock SJ, Weinshenker BG, Lucchinetti CF, Wingerchuk DM, Corboy JR, Lennon VA (2006) Neuromyelitis optica brain lesions localized at sites of high aquaporin 4 expression. *Arch Neurol* 63:964–968. doi: 10.1001/archneur.63.7.964
36. Pourabdolhossein F, Gil-Perotín S, Garcia-Belda P, Dauphin A, Mozafari S, Tepavcevic V, Manuel Garcia Verdugo J, Baron-Van Evercooren A (2017) Inflammatory demyelination

induces ependymal modifications concomitant to activation of adult (SVZ) stem cell proliferation: POURABDOLHOSSEIN et al. *Glia* 65:756–772. doi: 10.1002/glia.23124

37. Qu Z, Yimer TA, Xie S, Wong F, Yu S, Liu X, Han S, Ma J, Lu Z, Hu X, Qin Y, Huang Y, Lv Y, Li J, Tang Z, Liu F, Liu M (2019) Knocking out *lca5* in zebrafish causes cone-rod dystrophy due to impaired outer segment protein trafficking. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1865:2694–2705. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.07.009

38. Richard C, Ruiz A, Cavagna S, Bigotte M, Vukusic S, Masaki K, Suenaga T, Kira J-I, Giraudon P, Marignier R (2020) Connexins in neuromyelitis optica: a link between astrocytopathy and demyelination. *Brain*. doi: 10.1093/brain/awaa227

39. Sato DK, Callegaro D, Jorge H, Frederico M, Nakashima I, Nishiyama S, Takahashi T, Simm RF, Apostolos-Pereira SL, Misu T (2014) Cerebrospinal fluid aquaporin-4 antibody levels in neuromyelitis optica attacks. *Annals of neurology* 76:305–309

40. Sawamoto K (2006) New Neurons Follow the Flow of Cerebrospinal Fluid in the Adult Brain. *Science* 311:629–632. doi: 10.1126/science.1119133

41. Schneider R, Bellenberg B, Kleiter I, Gold R, Köster O, Weiler F, Hahn H, Lukas C (2017) Cervical cord and ventricle affection in neuromyelitis optica. *Acta Neurol Scand* 135:324–331. doi: 10.1111/ane.12601

42. Shah PT, Stratton JA, Stykel MG, Abbasi S, Sharma S, Mayr KA, Koblinger K, Whelan PJ, Biernaskie J (2018) Single-Cell Transcriptomics and Fate Mapping of Ependymal Cells Reveals an Absence of Neural Stem Cell Function. *Cell* 173:1045-1057.e9. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.063

43. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13:2498–2504. doi: 10.1101/gr.1239303

44. Spassky N (2005) Adult Ependymal Cells Are Postmitotic and Are Derived from Radial Glial Cells during Embryogenesis. *Journal of Neuroscience* 25:10–18. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1108-04.2005

45. Spassky N, Meunier A (2017) The development and functions of multiciliated epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18:423–436. doi: 10.1038/nrm.2017.21

ARTICLE

46. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP (2005) Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *PNAS* 102:15545–15550. doi: 10.1073/pnas.0506580102
47. Takagishi M, Sawada M, Ohata S, Asai N, Enomoto A, Takahashi K, Weng L, Ushida K, Ara H, Matsui S, Kaibuchi K, Sawamoto K, Takahashi M (2017) Daple Coordinates Planar Polarized Microtubule Dynamics in Ependymal Cells and Contributes to Hydrocephalus. *Cell Reports* 20:960–972. doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.089
48. Takai Y, Misu T, Suzuki H, Takahashi T, Okada H, Tanaka S, Okita K, Sasou S, Watanabe M, Namatame C, Matsumoto Y, Ono H, Kaneko K, Nishiyama S, Kuroda H, Nakashima I, Lassmann H, Fujihara K, Itoyama Y, Aoki M (2021) Staging of astrocytopathy and complement activation in neuromyelitis optica spectrum disorders. *Brain*. doi: 10.1093/brain/awab102
49. Tritschler F, Murín R, Birk B, Berger J, Rapp M, Hamprecht B, Verleysdonk S (2007) Thrombin causes the Enrichment of Rat Brain Primary Cultures with Ependymal Cells Via Protease-Activated Receptor 1. *Neurochemical Research* 32:1028–1035. doi: 10.1007/s11064-006-9267-8
50. Verkman AS, Ratelade J, Rossi A, Zhang H, Tradtrantip L (2011) Aquaporin-4: orthogonal array assembly, CNS functions, and role in neuromyelitis optica. *Acta Pharmacol Sin* 32:702–710. doi: 10.1038/aps.2011.27
51. Weibel M, Pettmann B, Artault J-C, Sensenbrenner M, Labourdette G (1986) Primary culture of rat ependymal cells in serum-free defined medium. *Developmental Brain Research* 25:199–209
52. Whish S, Dziegielewska KM, MÃ,llgÃ¥rd K, Noor NM, Liddelow SA, Habgood MD, Richardson SJ, Saunders NR (2015) The inner CSF-brain barrier: developmentally controlled access to the brain via intercellular junctions. *Frontiers in Neuroscience* 9. doi: 10.3389/fnins.2015.00016
53. Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, de Seze J, Fujihara K, Greenberg B, Jacob A, Jarius S, Lana-Peixoto M, Levy M, Simon JH, Tenenbaum S, Traboulsee AL, Waters P, Wellik KE, Weinshenker BG, International Panel for NMO

Diagnosis (2015) International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* 85:177–189. doi: 10.1212/WNL.0000000000001729

54. Young CC, van der Harg JM, Lewis NJ, Brooks KJ, Buchan AM, Szele FG (2013) Ependymal Ciliary Dysfunction and Reactive Astrocytosis in a Reorganized Subventricular Zone after Stroke. *Cerebral Cortex* 23:647–659. doi: 10.1093/cercor/bhs049

55. Zhang J, Chandrasekaran G, Li W, Kim D-Y, Jeong IY, Lee S-H, Liang T, Bae JY, Choi I, Kang H, Maeng J-S, Kim M-K, Lee T, Park SW, Kim MJ, Kim H-S, Ro H, Bae YC, Park H-C, Choi EY, Choi S-Y (2020) Wnt-PLC-IP3-Connexin-Ca²⁺ axis maintains ependymal motile cilia in zebrafish spinal cord. *Nat Commun* 11:1860. doi: 10.1038/s41467-020-15248-2

56. Zywitzka V, Misios A, Bunatyan L, Willnow TE, Rajewsky N (2018) Single-Cell Transcriptomics Characterizes Cell Types in the Subventricular Zone and Uncovers Molecular Defects Impairing Adult Neurogenesis. *Cell Rep* 25:2457-2469.e8. doi: 10.1016/j.celrep.2018.11.003

Supplementary material

Video 1 Ependymal flow assay on a non-treated explant after 24 hours culture. This 30 second video recording with z-stack overtime superposition shows the speed and the typical antero-ventral trajectory of the beads propelled by ependymal cilia beating.

Video 2 Ependymal flow assay on an explant treated during 24 hours with NMO₂-IgG. This 30 second video recording with z-stack overtime superposition shows the alteration of the speed and the trajectory of fluorescent microbeads deposited on lateral wall explants after 24 hours treatment with NMO₂-IgG.

Table 1 Primary and secondary antibodies used in immunolabeling

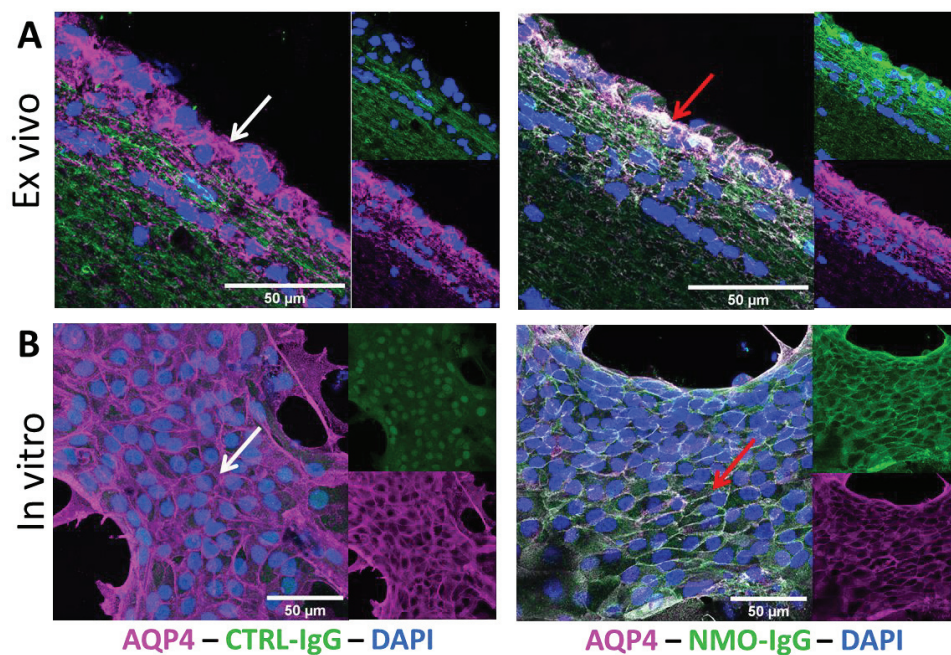
Primary antibodies				
Target	Host	Dilution	Reference	
Aquaporin 4	Rabbit	1/100	Millipore AB2218	
β-catenin	Rabbit	1/250	Sigma c2206	
β-catenin	Mouse	1/500	BD Transduction Laboratories 610153	
Connexin 43	Mouse	1/500	BD Transduction Laboratories 610062	
FoxJ1	Mouse	1/500	eBioscience (Fisher) 14-9965-82	
γ-tubulin	Mouse	1/500	Abcam ab11316	
Ki67	Rabbit	1/500	Abcam ab15580	
Secondary antibodies				
Target	Fluorochrome	Host	Reference	Dilution
Rabbit IgG	AF 488	Goat	Life Technologies A-11034	1/1000
Mouse IgG	AF 488	Goat	Life Technologies A-11029	1/1000
Rabbit IgG	AF 555	Goat	Life Technologies A-21429	1/1000
Mouse IgG	AF 555	Goat	Life Technologies A-21424	1/1000
Mouse IgG	AF 647	Goat	Life Technologies A-21236	1/1000
Human IgG	Biotin-SP conjugated	Donkey	Jackson 709-065-149	1/500
Biotin	AF 488	Streptavidin	Jackson 016-540-084	1/1000
Mouse IgG	Biotin-SP conjugated	Goat	Jackson 115-065-008	1/1000
Biotin	AF 647	Streptavidin	Jackson 016-600-084	1/1000

Table 1 Primary and secondary antibodies used for immunodetection. Here are the references and the working dilutions used for immunolabeling ependymal cells from primary cultures and rat lateral ventricle wholemounts.

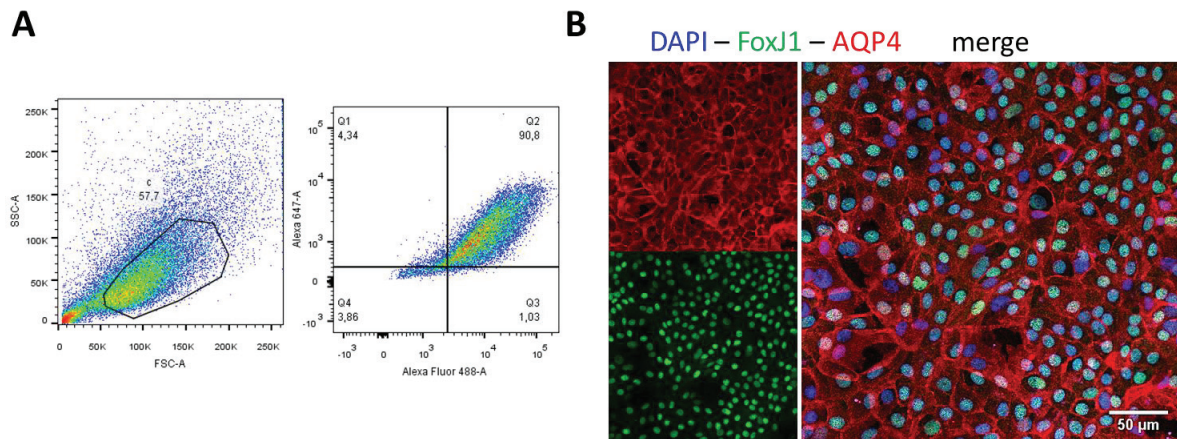
Table 2 Primers for the qRT-PCR

Gene name	Primers
TNF	5' CTC AAG CCC TGG TAT GAG CC 3', 5' CGG GCA GGT CTA CTT TGG AG 3'
IL-6	5' GTC AAC TCC ATC TGC CCT TCA 3', 5' CTT CCA GCC AGT TGC CTT CT 3'
IL-10	5' TTG AAC CAC CCG GCA TCT AC 3', 5' TAA CGG GAG CAA CTC CTT GG 3'
IL-33	5'- GTG CCC TGA GCA CAT ACA AC-3', 5' CCA TCC ACA CCG TCT CCT GA 3'
CXCL1	5' TGC ACC CAA ACC GAA GTC AT 3', 5' ACT TGG GGA CAC CCT TTA GC 3'
CXCL3	5' CAG TGC TAA GAG ACG GGA ATG 3', 5' TCC TTA GGT ATG AAA GGT CTG CT 3'
CXCL9	5' TGT GGA GTT CGA GGA ACC CT 3', 5' ACC CTT GCT GAA TCT GGG TC 3'
CXCL13	5' CCT CCA GGC CAC GGT ATT C 3', 5' TCA GTT TTG GGG CAG CCA TT 3'
CCL2	5' TGT CTC AGC CAG ATG CAG TT 3', 5' TCG GCT GAG TAA CCC TAG TA 3'
CCL6	5' CAA GCC AGG CAT CAT CTT TGT 3', 5' TCC CAG ATC TTG GGC CTA GC 3'
CCL12	5' CCG GGA AGC TGT GAT CTT CA 3', 5' CTA TCG CAC TGT CCA TGG GG 3'
CCL19	5' GTC TTC CTC CAA GAG CAA AGG 3', 5' CAC TCA CGT TCA CAC CGA CT 3'

Table 2 List of primers used for qRT-PCR. Here are the primers used for the quantification of cytokine and chemokine transcripts identified in the RNAseq experiment.

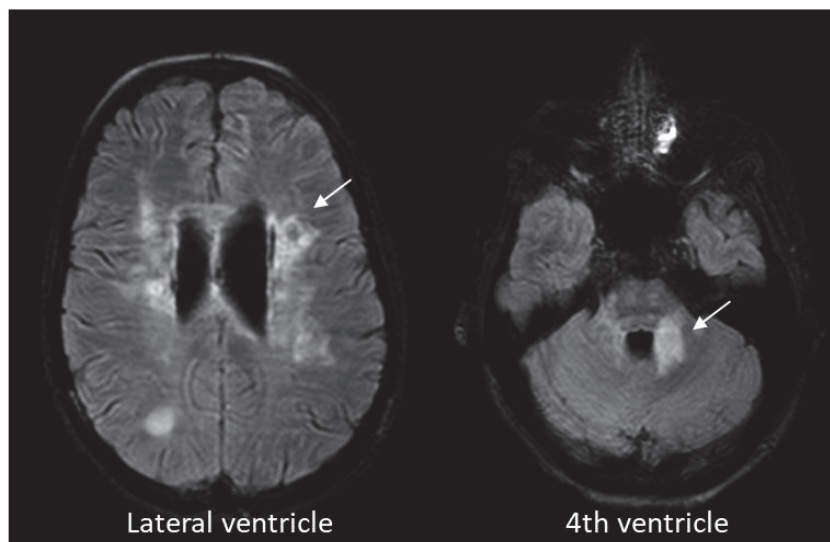


Supplementary figure 1 Purified IgG from NMO patients bind to endepymal AQP4 ex vivo and in vitro. Confocal images showing no colocalization of CTRL-IgG (green) with AQP4 (magenta) (white arrows), and colocalization of NMO-IgG (green) with AQP4 (magenta) (red arrows) on (A) healthy rat lateral ventricles (x63) and (B) endepymal cultures (x40) post fixation.



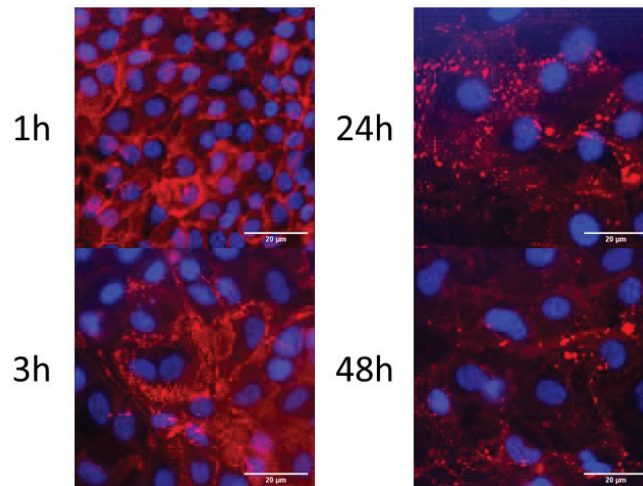
Supplementary figure 2 Proportion of FoxJ1⁺ cells in primary ependymal cell cultures. (A) Ependymal cells co-stained for FoxJ1 and AQP4 were cell sorted by flow cytometry after no treatment ($n = 1$). (B) Epifluorescence images of primary culture of ependymal cells labeled for FoxJ1 (green), AQP4 (red) and DAPI (blue).

MRI Patient n°2

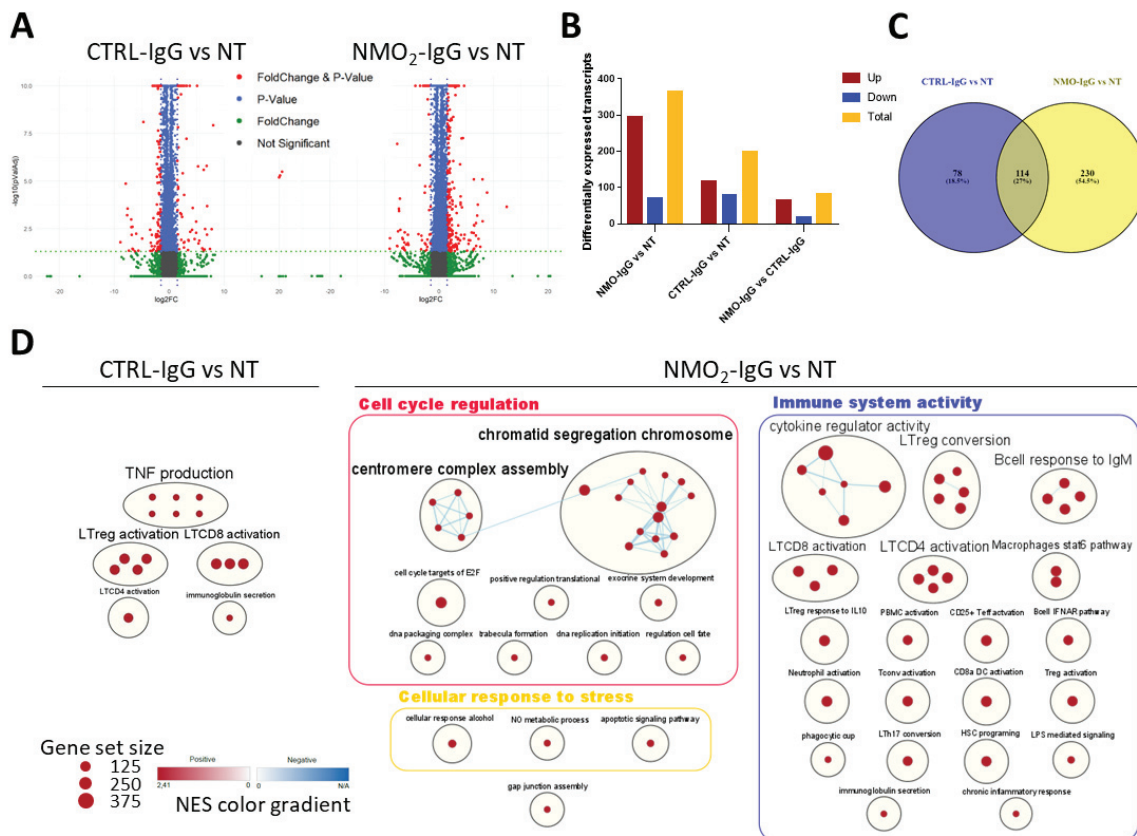


Supplementary Figure 3 Periventricular inflammation visible on MRI from patient n°2. Brain MRI gadolinium-enhanced axial T1-weighted fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) images were realized prior to plasma exchange and revealed periventricular lesions around the lateral ventricles and the 4th ventricle (white arrow).

AQP4 – DAPI - NMO₂-IgG

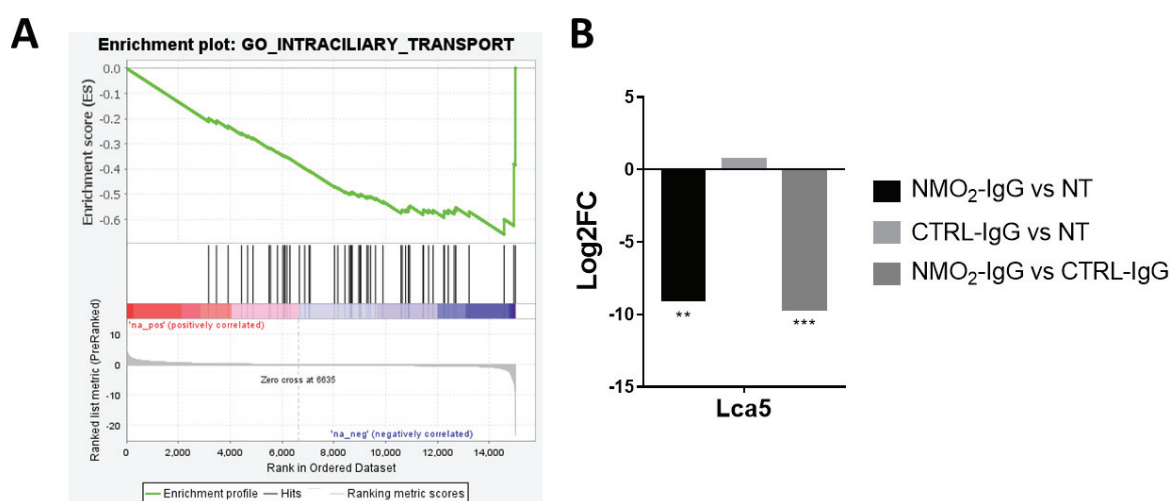


Supplementary figure 4 Kinetic of NMO-IgG induced AQP4 agglomeration. Primary cultures were treated during 1, 3, 24 and 48 hours with NMO₂-IgG and stained for AQP4 (red) and DAPI (blue).



Supplementary figure 5 NMO-IgG changed the transcriptomic profile of ependymal cells. (A) Transcriptomic differential analysis between CTRL-IgG vs NT and NMO₂-IgG vs NT

ependymal cells from primary cultures represented as volcano-plots ($n = 3$ cultures). Red dots represent transcripts that are significantly upregulated (right) or downregulated (left) (statistical criteria: $|\log_2FC| \geq 1.5$ and Wald's test adjusted $P_{adj} \leq 0.05$). **(B)** Histogram showing the number of transcripts differentially expressed in CTRL-IgG vs NT and NMO₂-IgG vs NT conditions. **(C)** Venn diagram showing the number of genes shared by the differential expression of CTRL-IgG vs NT and NMO₂-IgG vs NT conditions. **(D)** Enrichment map of the GSEA of CTRL-IgG vs NT and NMO₂-IgG vs NT. Cut-offs applied: gene set size between 500 and 15 genes and FDR q -value < 0.05 . Dot size: gene set size. Dot color: normalized enrichment score (NES). Blue edge size: number of common genes. Nodes with high similarity were clustered using the AutoAnnotate app of Cytoscape.



Supplementary figure 6 NMO-IgG downregulated intraciliary transport. **(A)** Enrichment plot of the gene set GO_Intraciliary_Transport downregulated in NMO₂-IgG vs NT (Normalized Enrichment Score (NES) = -1.78, $P = 0.002$, FDR q -value = 0.631). **(B)** Histogram of the Log₂FC for the LCA5 transcript from the RNAseq data in NT vs NMO₂-IgG ($P_{adj} < 0.01$), NT vs CTRL-IgG (non-significant) and NMO₂-IgG vs CTRL-IgG ($P_{adj} < 0.001$) comparisons.

Supplementary materiel and methods

Binding of purified IgG from NMO patients on AQP4 expressed by ependymal cells

To test the ability of purified IgG from NMO patients to bind AQP4, fixed ependymal cells from primary cultures or from brain slices of adult Sprague Dawley rat brain were incubated with NMO-IgG or CTRL-IgG during 24 hours at 4°C. After washing steps (see the immunolabeling part in the main document and table 1 for more details), samples were incubated with commercial anti-AQP4 during 1h at 37°C. After washing steps, samples were incubated with anti-rabbit AF555 secondary antibody and with donkey biotin SP-conjugated anti-human IgG for one hour at room temperature. After washing steps, samples were incubated with streptavidin AF488 during three hours at room temperature. After washing steps and nuclei staining with DAPI, slides were mounted and analyzed with an epifluorescent microscope.

Flow cytometry

Ependymal cells from primary cultures were detached with accutase and cell viability was determined using trypan blue (more than 90% of cells were viable). Cells were centrifugated five minutes at 1400 rpm and suspended in PBS with 8% normal goat serum for saturation during 20 minutes at 4°C. Cells were fixed with PFA 1% during 15 minutes at room temperature. Then, cells were permeabilized with a PBS saponin solution at 0.5% during 20 minutes at room temperature. After permeabilization, cells were incubated with rabbit anti-AQP4 and mouse anti-FoxJ1 primary antibodies (Table 1) diluted in PBS saponin 0.05% during 20 minutes at 4°C. After two washes with PBS saponin 0.05%, cells were incubated with biotin conjugated goat anti-mouse and goat anti-rabbit AF488 for 20 minutes at 4°C. After two washes with PBS saponin 0.05%, cells were incubated with streptavidin conjugated AF647 during 20 minutes at 4°C. After centrifugation and resuspension, the percentage of ependymal cells defined as double positive from AQP4 and FoxJ1 was measured by flow cytometry with a FACS Canto II (Beckton-Dickinson, San Diego, CA, USA) equipped with 3 lasers (488, 633, 405 nm) using the BD FACS-Diva™ software and FlowJo software (version 10 by Flowjo LLC, OR, USA).

ANALYSES
COMPLÉMENTAIRES ET
RESULTATS PRÉLIMINAIRES

1. Compléments à l'analyse transcriptomique

Dans l'analyse GSEA, nous avons inclus des listes de gene sets liés au système immunitaire et avons montré une forte uprégulation de ces gene sets après traitement avec NMO₂-IgG. Cependant, nous sommes peut-être passés à côté d'autres dérégulations dues à la sur-représentation des gene sets du système immunitaire. J'ai donc relancé une analyse GSEA en n'utilisant que des gene sets issus de Gene Ontology. Parmi les 200 gene sets les plus uprégulés ou downrégulés, cinq gene sets en lien avec le transport et les concentrations d'ions potassium, calcium et du fer ont été downrégulés après traitement avec NMO₂-IgG (**Figure 25**). Ces données suggèrent donc qu'il y a un déséquilibre ionique et une accumulation d'ions métalliques dans les cellules épendymaires ou à proximité induits par les IgG-NMO.

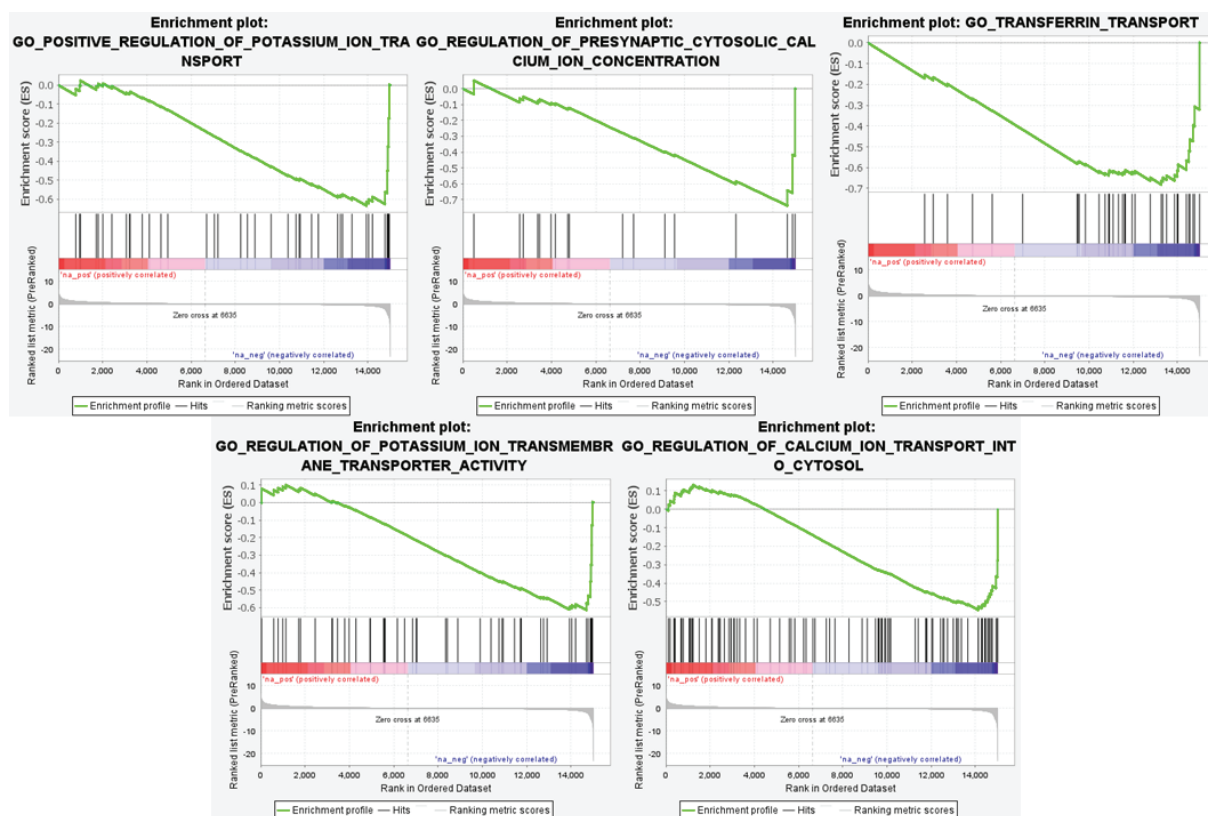


Figure 25. Downrégulation de gene sets liés au transport et à l'équilibre ionique. Après traitement avec NMO₂-IgG et en comparaison avec les cellules non traitées, deux gene sets liés aux échanges d'ions potassiques, deux gene sets liés aux échanges d'ions calciques et au transport de la transferrine ont été downrégulés parmi les 200 gene sets les plus uprégulés ou downrégulés dans une analyse GSEA qui a interrogé la liste de gene sets de GeneOntology.

2. Quantification des sous-populations de cellules souches de la V-SVZ en réponse aux IgG-NMO *ex vivo*

Dans l'article, nous montrons que les IgG-NMO induisent une activation de la prolifération des cellules sous les ventricules avec le marqueur Ki67, une augmentation du nombre de précurseurs neuraux monociliés avec la γ -tubuline et une densification du réseau de neuroblastes sous l'épendyme avec le marquage doublecortin (DCX). Afin de confirmer et préciser ces résultats, des co-marquages immunohistochimiques des précurseurs d'oligodendrocytes (OPC) avec Olig2 et des neuroblastes avec la doublecortin (DCX) ont été couplés avec Ki67 (un marquage à la β -catenin qui n'est pas montré sur les images est ajouté pour repérer la couche épendymaire et cibler la zone sous épendymaire). Une analyse par cytométrie en flux a également été reprise à partir de la littérature et adaptée au laboratoire pour quantifier huit sous-types cellulaires différents en même temps : OPC, aNSC, pNSC, qNSC, NPC1, NPC2, NB1 et NB2 (Belenguer et al., 2021a).

Comme la NMO est une pathologie démyélinisante, nous nous sommes intéressés aux effets des IgG-NMO sur la prolifération et la survie des OPC présents dans la zone sous-ventriculaire car ils sont importants pour la remyélinisation des zones lésées. Après 24 heures de traitement avec les IgG-CTRL ou les IgG-NMO, les explants ont été fixés et marqués pour Ki67 et Olig2 et le nombre de cellules ont été quantifiés dans la zone sous épendymaires (jusqu'à environ 10 μ m sous la souche épendymaire au microscope confocal). On retrouve une augmentation du nombre de cellules Ki67⁺ accompagnée d'une augmentation du nombre de cellules Olig2⁺ et doubles positives Ki67⁺ et Olig2⁺ non significatives dans la condition NMO₂-IgG par rapport aux conditions NT et CTRL-IgG (**Figure 26**). A titre indicatif, pour que le test devienne positif avec un taux d'erreur à 0,5% et une puissance à 0,8, il faudrait un n = 19 pour Ki67, un n = 39 pour Olig2 et un n = 17 pour Ki67 et Olig2 par condition. On peut supposer que les IgG-NMO ont induit une légère activation de la prolifération des OPC sous-épendymaires.

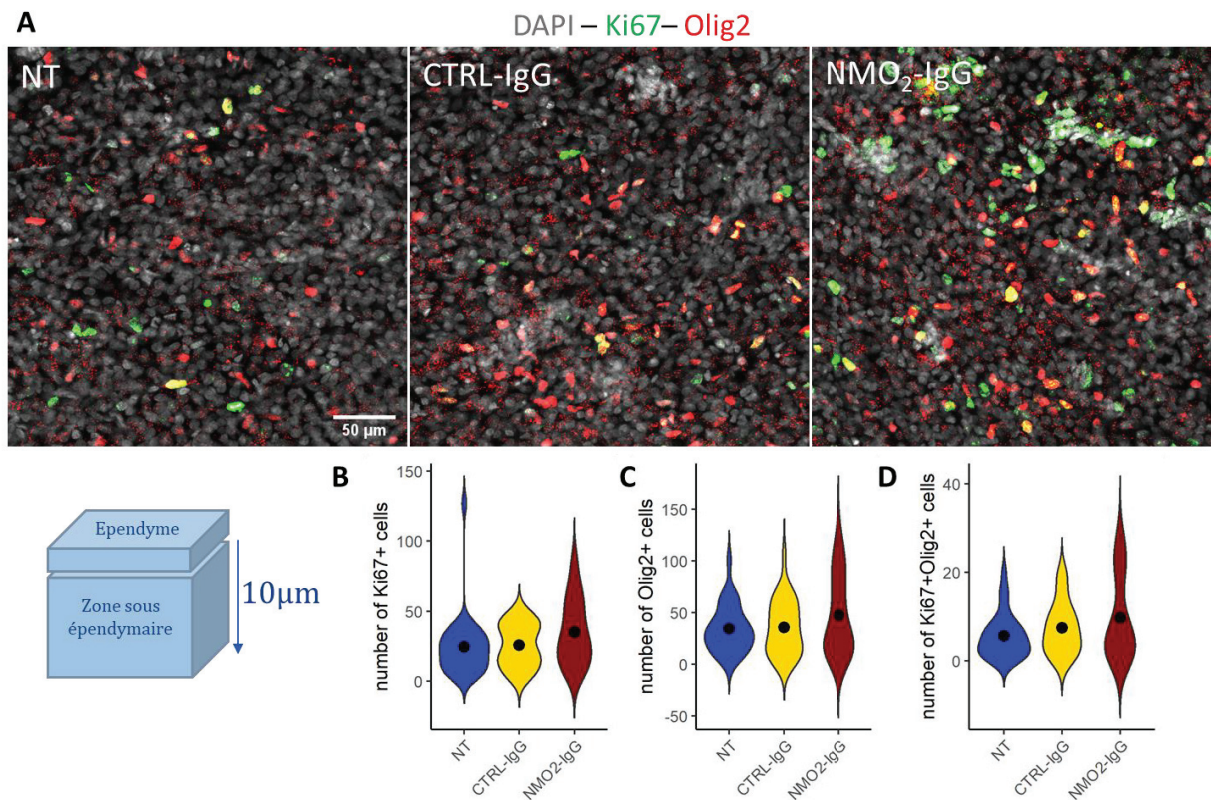


Figure 26. Effets des IgG-NMO sur la prolifération des OPCs. A) Images z-stack de confocal dans la zone sous-épendymaire d'explants marqués pour DAPI (gris), Ki67 (vert) et Olig2 (rouge) sans traitement ou après traitement avec CTRL-IgG ou NMO₂-IgG (objectif 20x). Violin plots du nombre de cellule Ki67⁺ (B), du nombre de cellules Olig2⁺ (C) et du nombre de cellules doubles positives pour Ki67 et Olig2 (D) dans la zone sous épendymaire. NT : n=6 ; CTRL-IgG : n=5 ; NMO₂-IgG : n=6. Cinq images/explant. Kruskal Wallis + test post-hoc de Dunn : non significatif (point noir = moyenne).

Nous avons précédemment montré une densification du réseau de neuroblastes marqués pour la doublecortin (DCX) après traitement des explants avec NMO₂-IgG (Bigotte et al. under review). Afin de savoir si l'augmentation de prolifération cellulaire correspond aux neuroblastes, nous avons double marqué des explants après 24 heures de traitement avec Ki67 et DCX et avons ciblé les couloirs de neuroblastes au confocal. En ciblant sur les couloirs de neuroblastes DCX⁺, on ne retrouve plus l'augmentation du nombre de cellules Ki67⁺ après traitement avec NMO₂-IgG (**Figure 27**). Il n'y a également pas d'augmentation du nombre de cellules DCX⁺ et de cellules doubles positives Ki67⁺DCX⁺ (**Figure 27**). On peut donc en conclure que la prolifération cellulaire sous-épendymaire observée après traitement avec les IgG-NMO ne correspond probablement pas aux neuroblastes situés dans les couloirs de migration.

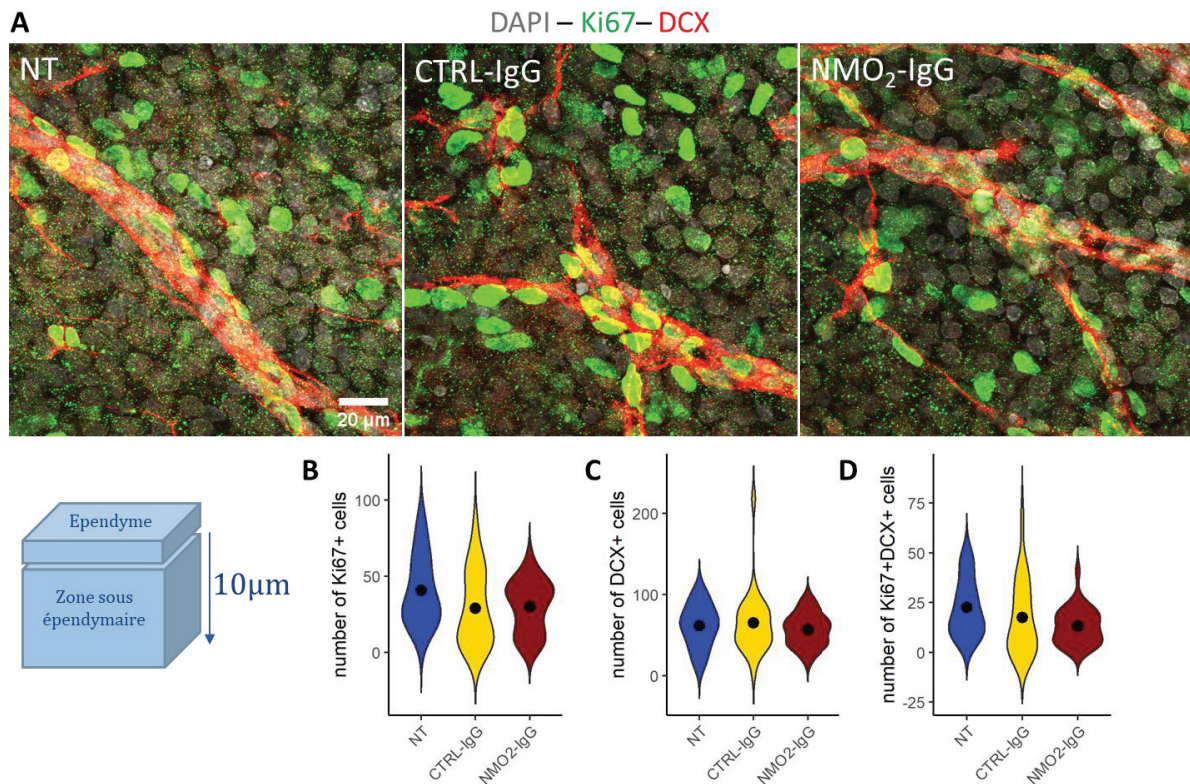
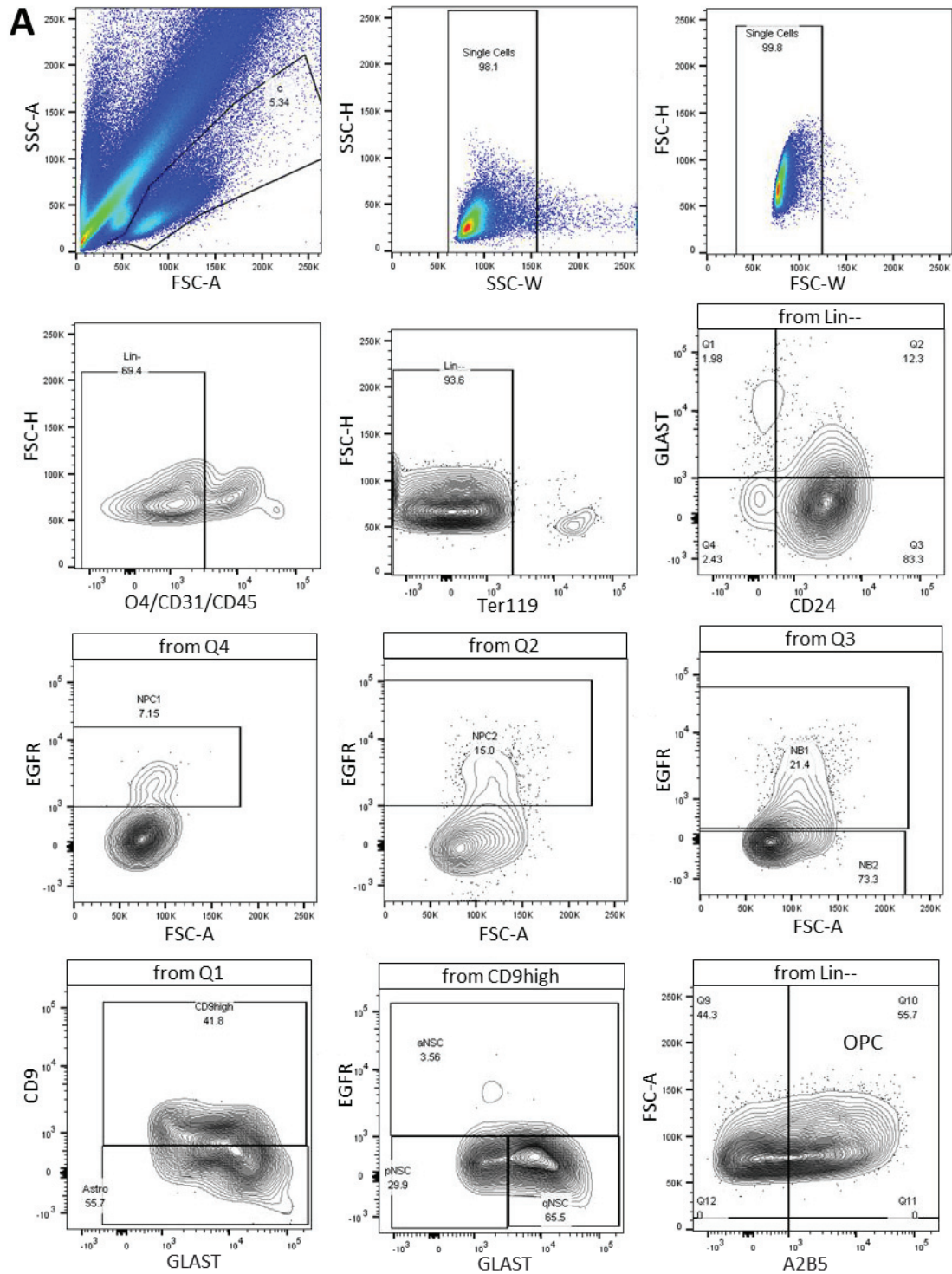


Figure 27. Effets des IgG-NMO sur la prolifération cellulaire dans les couloirs de neuroblastes. A) Images z-stack de confocal dans la zone sous-épendymaire d'explants marqués pour DAPI (gris), Ki67 (vert) et DCX (rouge) sans traitement ou après traitement avec CTRL-IgG ou NMO₂-IgG (objectif 40x). Violin plots du nombre de cellule Ki67⁺ (B), du nombre de cellules DCX⁺ (C) et du nombre de cellules doubles positives pour Ki67 et DCX (D) dans la zone sous épendymaire. NT : n=6 ; CTRL-IgG : n=5 ; NMO₂-IgG : n=6. Cinq images/explant. Kruskal Wallis + test post-hoc de Dunn : non significatif (point noir = moyenne).

Afin de quantifier les différentes populations de cellules souches de la SVZ en réponse au traitement avec les IgG-NMO, nous avons utilisé une technique de cytométrie en flux inspirée de (Belenguer et al., 2021a). Celle-ci permet l'identification de sept populations distinctes : qNSC, pNSC, aNSC, NPC1, NPC2, NB1 et NB2, auxquelles nous avons ajouté les OPC, et nous avons comparé les proportions de chaque population cellulaire que nous avons obtenu avec notre méthode avec celles obtenues par G. Belenguer et ses collègues (**Figure 28**). La proportion d'astrocytes neurogéniques GLAST⁺CD24⁻ est très faible par rapport aux résultats de G. Belenguer et ses collègues, ce qui a pour effet de gonfler le nombre de neuroblastes en contrepartie. Ce résultat est étonnant car nous observons une grande quantité d'astrocytes

ANALYSES COMPLÉMENTAIRES ET RESULTATS PRÉLIMINAIRES

neurogéniques (les astrocytes B1 monociliés) sur nos marquages immunohistochimiques avec la γ -tubuline (Bigotte et al. under review).



B

	Belenguer 2021	test 16/09
astrocyte	2%-3%	1,31%
qNSC	4,5%-9%	0,64%
pNSC	1,8%-2,2%	0,29%
aNSC	3%-4%	0,03%
NPC1	2%-3%	2,06%
NPC2	2%-4%	2,19%
NB1	10%-12%	21,12%
NB2	40%-50%	72,35%
OPC		55,7%

Figure 28. Identification des différentes sous-populations de cellules souches sous-ventriculaires par cytométrie en flux. A) Graphes de cytométrie montrant la méthode d'identification des différentes populations cellulaires et le plaçage des *gates*. Les cellules O4, CD31, CD45, Ter119 (Lin --) négatives sont isolées. A partir des cellules Lin--, quatre populations sont séparées par les marqueurs GLAST et CD24 : Q1 = GLAST⁺CD24⁻ ; Q2 = GLAST⁺CD24⁺ ; Q3 = GLAST⁻CD24⁻ ; Q4 = GLAST⁻CD24⁺. Les NPC1 sont les cellules EGFR⁺ parmi Q4 et les NPC2 sont les cellules EGFR⁺ parmi Q2. Parmi Q3, les NB1 sont les cellules EGFR⁺ et NB2 les cellules EGFR⁻. Parmi Q1, les astrocytes neurogéniques sont CD9⁺ et parmi les ceux-ci les aNSC sont EGFR⁺, les pNSC sont EGFR⁻GLAST^{low} et les qNSC^{EGFR-}GLAST^{high}. Nous avons défini les OPC comme étant les cellules A2B5⁺ parmi les cellules Lin- - la première fois. B) Table de comparaison des proportions des différentes populations cellulaires obtenues au laboratoire par rapport à celles publiées par (Belenguer et al., 2021a).

Malgré cette limite, nous avons quand même testé cette méthode pour quantifier les progéniteurs neurax sous-épendymaires après traitement pendant 24 heures avec les IgG-CTRL et les NMO₂-IgG en comparaison avec des explants non traités (n = 2/condition). Le nombre d'échantillon était trop petit pour faire de tests statistiques mais ces résultats permettent quand même de mettre en évidence certaines tendances. Nous avons observé peu d'effets sur les NPC1 et 2 mais il semblerait que les NMO₂-IgG ont entraîné une baisse du nombre de NB1 et une augmentation du nombre de NB2, ainsi qu'une baisse du nombre de cellules A2B5⁺ (**Figure 29**). Malheureusement, le nombre d'astrocytes neurogéniques était tellement faible que l'interprétation des résultats est impossible. Leur nombre était même de 0 pour certains explants indiquant que le marquage GLAST n'a pas fonctionné après la mise en culture. Après cela, nous avons tenté de récupérer les cellules GLAST⁺ en diluant la concentration en trypsine 10 fois car l'expression membranaire de GLAST est sensible aux enzymes de digestion mais sans succès (données non présentées) (Belenguer et al., 2021a).

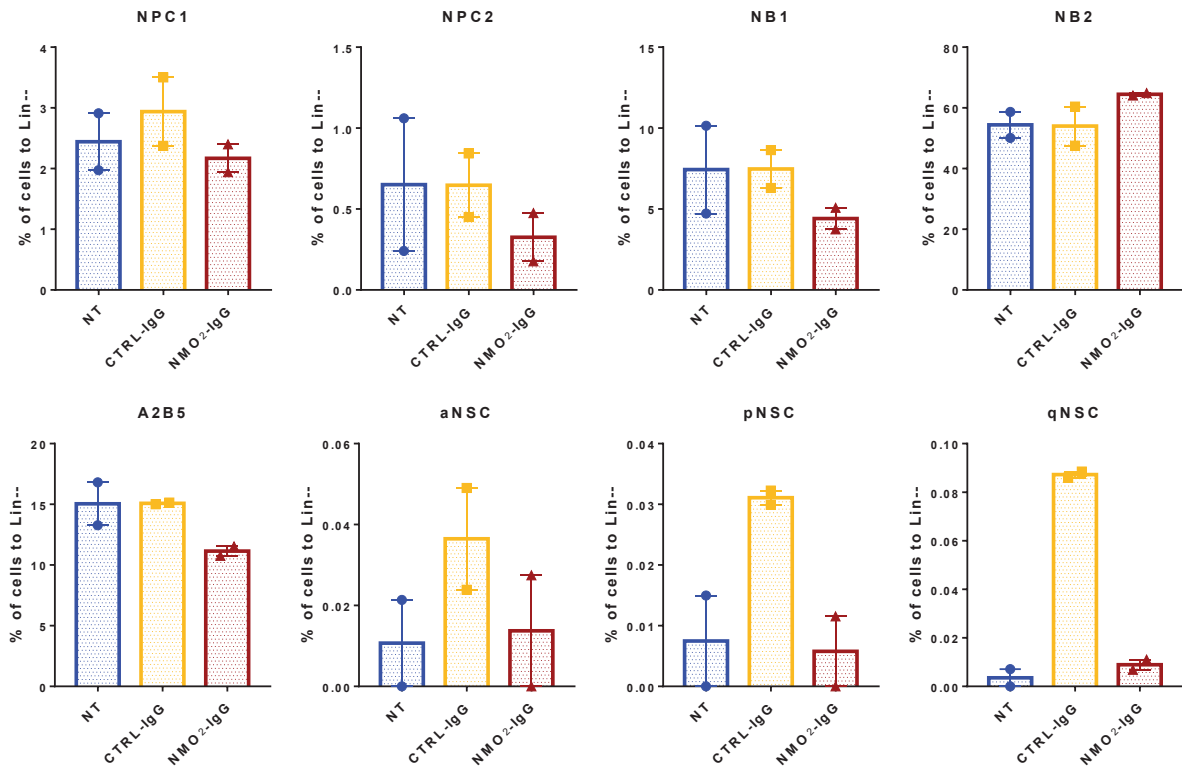


Figure 29. Proportions des progéniteurs sous-épendymaires après traitement avec les IgG-NMO. Histogrammes du pourcentage de chaque population cellulaire par rapport au nombre de cellules Lin⁻. Deux explants par condition. Aucun test statistique réalisé.

Pour résumer tous nos résultats sur l'analyse des cellules souches sous-ventriculaires après traitement avec les IgG-NMO, nous montrons une prolifération sous-ventriculaire avec le marqueur Ki67 et une prolifération des astrocytes neurogéniques monociliés avec le marquage de la γ -tubulin. Les études complémentaires d'IHC suggèrent une légère prolifération des OPC mais une diminution en cytométrie. Les résultats sur les neuroblastes montrent une densification du réseau de DCX mais aucune prolifération dans celui-ci alors que l'analyse par cytométrie montre une prolifération des neuroblastes migratoires NB2 et une diminution des neuroblastes prolifératifs NB1.

3. Effets des IgG-NMO à long terme *in vivo*

Afin d'étudier les effets à long terme d'une exposition chronique aux IgG-NMO sur l'épendyme, nous avons utilisé un modèle animal déjà bien caractérisé et utilisé au laboratoire (Cobo-Calvo et al., 2020; Marignier et al., 2016). Les IgG-NMO sont administrées continuellement dans le système ventriculaire du rat grâce à l'implantation d'une canule dans le ventricule latéral droit reliée à une micro-pompe osmotique contenant les anticorps. En utilisant des techniques d'immunohistochimies et d'analyse du séquençage ARN, j'avais pour objectif pendant ma thèse de caractériser les atteintes épendymaires dans ce modèle. Nous avons utilisé 21 animaux (sept rats NaCl, six rats CTRL et huit rats NMO) qui ont été sacrifiés après sept jours d'infusion. L'objectif étant de faire quelques premières analyses avant de passer sur des analyses plus précises avec les wholemouts. Ceci a également permis d'analyser d'autres structures comme le 3^{ème} et 4^{ème} ventricule.

a. Analyse immunohistochimique

i. Expression de l'AQP4 et de la GFAP

D'abord, nous avons étudié l'effet des IgG-NMO sur l'expression de l'AQP4 au niveau du ventricule latéral, du 3^{ème} et du 4^{ème} ventricule. Nous avons combiné ce marquage avec la GFAP qui est un marqueur de réactivité gliale épendymaire (Pourabdolhossein et al., 2017; Young et al., 2013). Au niveau des ventricules latéraux, nous n'avons ni observé de changements majeurs de la morphologie cellulaire et tissulaire ni observé de modification de l'expression de l'AQP4 et de la GFAP chez les rats NMO en comparaison avec les rats contrôles (**Figure 30A**). Nous n'avons pas observé non plus de dénudation de l'épendyme comme il a pu être observé chez l'homme (Guo et al., 2017). En revanche, l'intensité du marquage AQP4 était légèrement plus faible chez les rats NMO en comparaison avec les rats CTRL uniquement dans le ventricule latéral droit (ipsilatéral à la canule) (**Figure 30B-C**). Mais comme il n'y a pas de différence par rapport aux rats NaCl et que l'intensité semble légèrement augmentée chez les rats CTRL, cet effet semble incertain. Au niveau sous-épendymaire, aucune baisse notable d'expression d'AQP4 autour des vaisseaux et aucune modification de l'expression de GFAP n'ont été observées (**Figure 30A**). Pour conclure, les rats-NMO n'ont pas présenté de modifications morphologiques claires ni de modifications majeures de l'expression de l'AQP4 et la GFAP aussi bien au niveau épendymaire que sous-ventriculaire.

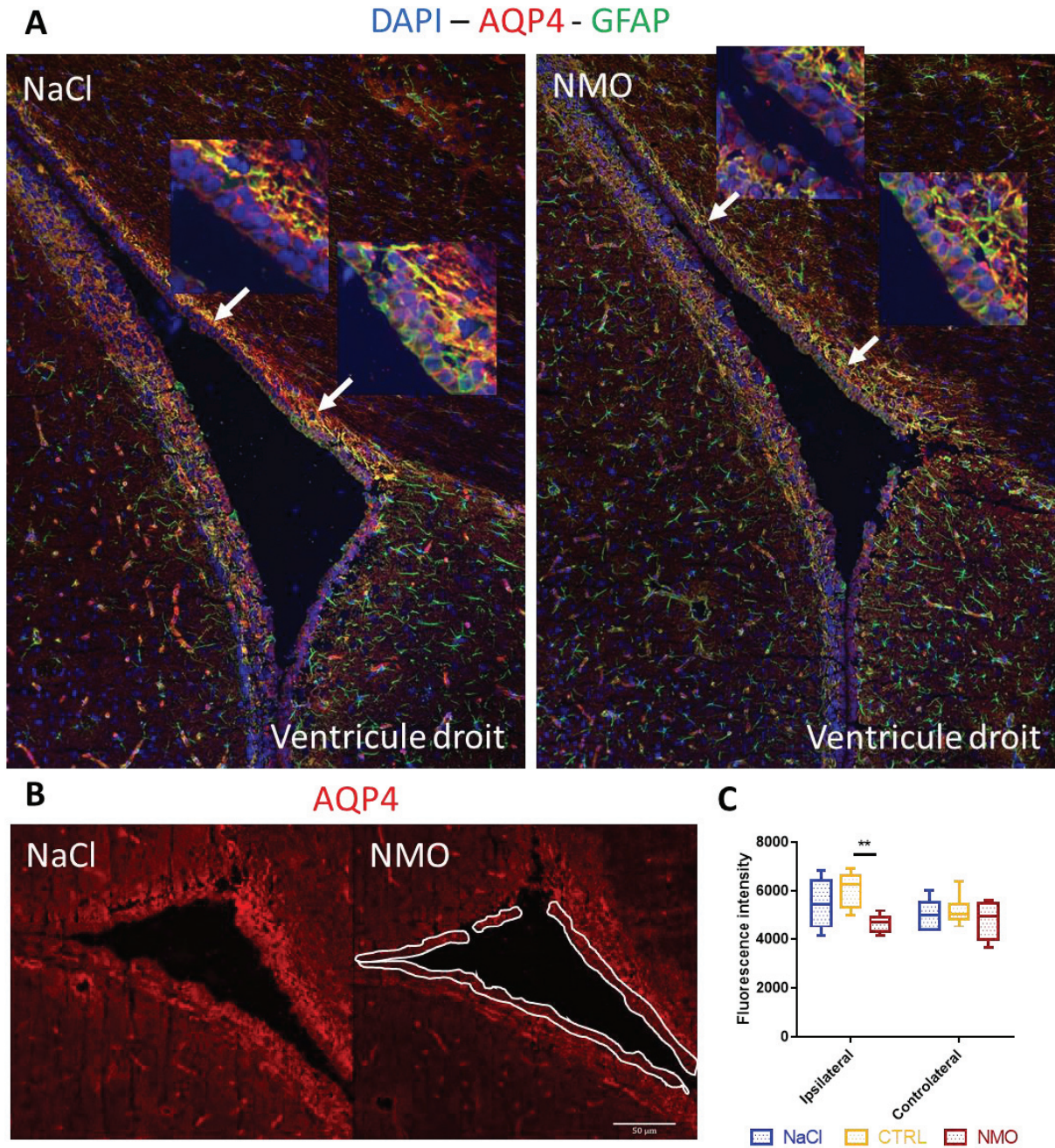


Figure 30. Expression de l'AQP4 et de la GFAP des ventricules latéraux chez le rat-NMO.
 A) Images de microscopie à fluorescence de coupes de ventricules latéraux droits des rats NaCl et NMO marqués pour l'AQP4 (rouge), la GFAP (vert) et le DAPI (bleu). Certaines portions d'épendyme sont GFAP positives (encadrés). B) Analyse de l'intensité du marquage AQP4 (rouge) des cellules épendymaires des ventricules latéraux des rats NaCl et NMO. C) Box plot des mesures d'intensité de l'AQP4 épendymaire (NaCl : n = 7 ; CTRL : n = 6 ; NMO : n = 5 ; une image analysée par condition). Two-way ANOVA + test post-hoc de Tukey : ** p < 0,01.

ANALYSES COMPLÉMENTAIRES ET RESULTATS PRÉLIMINAIRES

Les rats-NMO n'ont pas présenté de baisse d'expression d'AQP4 ou de changements d'expression de la GFAP, ni dans le 3^{ème} ventricule, ni dans le 4^{ème} ventricule (**Figure 31**).

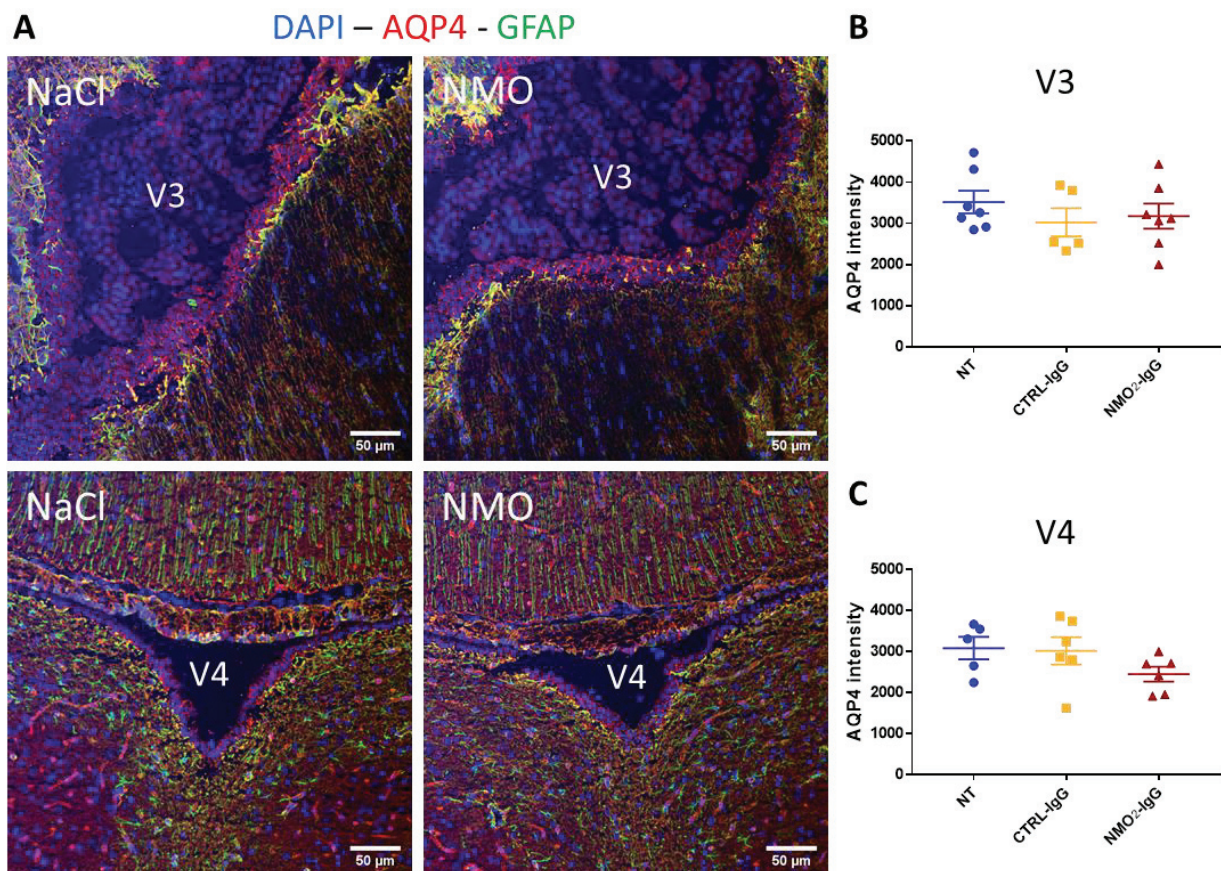


Figure 31. Expression de l'AQP4 et de la GFAP des 3^{ème} et 4^{ème} ventricules chez le rat-NMO. A) Images de microscopie à fluorescence de coupes centrées sur les planchers des 3^{ème} et 4^{ème} ventricules des rats NaCl et NMO marqués pour l'AQP4 (rouge), la GFAP (vert) et le DAPI (bleu). B) et C) Box plot des mesures d'intensité de l'AQP4 épendymaire des 3^{ème} et 4^{ème} ventricules (B) : NaCl : n = 7 ; CTRL : n = 5 ; NMO : n = 7 ; une image analysée par condition ; C) : NaCl : n = 5 ; CTRL : n = 6 ; NMO : n = 5). Two-way ANOVA + test post-hoc de Tukey : non significatif.

ii. Expression de la Cx43 et de ZO1

Nous avons poursuivi par l'analyse de l'expression d'autres protéines importantes pour les fonctions épendymaires comme la jonction communicante Cx43 ou la jonction serrée zonula occludens 1 (ZO1). Comme sur les cultures primaires, la Cx43 est exprimée sous forme d'agrégats chez le rat (**Figure 32A**). Nous avons observé une tendance vers une diminution du nombre d'agrégats et une augmentation de leur taille chez les rats-NMO (**Figure 32B-C**). L'épendyme présente une faible expression de jonctions serrées en conditions physiologiques (Whish et al., 2015). Mais il peut augmenter l'expression de jonctions serrées en conditions

inflammatoires (Pourabdolhossein et al., 2017). Ici, nous n'avons pas observé de différence d'expression de la protéine ZO1 entre les rats contrôles et NMO suggérant que la barrière LCS-parenchyme n'est pas modifiée (**Figure 32A**).

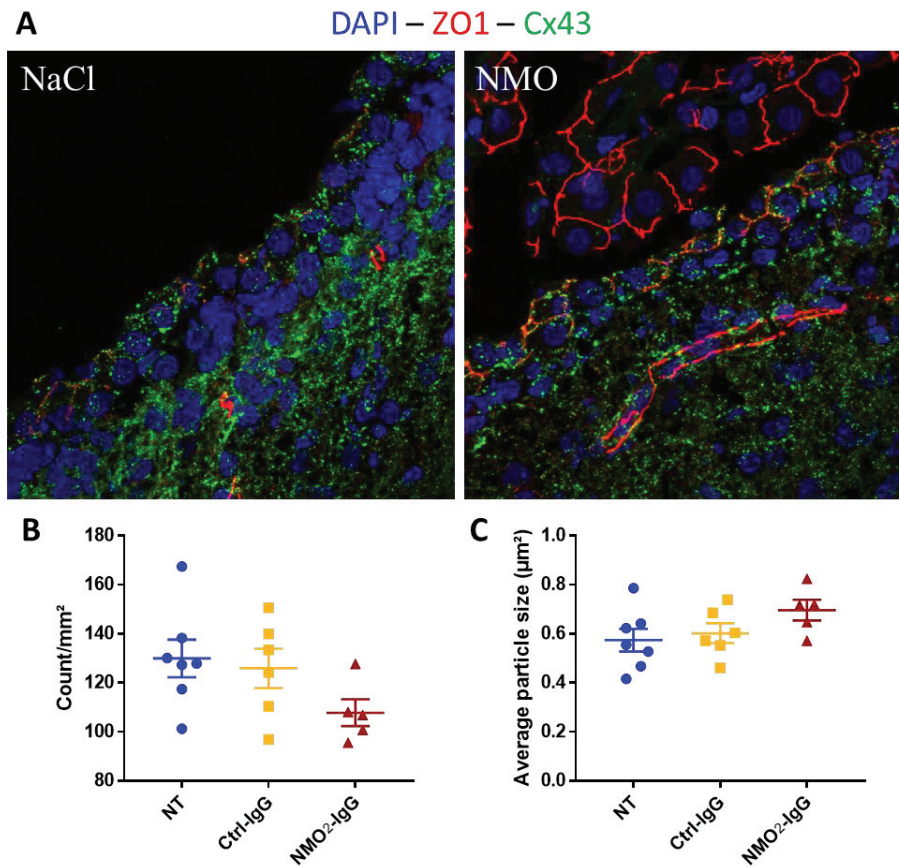


Figure 32. Expression des jonctions communicantes et serrées chez le rat NMO. A) Images de confocal de coupes de rats NaCl et NMO marqués pour la Cx43 (vert), ZO1 (rouge) et DAPI (bleu) au niveau du ventricule latéral droit. B) Scatter plot de la mesure moyenne du nombre de particule de Cx43 par image et C) scatter plot de la taille moyenne des particules de Cx43 par image (NaCl : n = 7 ; CTRL : n = 6 ; NMO : n = 5 ; cinq champs par condition). ZO1 = zonula occludens 1.

iii. Analyse des cellules souches sous-épendymaires

Ensuite, nous avons quantifié la prolifération des cellules souches sous-épendymaires via le marqueur Ki67 et avons quantifié le nombre de précurseurs d'oligodendrocytes (OPC) sous épendymaires avec le marqueur Olig2 au niveau du ventricule latéral droit des rats-NMO. Cette quantification a eu lieu dans 3 zones différentes : la pointe dorsolatérale, le mur dorsal et le mur latéral du ventricule latéral (**Figure 33**). Les quantités de cellules Ki67⁺ et Olig2⁺ ne sont significativement pas augmentées chez les rats NMO par rapport aux rats contrôles (**Figure**

ANALYSES COMPLÉMENTAIRES ET RESULTATS PRÉLIMINAIRES

33A-G), mais il y avait une légère augmentation du nombre de cellules Olig2⁺ dans le mur dorsal (**Figure 33E**). Les cellules doublement positives n'ont pas été représentées car trop peu nombreuses.

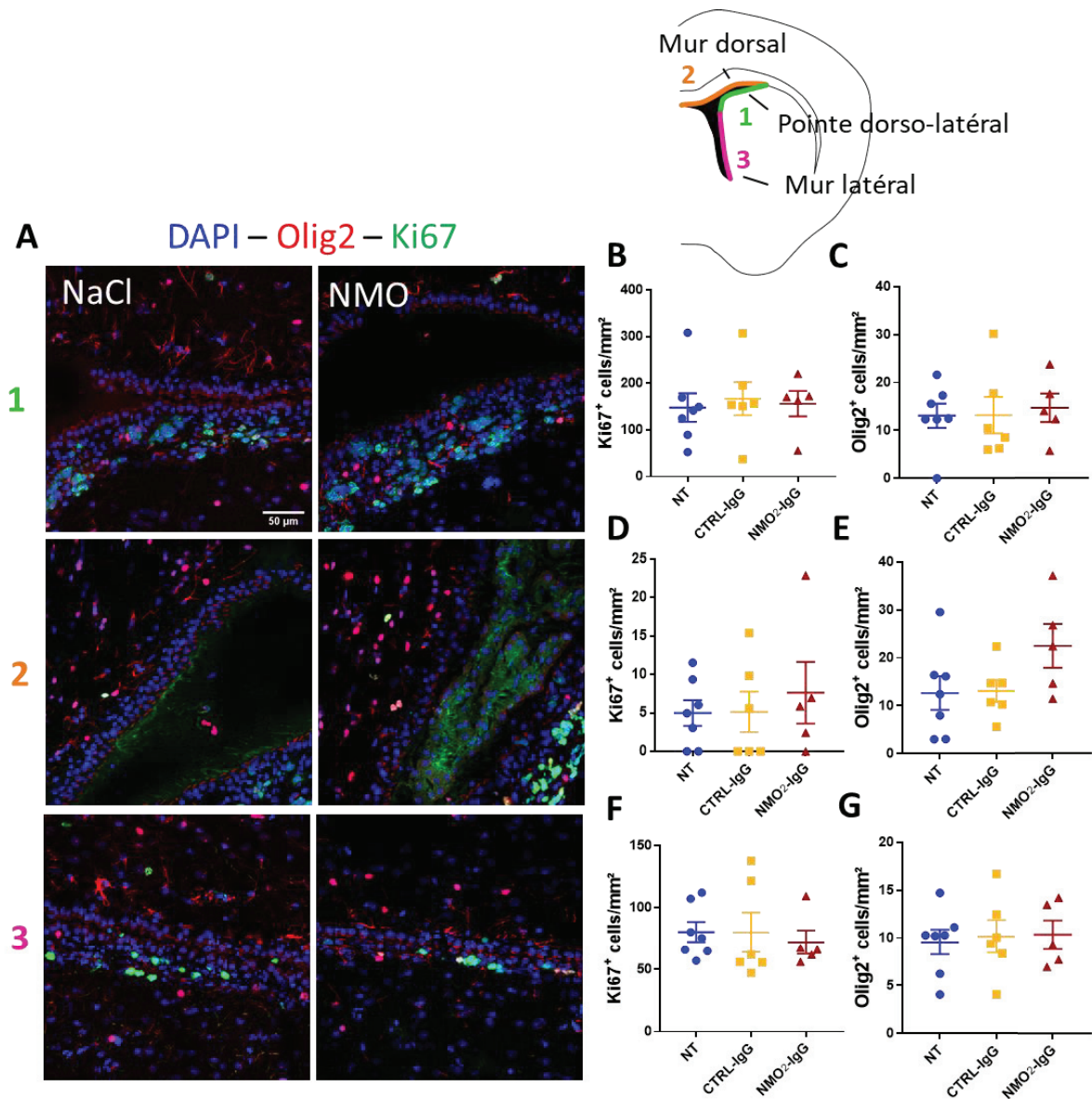


Figure 33. Analyse de la prolifération des cellules sous-épendymaires et des OPCs. A) Images de microscopie de coupes de ventricules latéraux des rats NaCl et NMO après marquage de Ki67 (vert), Olig2 (rouge) et DAPI (bleu). Trois zones sont distinguées : la pointe dorsolatérale (1 vert), le mur dorsal (2 orange) et le mur latéral (3 fuchsia). B-G) Scatter plots du nombre moyen de cellules Ki67⁺ (B, D et F) ou Olig2⁺ (C, E et G) par image pour les rats NaCl, CTRL et NMO. (NaCl : n = 7 ; CTRL : n = 6 ; NMO : n = 5 ; deux images par rat analysées pour la zone 1, et trois images par rat analysées pour les zones 2 et 3).

b. Analyse transcriptomique par séquençage ARN

Afin de mettre en évidence des changements au niveau transcriptomique des cellules épendymaires des rats-NMO, nous avons réalisé un séquençage ARN (RNAseq). Trois animaux par groupes ont été inclus et pour chaque animal, l'épendyme de trois coupes a été isolé par capture laser. Après extraction de l'ARN et le séquençage, l'analyse de la variabilité par analyse en composantes principales (ACP) a révélé qu'il y avait une plus grande variabilité inter-individuelle qu'inter-groupes car les groupes ne se regroupent pas par condition, limitant ainsi l'interprétation des résultats des analyses différentielles et fonctionnelles (**Figure 34A**). Nous avons donc arrêté l'analyse ici en concluant que le nombre d'animaux par condition était trop faible.

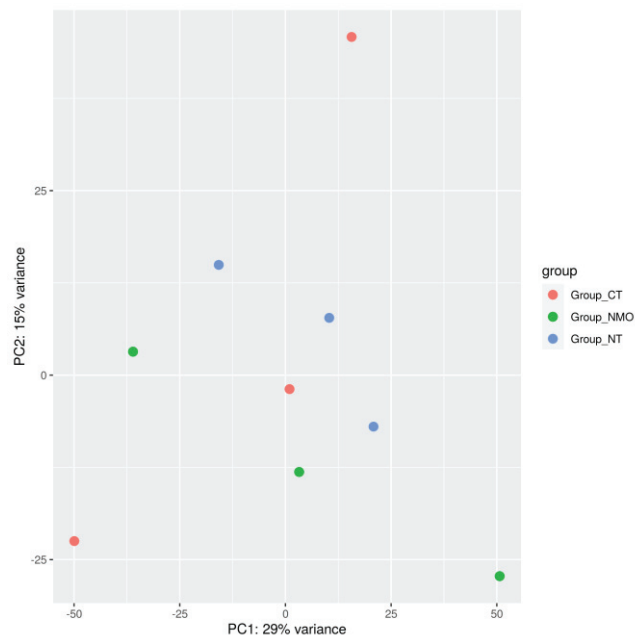


Figure 34. Analyse transcriptomique de l'épendyme des rats NMO. Analyse en composantes principales du nombre de transcrits par gène groupés par condition (n = 3).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Nous avons montré que les anticorps de patients NMO entraînent une souffrance épendymaire à court terme dans les modèles *in vitro* et *ex vivo* utilisés. Après 24 heures de traitement, les IgG des sept patients différents ont entraîné des modifications hétérogènes de l'expression de l'AQP4 et de la Cx43 montrant que même si tous les patients ont des anticorps anti-AQP4, il existe une variabilité dans leur pathogénicité. Cette variabilité d'effets *in vitro* est le reflet de la présentation clinique des patients. En effet, la patiente n°2 était celle qui avait le plus d'effets sur les cultures primaires et aussi la seule qui présentait des lésions périventriculaires avec gonflement du ventricule à l'IRM. Nous avons donc décidé de nous focaliser sur les IgG de cette patiente pour la suite. Dans le modèle d'explant de ventricules latéraux, nous avons montré que l'exposition aux IgG-NMO induit : 1) l'agglomération de l'AQP4 et un gonflement cellulaire suggérant une accumulation d'eau, ainsi qu'une modification d'expression des jonctions communicantes ; 2) un ralentissement et une dispersion de la propulsion des billes régulés par les cils associés à une réduction de la polarité planaire ; 3) une activation de la prolifération sous-ventriculaire ; et 4) une réaction inflammatoire avec production de la cytokine pro-inflammatoire TNF α , et les chémokines CXCL19, CXCL13 et CCL12 impliquées dans le recrutement de macrophages et leucocytes.

1. Altération des fonctions épendymaires : vers une « épendymocytopathie »

a. Agglomération de l'AQP4 et gonflement cellulaire

Sur l'astrocyte, les IgG-NMO provoquent des effets très variables allant de la mort cellulaire, à la baisse de l'expression de l'AQP4 et de la GFAP, de la gliose avec surexpression de GFAP jusqu'à la perte de fonction gliale avec préservation du marquage AQP4 et GFAP (Misu et al., 2013). Ces effets sont dépendants de l'état d'avancement de la pathologie et du site lésionnel, mais aussi de l'isoforme de l'AQP4 prévalente (M1 ou M23) (Hinson et al., 2012). Les IgG-NMO internalisent plus facilement la forme M1 que M23 qui résiste à l'internalisation et tend à s'agglomérer. Pour l'épendyme, différents effets ont également été co-observés chez l'homme où des portions d'épendyme sont dénudées et des portions préservées avec perte d'AQP4 et dépôt de complément, ou chez l'animal où l'épendyme était gliotique (Asgari et al., 2013; Guo et al., 2017). Dans nos modèles *in vitro* et *ex vivo*, les IgG-NMO induisent une agglomération de l'AQP4 à la membrane latérale des épendymocytes. Le ratio d'expression des différentes

isoformes de l'AQP4 n'est pas connu pour l'épendyme. La présence d'OAP (*orthogonal array of particles*) (Mack et al., 1987), suggère que la forme M23 prédomine et que ces agglomérats résistent à l'internalisation. De plus, sur les astrocytes, on observe souvent une perte d'expression d'AQP4 mais ici, nous n'avons pas observé de perte d'expression dans les épendymocytes pour aucun patient. En faisant une délétion du gène de l' α -synucléine, une molécule d'ancrage à la membrane de l'AQP4, il a été montré une réduction de l'expression d'AQP4 au niveau des pieds astrocytaires périvasculaires mais pas de réduction au niveau de l'épendyme (Amiry-Moghaddam et al., 2003). Cette différence d'ancrage à la membrane entre l'astrocyte et l'épendymocyte pourrait aussi expliquer ces différences. En revanche, Guo et ses collègues ont montré une perte d'AQP4 chez les patients NMO (Guo et al., 2017) donc on pourrait penser qu'une exposition à long terme avec les IgG-NMO pourrait induire une perte d'expression d'AQP4. Chez les rats-NMO, l'AQP4 était préservée après 7 jours d'infusion ce qui suggère un temps d'infusion trop court.

La faible expression des protéines de jonctions serrées fait de l'épendyme une barrière fine laissant passer librement des petites molécules (< 70 kDa) mais bloquant le passage de grosses molécules (> 500 kDa) (Bedussi et al., 2015; Whish et al., 2015). Cependant, le passage d'une grosse molécule comme la ferritine (560 kDa) à travers l'épendyme a été montré par microscopie électronique (Brightman, 1965). Dans cette étude, la ferritine a été retrouvée dans les espaces intercellulaires mais aussi dans des vésicules de pinocytoses situées à l'intérieur des cellules. En fait, la ferritine traverse aisément les jonctions adhérentes intercellulaires du côté apical des cellules mais s'accumule dans un réseau labyrinthique de jointures situées du côté basolatéral. Ce qui est intéressant ici, c'est que la ferritine semble être partiellement bloquée à ce niveau en s'accumulant, facilitant ainsi l'endocytose. Comme les IgG sont des molécules de 150 kDa et que l'AQP4 est exprimée basolatéralement sur l'épendyme, les IgG-NMO pourraient s'accumuler dans ces mailles et être filtrées ou englouties dans des vésicules expliquant ainsi l'agglomération de l'AQP4. Comme les anticorps fixent l'AQP4, le canal se retrouverait alors aussi dans les vésicules et sa fonction serait perturbée. Les différences d'effets observées entre les astrocytes et l'épendyme pourraient alors s'expliquer par cette propriété particulière de l'épendyme. La microscopie électronique permettrait de répondre à cette question. Il reste cependant une limite à ce raisonnement car l'agglomération de l'AQP4 après traitement avec les IgG-NMO *ex vivo* s'aligne sur le marquage β -catenin contrant l'idée d'une internalisation. De plus, nous avons montré précédemment dans le modèle rat-NMO que les

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

IgG ont diffusées largement au travers de l'épendyme (Cobo-Calvo et al., 2020). La capacité de filtration de l'épendyme des IgG-NMO pourrait alors être limitée ou saturée dans le temps permettant le libre passage des IgG-NMO. Ce qui expliquerait pourquoi je n'ai pas retrouvé d'agglomération d'AQP4 chez les rats-NMO après 7 jours d'infusion dans les ventricules. Analyser la capacité de l'épendyme à filtrer des molécules de diverses tailles pourraient également permettre d'évaluer la capacité de barrière après traitement avec les IgG-NMO.

Le fait que les cellules grossissent après modification de l'expression de l'AQP4 suggère une réduction de l'efflux d'eau. On sait que le co-transport de l'eau par l'AQP4 est important dans l'évacuation d'ions ou de déchets métaboliques (Nagelhus and Ottersen, 2013). La réduction du transport de l'eau pourrait alors engendrer une accumulation intra-cellulaire d'eau mais aussi de ces déchets provoquant une souffrance cellulaire. Cependant, il a déjà été montré que les cellules épendymaires peuvent aussi gonfler en signe de réactivité gliale en condition inflammatoire (Pourabdolhossein et al., 2017; Young et al., 2013). Donc il faudrait vérifier que l'efflux d'eau est réduit par les IgG-NMO pour savoir si l'agglomération d'AQP4 est responsable du gonflement des cellules épendymaires ou si c'est juste un phénomène gliotique. Un exemple de méthode permettant de mesurer l'efflux d'eau à l'échelle cellulaire est la mesure de la concentration en $[^{14}\text{C}]$ urée intracellulaire ou en tritium (Chen et al., 1992; Rosenberg et al., 1986).

b. Altération de la communication intercellulaire et déséquilibre ionique

Il existe un lien fort entre l'expression de l'AQP4 et de la Cx43. En effet, des souris KO pour l'AQP4 ont une plus faible expression de Cx43 et du couplage intercellulaire dans l'astrocyte et l'épendyme (Li et al., 2009; Nicchia et al., 2005). Il existe encore quelques incompréhensions concernant la manière dont ces deux protéines interagissent car certains auteurs ont montré qu'elles sont exprimées dans des compartiments différents alors que d'autres ont marqué la Cx43 dans les OAP contenant l'AQP4 chez l'astrocyte (Rao et al., 2021; Rash and Yasumura, 1999). Ici, nous avons montré que les IgG-NMO induisent une augmentation de la taille des clusters de Cx43 sur l'épendyme. C'est un résultat que nous avons déjà observé sur l'astrocyte, suggérant des interactions moléculaires similaires (Richard et al., 2020). On pourrait penser que l'accumulation de Cx43 est due à l'agglomération d'AQP4 qui emprisonne indirectement la Cx43 mais l'AQP4 et la Cx43 sont exprimées dans des compartiments différents de l'épendyme

(basolatéral et apicolatéral respectivement) (Nielsen et al., 1997). De plus, nous n'avons pas observé de colocalisation des agglomérats d'AQP4 et de Cx43 après traitement avec les IgG-NMO. Il existe très certainement d'autres mécanismes responsables de ces modifications qui ne sont pas encore connus et l'étude des mécanismes sous-tendant les relations moléculaires entre Cx43 et AQP4 dans l'épendyme permettrait d'éclaircir ces résultats. L'étude de l'ancrage de ces protéines par les syntrophines, qui sont des ancrures communes à la Cx43 et l'AQP4, semble être une bonne piste (Rao et al., 2021). En effet, en supprimant l'expression chez la souris des syntrophines $\alpha 1$ et $\beta 1$, l'AQP4ex, une isoforme de l'AQP4 étant exprimée dans le cytoplasme et contrôlant l'ancrage de l'AQP4 M23 à la membrane, est downrégulée et le nombre de jonctions communicantes à la membrane des astrocytes est augmenté. Cette isoforme AQP4ex semble donc être la clé régulant les interactions entre AQP4 et Cx43. L'ouverture des jonctions communicantes dépend de leur localisation spatiale et nécessite un turnover constant entre ancrage et désancrage à la membrane afin de fonctionner correctement (Solan and Lampe, 2018). Ainsi, une augmentation de la taille des agrégats de Cx43 à la membrane pourrait provoquer l'accumulation de canaux obsolètes induisant une réduction de la communication intercellulaire dans les épendymocytes.

L'altération de l'expression et de l'activité de l'AQP4 et des jonctions communicantes sont en faveur d'un déséquilibre ionique. Nous n'avons pas mesuré directement les effets des IgG-NMO sur les concentrations ioniques intracellulaires, mais l'analyse transcriptomique est en faveur de cette hypothèse. En effet, parmi les 200 gene sets les plus modulés par les IgG-NMO, deux gene sets associés au transport du potassium et deux au transport du calcium sont downrégulés. Cependant, aucun transporteur de ces ions n'est significativement downrégulé dans l'analyse différentielle. Mais leur activité peut très bien être altérée sans baisse d'expression. Par exemple, on sait que le transport d'ions K^+ par Kir4.1, un canal potassique permettant de rectifier l'équilibre en K^+ notamment par les astrocytes au niveau des synapses après une décharge, est dépendant du transport de l'eau par l'AQP4 (Amiry-Moghaddam and Ottersen, 2003). En effet, une baisse d'expression d'AQP4 entraîne des défauts de rectification de l'équilibre potassique par les astrocytes. Kir4.1 et AQP4 sont situés à proximité dans les pieds astrocytaires permettant de faciliter leur co-fonctionnement. Cependant, Kir4.1 et AQP4 sont exprimés dans des compartiments différents dans les épendymocytes et on ne sait pas si leurs fonctions sont liées (Fujita et al., 2015). Malgré tout, si un dérèglement de l'efflux d'eau a lieu, une accumulation de K^+ pourrait également avoir lieu entraînant ainsi un déséquilibre

ionique dans les cellules épendymaires. De plus, nous avons observé la downrégulation du transport de la transferrine régulant le transport du fer. On sait que l'accumulation de fer est toxique, cela a été notamment montré dans le contexte de la SEP où l'accumulation de fer dans les astrocytes et les microglies contribuent à la formation des lésions (Healy et al., 2022). Un mauvais transport du fer par les épendymocytes pourrait engendrer une accumulation toxique à l'échelle cellulaire mais aussi plus globalement dans toute la zone périventriculaire contribuant ainsi à la formation des lésions épendymaires et périventriculaires dans la NMO.

c. Perturbation de l'activité des cils moteurs

Le battement ciliaire des épendymocytes est une fonction primordiale pour la circulation du LCS et l'évacuation des déchets toxiques. Nous avons montré que les IgG-NMO provoquent une altération fonctionnelle de l'activité des cils moteurs et que c'est lié à une réduction de la polarisation des corps basaux des cils. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour comprendre ces dysfonctions. Premièrement, l'agglomération de l'AQP4 et le grossissement cellulaire pourrait induire des remaniements du cytosquelette ou constituer des signaux mécaniques provoquant la délocalisation spatiale de régulateurs de la polarité planaire (Mahuzier et al., 2018; Takagishi et al., 2017). Deuxièmement, les vagues calciques se propageant à travers les cellules épendymaires par les jonctions communicantes permettent de réguler la synchronisation de l'activité motrice des cils épendymaires (Zhang et al., 2020). En conséquence, les déficits de l'activité des jonctions communicantes et des échanges calciques observés dans nos modèles pourraient à eux seuls expliquer les altérations des cils. Troisièmement, des altérations de la fonction ciliaire et de la polarisation des corps basaux ont été montrées dans d'autres modèles neuroinflammatoires (Pourabdolhossein et al., 2017; Young et al., 2013). C'est pourquoi, la réactivité gliale et inflammatoire induite par les IgG-NMO dans les cellules épendymaires pourraient altérer la fonction ciliaire et la polarisation planaire. Une autre hypothèse a émergé à partir de notre analyse transcriptomique montrant une downrégulation significative du transcrit LCA5 et du gene set *GO_Intraciliary_Transport*. LCA5 est impliqué dans l'amaurose congénitale de Leber (LCA) où une cécité se développe pendant l'enfance due à la mort cellulaire des photorécepteurs (den Hollander et al., 2008). Le KO de LCA5 provoque la mauvaise localisation de la protéine Ift88, une protéine régulant le trafic intra-flagellaire des protéines, induisant la dystrophie des photorécepteurs (Qu et al.,

2019). Ce transport intra-flagellaire est essentiel au développement et au maintien de l'activité des cils par le trafic de composants du cil, de molécules signalétiques ou de canaux membranaires (Blacque et al., 2008). Nos résultats suggèrent que des changements du cytosquelette ou homéostatiques pourraient perturber ce trafic intra-ciliaire participant aux altérations ciliaires. Il serait alors intéressant d'étudier les effets des IgG-NMO sur la vitesse du battement ciliaire en lui-même.

d. Activation de la niche sous-ventriculaire

La zone sous-épendymaire abrite des cellules souches encore actives chez l'adulte participant au fonctionnement physiologique du cerveau et permettant d'apporter également de nouvelles cellules lorsque des lésions ont lieu. Évaluer l'intégrité de cette niche dans le cadre des pathologies démyélinisantes est primordiale si on veut la stimuler pour promouvoir la réparation des zones lésées. Dans cette étude, nous montrons que les IgG-NMO provoquent une activation de la prolifération cellulaire sous-épendymaire. Les progéniteurs quiescents B1 prolifèrent et le réseau de neuroblastes est densifié. Il a été montré dans une analyse RNAseq que les NSCs de la V-SVZ n'expriment pas ou très peu l'AQP4 (Zywitzka et al., 2018). Les effets que nous observons sont donc certainement indirectement liés aux altérations des épendymocytes notamment par des altérations des échanges homéostatiques et des perturbations de la circulation du LCS. De plus, Belenguer et ses collègues ont montré que le TNF α régule la prolifération et la différenciation des cellules souches sous-ventriculaires (Belenguer et al., 2021b). L'activation des astrocytes B1 pourraient donc être due à la sécrétion de TNF α par les épendymocytes en réponse aux IgG-NMO. Comme cette prolifération ne répond pas directement à une atteinte lésionnelle, vu qu'elle est aigue, la suractivation non nécessaire de la niche sous-ventriculaire pourrait entraîner un épuisement de la niche à long terme.

Comme les astrocytes, les épendymocytes sont équipés de transporteurs du glutamate (Del Bigio, 1995) et pourraient libérer du glutamate excitotoxique dans leur environnement en réponse aux IgG-NMO comme nous l'avons montré pour l'astrocyte (Marignier et al., 2010). L'injection de glutamate en excès dans les ventricules induit une augmentation du volume ventriculaire, des œdèmes et des dommages dans l'hippocampe chez le rat (Bai et al., 2022). L'utilisation d'un agoniste du récepteur mGluR4 active la prolifération et la différenciation des

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

neuroblastes sous-ventriculaires de rats (Zhang et al., 2021). Si les épendymocytes sécrètent du glutamate en réponse aux IgG-NMO, cela pourrait expliquer ce double effet toxique et activateur de la SVZ dans les résultats obtenus. Après traitement avec les IgG-NMO, nous avons observé une légère diminution des NB1 (les neuroblastes qui prolifèrent) et augmentation des NB2 (les neuroblastes qui migrent), en plus de la densification du réseau de neuroblastes observée avec le marquage doublecortin. L'activité ciliaire permet de réguler la migration des neuroblastes (Sawamoto, 2006) et elle est altérée par les IgG-NMO dans nos modèles. Il est possible alors que le réseau se densifie par stagnation des neuroblastes NB2 qui manquent de signaux véhiculés par l'activité ciliaire. La migration et l'incorporation des neuroblastes dans les bulbes olfactifs participent au bon fonctionnement de la perception olfactive. Il a été reporté qu'environ 50% des patients NMO présentent des déficits olfactifs avec une perte de volume du bulbe olfactif et une perte de volume de matière grise dans les aires corticales olfactives (Schmidt et al., 2013; Zhang et al., 2015). L'AQP4 est exprimée par les cellules de l'épithélium olfactif et des souris KO pour l'AQP4 montrent des déficits olfactifs (Lu et al., 2008). Les troubles olfactifs des patients NMO pourraient donc être produits à la fois par une atteinte directe de l'épithélium olfactif mais également par des troubles de la migration des neuroblastes liés aux atteintes périventriculaires par les IgG-NMO. Malheureusement, l'absence d'effets sur la niche sous-ventriculaire observée chez le rat-NMO ne permet pas de conclure sur cette hypothèse.

L'effet sur les progéniteurs oligodendrocytaires n'est pas clair car nous montrons une tendance vers l'augmentation par immunohistochimie avec le marqueur Olig2 mais une diminution par cytométrie avec le marqueur A2B5. Il est possible qu'il n'y ait pas d'effet du tout comme ces effets sont des tendances ou qu'il s'agisse de deux populations distinctes de progéniteurs comme suggéré par d'autres auteurs (Wang et al., 2013). Une étude précédente a montré que les IgG-NMO réduisent la capacité de neurosphères issues de la V-SVZ à produire des OPC Olig2⁺ (Gómez-Pinedo et al., 2021). Les effets des IgG-NMO sur les précurseurs oligodendrocytaires restent donc à être étudiés. L'évaluation de leur prolifération, survie et capacité à remyéliniser serait à étudier dans des modèles pathologiques à plus long terme où des lésions démyélinisantes sont présentes.

e. Réaction inflammatoire de l'épendyme

L'analyse transcriptomique faite à partir des cellules épendymaires *in vitro* après traitement avec les IgG-NMO révèle une importante activation de voies inflammatoires et nous a permis d'identifier un panel de cytokines et chemokines uprégulées spécifiquement. Notamment, l'augmentation du TNF α qui est proinflammatoire, mais aussi les chemokines CXCL9, CXCL13 et CCL12 qui sont connues pour activer et recruter les lymphocytes T, les lymphocytes B et les macrophages. Ces cytokines et chemokines sont élevées dans le LCS de patients NMO et donc l'épendyme pourrait en être la source (Alvarez et al., 2013; Howe et al., 2014; Koper et al., 2018). Ainsi, les cellules épendymaires pourraient participer au recrutement de cellules immunes vers les zones périventriculaires et contribuer à l'inflammation locale dans les phases aiguës de la pathologie. La downrégulation de l'IL6, cytokine pro-inflammatoire, est surprenante car on sait qu'elle est en forte concentration dans le LCS des patients NMO et uprégulée dans les astrocytes par les IgG-NMO (Uzawa et al., 2014). La downrégulation de cette cytokine pro-inflammatoire suggère que des mécanismes protecteurs se mettent peut-être en place dans l'épendyme.

Les cellules épithéliales des plexus choroïdes et de l'épendyme expriment des récepteurs Fc γ (données RNAseq personnelles et (Melo et al., 2015)). Dans un modèle de leishmaniose canine, des IgG se sont déposées sur les cellules épendymaires entraînant une réaction inflammatoire non spécifique (Melo et al., 2015). Les IgG-CTRL ont également induit une activation de voies transcriptomiques liées à l'inflammation et la production de cytokines et chemokines pro-inflammatoires. Ceci montre que, comme les astrocytes et la microglie, les épendymocytes sont sensibles de manière non spécifique aux IgG et peuvent entretenir une réaction inflammatoire non spécifique par liaison avec les récepteurs Fc γ (Fuller et al., 2014). Il faudrait donc tester l'affinité des IgG des patients NMO pour les récepteurs Fc γ et la comparer à l'affinité pour l'AQP4 par des techniques de co-immunoprécipitation ou de résonance des plasmons de surface pour savoir quelle est la contribution de chaque interaction aux réactions inflammatoires observées dans mes modèles (Forest-Nault et al., 2021). Curieusement, le récepteur Fcgr2b a été significativement downrégulé par les IgG-NMO et les IgG-CTRL suggérant une action des IgG sur ce récepteur et pourrait expliquer la réaction des cellules épendymaires aux IgG-CTRL (Log2FC = -1,72 ; padj = 0,0066 et Log2FC = -2,21 ; padj = 0,00055). Le récepteur Fcgr2b est connu pour être le seul récepteur Fc aux IgG à avoir une activité inhibitrice. Notamment, il fixe avec peu d'affinité les IgG et les cellules B, ce qui entraîne une inhibition de leur activité (Smith

and Clatworthy, 2010). Une diminution de son expression dans l'épendyme pourrait alors entraîner une susceptibilité à l'auto-réactivité des lymphocytes B dans la NMO, comme par exemple dans la SEP où un polymorphisme de ce récepteur est un facteur de risque (Vedeler et al., 2001).

2. Rôles de l'épendyme dans la physiopathologie de la NMO

Nous avons montré que les IgG-NMO provoquent des altérations fonctionnelles de l'épendyme dans nos modèles *in vitro* et *ex vivo* et les conséquences directes que ces altérations peuvent avoir sur le fonctionnement du système nerveux central. Il reste maintenant à expliquer comment l'épendyme peut être ciblé chez les patients NMO, pourquoi certains patients présentent des lésions périventriculaires et d'autres non et quelles sont les conséquences de ces atteintes au niveau clinique.

a. La route sang-LCS-parenchyme : une nouvelle entrée pour les IgG-NMO

Les données de la littérature indiquent que les IgG-NMO sont produits préférentiellement en périphérie mais que la présence dans le LCS des IgG corrèle avec l'apparition de biomarqueurs d'atteintes astrocytaires dans le LCS (Jarius et al., 2010). L'entrée des IgG dans le LCS peut être une conséquence de la rupture de la BHE, mais les IgG peuvent entrer aussi par les voies où la barrière est plus perméable, c'est-à-dire les plexus choroïdes et les organes circumventriculaires, et induire ensuite une fragilisation en interne de la BHE. Comme les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins n'expriment pas l'AQP4, il faudrait qu'un évènement particulier arrive chez les patients pour que la BHE s'ouvre et rende accessible l'AQP4 des pieds astrocytaires. Alors que dans les plexus choroïdes, les anticorps pourraient passer facilement à travers les capillaires fenêtrés et atteindre l'AQP4 exprimée basolatéralement sur les cellules épithéliales et fragiliser cette barrière. La route sang-LCS-parenchyme pour l'entrée de facteurs immunitaires dans la NMO semble donc probable (Cousins et al., 2021; Guo et al., 2017). Les premiers évènements pathogéniques dans la NMO pourraient avoir lieu au niveau des plexus choroïdes, des organes circumventriculaires et autour des cavités remplies de LCS comme les ventricules et la glia limitans. En effet, des IgG-NMO injectés dans la cisterna magna induisent des lésions dépendantes du complément dans les zones

périventriculaires et sous-arachnoïdiennes (Asgari et al., 2013, 2015). Des dépôts d'IgG humaines et de complément ont été retrouvés à la fois sous l'épendyme, sous l'arachnoïde, sur la glia limitans et sur les pieds astrocytaires périvasculaires sous-épendymaires et sous-arachnoïdiens. Une baisse du marquage de la myéline LFB sous ventriculaire a été observée (Asgari et al., 2013). Les auteurs ont montré une rupture de la BHE sous-ventriculaire et à proximité des méninges (Asgari et al., 2015). Ces résultats montrent que les IgG-NMO présentes dans le LCS peuvent diffuser à travers l'épendyme et la glia limitans pour induire des lésions démyélinisantes et rompre la BHE localement. La cascade d'évènements serait alors la suivante : 1) entrée des IgG dans les plexus choroïdes et fragilisation de la barrière sang-LCS ; 2) entrée des IgG dans le LCS ; 3) ciblage des IgG sur l'épendyme, souffrance épendymaire et fragilisation de la barrière LCS-parenchyme ; et 4) pénétration des IgG à travers les ventricules, ciblage des astrocytes périvasculaires sous-ventriculaires et rupture de la BHE (**Figure 35**).

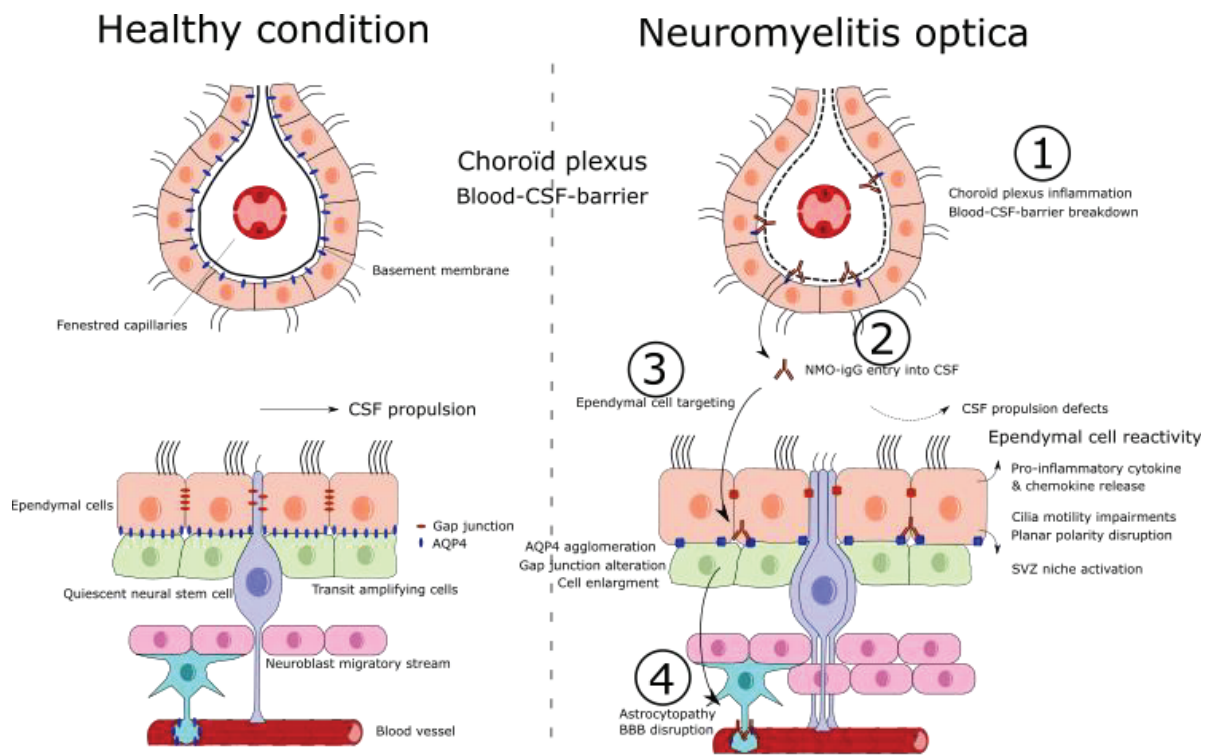


Figure 35. Voie d'entrée des IgG-NMO dans le LCS et « épendymocytopathie ». Les capillaires peu perméables des plexus choroïdes rendent facile l'entrée des IgG-NMO dans les plexus. Une fragilisation de ceux-ci peut entraîner le ciblage de l'AQP4 exprimée par les cellules épithéliales. L'altération de cette barrière faciliterait l'entrée dans le LCS des IgG-NMO où ils pourraient exercer leur effet pathogène sur l'épendyme. L'altération des fonctions épendymaires entrainerait alors une « épendymocytopathie » contribuant à la souffrance périventriculaire observée chez les patients NMO. Un ciblage des astrocytes sous l'épendyme pourrait ouvrir la barrière sang-cerveau par l'intérieur.

b. Pourquoi certains patients ont des atteintes périventriculaires et d'autres non ?

Comment expliquer l'atteinte préférentielle de certaines régions du SNC et l'apparition hétérogène de lésions périventriculaires ? En effet, dans la NMO, les lésions périventriculaires à l'IRM sont retrouvées à une incidence de 8 à 40% environ (Kim et al., 2010; Pittock et al., 2006) et de 56% en anatomopathologie (Guo et al., 2017). Pour répondre à cette question, penchons-nous sur les hypothèses concernant l'atteinte préférentielle des nerfs optiques, de la moelle épinière et des atteintes cérébrales. La production des anticorps dans la NMO est d'origine périphérique et certains patients les possèdent des années avant l'apparition même des symptômes montrant que l'accès des IgG-NMO aux sites lésionnels dépend de la fragilisation des interfaces sang-système nerveux central (Jarius et al., 2010). En ce qui concerne les lésions cérébrales, on sait que les anticorps pénètrent facilement au niveau des organes circumventriculaires, où les vaisseaux sont perméables, entraînant les lésions classiquement observées dans l'area postrema et l'hypothalamus postérieur (Apiwattanakul et al., 2010; Iorio et al., 2011). Concernant l'atteinte préférentielle des nerfs optiques et de la moelle épinière, des différences régionales des propriétés de la BHE sont suspectées. Par exemple, il a été montré que la BHE de la tête du nerf optique est différente par rapport au reste du nerf et présente des caractéristiques plus perméables (Hofman et al., 2001). Des différences de propriété de la BHE de la moelle épinière pourraient également expliquer l'apparition des lésions dans la moelle (Bartanusz et al., 2011). De plus, la BHE possède des propriétés régionales la rendant fragile en certains points en fonction des événements auxquels elle est exposée. Par exemple, le lipopolysaccharide (LPS) fragilise plutôt la BHE au niveau de l'hippocampe et l'épinéphrine fragilise plutôt au niveau de l'amygdale (Brimberg et al., 2015). La rareté des lésions périventriculaires pourrait donc être expliquée de la même manière. La barrière sang-LCS, qui possède également des propriétés de barrière différentes, pourrait être fragilisée en conséquence d'événements particuliers qui n'ont eu lieu que chez les patients qui présentent des IgG dans le LCS et des atteintes périventriculaires.

Pour proposer une autre explication, on considère que les anticorps sont plutôt produits en périphérie dans la NMO. La présence dans le LCS des IgG-NMO corrèle avec une activité plus intense de la maladie (Jarius et al., 2010). En revanche, certains patients présentent des populations de cellules B productrices d'anticorps dans le LCS indiquant qu'une production intrathécale est possible (Bennett et al., 2009). Comme les atteintes épendymaires et

périventriculaires ne sont pas systématiques au cours de la NMO, il se pourrait qu'elles apparaissent uniquement chez les patients ayant une synthèse intrathécale d'IgG. Il faudrait donc rechercher une association entre la synthèse intrathécale, la présence de lésions périventriculaires et la capacité de produire des atteintes épendymaires des anticorps.

L'hétérogénéité dans la capacité des IgG purifiées de patients NMO à produire des lésions épendymaires peut aussi être due à un phénomène d'*epitope spreading*. L'*epitope spreading* survient lorsque la réponse immunitaire des lymphocytes T ou B contre un antigène initial se reprend sur d'autres épitopes d'un même antigène (intramoléculaire) ou sur des épitopes d'un antigène voisin (intermoléculaire) (Cornaby et al., 2015). Cette réponse permet de booster la réponse immunitaire face à des pathogènes extérieurs, mais elle peut également accentuer la réponse immunitaire dans les maladies auto-immunes. Par exemple, cela a été montré dans le cas d'une immunisation au peptide de la protéine de myéline PLP 139-151 (*proteolipid protein*) chez la souris qui a développé une réponse immunitaire humorale pour d'autres épitopes de PLP et d'autres protéines de myéline comme MOG et MBP (Kidd et al., 2008). L'invasion dans le parenchyme de lymphocytes B ou T pourrait alors faciliter le phénomène d'*epitope spreading* localement et accentuer la réponse immunitaire au niveau périventriculaire dû à la facilité d'accès de l'épendyme aux éléments du LCS.

c. Altérations du volume ventriculaire et de la circulation du LCS

Nous avons montré que les IgG-NMO modifient l'expression de l'AQP4 et la motilité ciliaire dans nos modèles *in vitro* et *ex vivo*, deux facteurs importants dans le contrôle du volume ventriculaire et dans la circulation du LCS. Les patients NMO ont-ils donc des changements de volume ventriculaire ? Il a été montré que la fréquence de présentation d'une hydrocéphalie chez les patients NMO est très rare (Clardy et al., 2014). Cependant, même si cela représente une faible proportion de patients, cela reste plus fréquent que dans la population générale (Castañeyra-Ruiz et al., 2014). Dans une autre étude, les patients NMO présentent un élargissement des ventricules (sans parler d'hydrocéphalie), notamment des ventricules latéraux et du 3^{ème} ventricule de façon significative chez 18 patients comparés à 26 sujets sains et 20 patients atteints de sclérose en plaques (Schneider et al., 2017). Dans nos propres données, on voit clairement un élargissement du ventricule latéral à l'IRM cérébrale de la patiente n°2, là où l'inflammation périventriculaire est la plus forte. Même si ces données restent limitées et

nécessitent de rechercher plus souvent la présence de ces anomalies ventriculaires chez les patients avant de parler d'une véritable incidence, elles suggèrent clairement un lien entre la présence d'IgG-NMO dans le LCS et une dérégulation du volume ventriculaire, probablement en lien avec une atteinte des fonctions de l'AQP4 et de la motilité ciliaire de l'épendyme.

3. Limites et perspectives

a. Limites

Premièrement, on ne peut pas exclure que les échantillons plasmatiques des patients NMO que nous avons utilisés ne contiennent pas d'autres anticorps que les anti-AQP4 et donc que les effets que nous observons soient spécifiques de ces derniers. Par exemple, d'autres anticorps comme des anti-nucléaires ou anti-endothélium (anti-GRP78) peuvent être retrouvés dans la NMO (Ducloyer et al., 2021; Shimizu et al., 2017). Comme évoqué plus tôt, le ciblage non spécifique des récepteurs Fc γ peuvent aussi provoquer des atteintes de l'épendyme. Parallèlement, le phénomène d'*epitope spreading* pourrait entraîner la reconnaissance par le système immunitaire d'autres épitopes de l'AQP4 ou de protéines spatialement proches entraînant la production d'autres auto-anticorps. Nous avons choisi d'utiliser tous les IgG présents dans les échantillons plasmatiques afin de refléter cette hétérogénéité. Mais afin d'évaluer la spécificité aux anti-AQP4 des effets observés dans nos modèles, nous allons ajouter une expérience *ex vivo* en utilisant des échantillons d'IgG purifiées de la patiente n°2 déplétées en anti-AQP4. La déplétion est réalisée par exposition répétée sur des cellules HEK transfectées avec un plasmide contenant le gène de l'AQP4-M23. Nous nous attendons à ce que les effets des IgG-NMO sur les altérations épendymaires soient atténués par la déplétion car nous avons déjà montré moins d'effets sur la démyélinisation et les altérations des jonctions communicantes dans une étude précédente (Richard et al., 2020).

Deuxièmement, après traitement avec les IgG-NMO *in vitro*, l'analyse transcriptomique a montré une uprégulation des gènes liés à la prolifération cellulaire. Ce résultat est étonnant car les cellules épendymaires cérébrales matures sont post-mitotiques et résistent à la différenciation même en conditions pathologiques (Shah et al., 2018; Spassky, 2005). Comme nous n'avons pas observé de prolifération des cellules épendymaires dans le modèle *ex vivo* avec le marquage Ki67, cet effet est spécifique au modèle *in vitro* où les cellules sont

certainement dans un état non physiologique même si elles expriment FoxJ1 et possèdent des cils moteurs actifs.

Troisièmement, il est étonnant vu la quantité d'effets que nous observons *in vitro* et *ex vivo*, et la sévérité de la pathologie de la patiente n°2, que les NMO₂-IgG n'ont pas induit d'effets dans le modèle rat-NMO. Nous observons quand même une tendance vers la perte d'expression d'AQP4, la modification de l'expression de Cx43 et la prolifération d'OPC. Il est possible que les IgG-NMO nécessitent plus de temps pour faire leurs effets sur l'épendyme dans le modèle rat-NMO ou que la concentration en IgG soit trop faible. Parallèlement, la dissection wholemounts des ventricules des rats-NMO nous aurait peut-être permis d'observer des effets plus fins comme l'agglomération de l'AQP4 ou la dépolarisation des corps basaux et/ou une altération de la motilité ciliaire. Pour la suite du projet, il sera nécessaire d'analyser les effets à plus long terme des IgG-NMO, ou de moduler la concentration des IgG-NMO, qui nécessitent peut-être une exposition plus longue pour induire leurs effets dans un modèle *in vivo*.

b. Perspectives

i. Interactions de l'épendyme avec le système immunitaire

Nous avons montré que l'épendyme sécrète des chémokines connues pour attirer des cellules immunes. Est-ce que l'épendyme participe alors au recrutement de cellules immunes périphériques vers le SNC ? Si ces cellules se retrouvent dans le LCS, l'épendyme les attire-t-elles afin qu'elles entraînent des dommages tissulaires sur l'épendyme lui-même ou afin qu'elles le traversent pour engendrer des dommages périventriculaires ? Ou à l'inverse, l'épendyme adopterait-il un phénotype protecteur en augmentant ses capacités de barrière à long terme ? Il est donc nécessaire d'étudier les propriétés de barrière de l'épendyme après traitement par les IgG-NMO en analysant le passage de grosses molécules (comme du dextran 500 kDa) ou des cellules immunes à travers des cellules épendymaires cultivées sur des supports membranaires perméables ou dans le modèle rat-NMO par injection intraventriculaire et analyse de la diffusion sous-épendymaire.

Dans leur étude, Guo *et al.*, montrent une activation microgliale sous-ventriculaire (Guo et al., 2017). Il existe clairement une activation microgliale dans les lésions actives chez les patients NMO et dans les modèles animaux suggérant qu'un dialogue astrocyte-microglie s'opère et contribue aux processus inflammatoires démyélinisants (Chen et al., 2021). Je n'ai pas évalué

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

l'état des microglies sous-ventriculaires après traitement avec les IgG-NMO sur les explants mais il se pourrait qu'il existe une activation microgliale comme montrée chez les patients. Un dialogue épendyme-microglie pourrait avoir lieu et contribuer à la formation des lésions inflammatoires périventriculaires dans la NMO. Nous pourrions évaluer la capacité des épendymocytes activés par les IgG-NMO à induire des changements phénotypiques des microglies dans des modèles de co-cultures. Inversement, l'activation microgliale pourrait renforcer les altérations épendymaires comme montré dans un modèle de co-culture (Fernández-Arjona et al., 2021).

Dans l'équipe, nous nous intéressons aux anticorps comme modulateurs de l'activité des cellules gliales. En revanche, on sait que les IgG-NMO peuvent recruter le complément et les cellules immunes comme effecteurs. J'évoquais plus haut que je n'observais pas d'effets sur la mort cellulaire et que le complément pourrait induire cette mort cellulaire alors que sans complément, les IgG-NMO ont plutôt un effet modulateur fonctionnel. Il serait donc intéressant de confirmer cette hypothèse en ajoutant une condition avec complément dans mes expériences. Ces effecteurs pourraient également être la clé permettant d'observer des effets sur l'épendyme dans nos modèles *in vivo*.

ii. L'épendyme du canal central de la moelle épinière

Comme mentionné dans l'introduction, l'épendyme de la moelle épinière possède des propriétés différentes de l'épendyme du cerveau. Les patients NMO peuvent présenter des myélites de la partie haute de la moelle épinière et donc des atteintes épendymaires du canal central de la moelle épinière sont à étudier. Il a été montré que les cellules épendymaires de la moelle épinière expriment des gènes responsables de la différenciation en OPC et sont capables de se différencier en OPC lors de lésions de la moelle épinière (Llorens-Bobadilla et al., 2020; MacDonald et al., 2021). En effet, le site d'attachement du facteur de transcription Sox10 sur le gène Olig2 (responsable de la différenciation en OPC) est accessible (Llorens-Bobadilla et al., 2020). Sox10 n'est pas naturellement exprimé dans les cellules épendymaires. Mais en induisant son expression avec un système Cre-recombinase, les chercheurs ont pu activer la capacité des cellules épendymaires de la moelle épinière à produire des OPC. Dans un modèle de lésion traumatique de la moelle épinière, cette activation a permis de restaurer la conduction axonale. Cette étude offre donc une nouvelle perspective thérapeutique dans les lésions

démyélinisantes de la moelle épinière, incluant la SEP et la NMO. Comme les cellules épendymaires expriment l'AQP4, il serait d'autant plus important d'étudier les effets des IgG-NMO sur les fonctions des cellules épendymaires de la moelle épinière avant d'envisager cette perspective. En comparaison, cette capacité des cellules épendymaires à fournir des OPC ne semble pas être possible dans le cerveau (MacDonald et al., 2021). Cette stratégie thérapeutique ne pourrait donc pas s'appliquer pour les lésions démyélinisantes du cerveau.

iii. Effets pathogènes d'autoanticorps dans le contexte d'autres pathologies auto-immunes du SNC : exemple de la SEP

Ma thèse montre que l'épendyme est sensible aux IgG-NMO présentes dans le LCS qui peuvent induire des altérations fonctionnelles de celui-ci et suggère une implication dans les atteintes lésionnelles dans l'espace périventriculaire des patients. Cette étude ouvre la voie vers d'autres pathologies où des autoanticorps sont présents dans le LCS. Par exemple, la SEP est caractérisée par la présence d'IgG dans le LCS mais leur rôle pathologique est peu étudié. Récemment, des autoanticorps dirigés contre la protéine EBNA1 du virus de l'EBV pouvant cibler un antigène de surface glial nommé GlialCAM par mimétisme moléculaire ont été découverts (Lanz et al., 2022). GlialCAM est exprimée par les cellules épendymaires (données RNAseq et (Favre-Kontula et al., 2008)) et donc l'épendyme pourrait être la cible de ces autoanticorps cross-réactifs présents dans la SEP. Les patients SEP présentent également des atteintes périventriculaires visibles à l'IRM (Haider et al., 2014) et donc ces autoanticorps, en ciblant l'épendyme, pourraient participer à la formation de ces lésions.

iv. Stratégies thérapeutiques visant l'épendyme et l'espace périventriculaire

Des stratégies thérapeutiques visant l'épendyme ou les zones périventriculaires existent. Pour cibler les zones périventriculaires, l'idéal est de délivrer les molécules thérapeutiques directement dans les ventricules latéraux pour que les molécules circulent dans tout le système ventriculaire. Comme le LCS est renouvelé environ toutes les 5-6 heures, il faudrait des injections répétées ou une diffusion chronique. Le réservoir Ommaya est un réservoir sous-cutané relié à un cathéter implanté dans les ventricules cérébraux pouvant être utilisé pour de telles stratégies (Ommaya, 1963). Pour cibler directement les cellules épendymaires, des thérapies géniques sont envisagées par ciblage des cellules épendymaires par des vecteurs

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

viraux (Yamazaki et al., 2014). Dans cette étude, l'idée était de faire produire une enzyme par les cellules épendymaires pour rétablir des désordres métaboliques via le LCS. Appliqué à la NMO ou la SEP, on peut imaginer que ce système puisse être également utilisé pour réguler le système immunitaire, augmenter les propriétés de barrière de l'épendyme ou la capacité des cellules épendymaires à produire des OPC dans la moelle épinière pour des stratégies de remyélinisation.

Bibliographie

Alfaro-Cervello, C., Soriano-Navarro, M., Mirzadeh, Z., Alvarez-Buylla, A., and Garcia-Verdugo, J.M. (2012). Biciliated ependymal cell proliferation contributes to spinal cord growth. *J Comp Neurol* 520, 3528–3552. <https://doi.org/10.1002/cne.23104>.

Alfaro-Cervello, C., Cebrian-Silla, A., Soriano-Navarro, M., Garcia-Tarraga, P., Matías-Guiu, J., Gomez-Pinedo, U., Molina Aguilar, P., Alvarez-Buylla, A., Luquin, M.-R., and Garcia-Verdugo, J.M. (2014). The adult macaque spinal cord central canal zone contains proliferative cells and closely resembles the human. *J. Comp. Neurol.* 522, 1800–1817. <https://doi.org/10.1002/cne.23501>.

Alpár, A., Zahola, P., Hanics, J., Hevesi, Z., Korchynska, S., Benevento, M., Pifl, C., Zachar, G., Perugini, J., Severi, I., et al. (2018). Hypothalamic CNTF volume transmission shapes cortical noradrenergic excitability upon acute stress. *The EMBO Journal* 37, e100087. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100087>.

Alpár, A., Benevento, M., Romanov, R.A., Hökfelt, T., and Harkany, T. (2019). Hypothalamic cell diversity: non-neuronal codes for long-distance volume transmission by neuropeptides. *Current Opinion in Neurobiology* 56, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.10.012>.

Alvarez, J.I., and Teale, J.M. (2007). Differential changes in junctional complex proteins suggest the ependymal lining as the main source of leukocyte infiltration into ventricles in murine neurocysticercosis. *Journal of Neuroimmunology* 187, 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.05.005>.

Alvarez, E., Piccio, L., Mikesell, R.J., Klawiter, E.C., Parks, B.J., Naismith, R.T., and Cross, A.H. (2013). CXCL13 is a biomarker of inflammation in multiple sclerosis, neuromyelitis optica, and other neurological conditions. *Mult Scler* 19, 1204–1208. <https://doi.org/10.1177/1352458512473362>.

Amiry-Moghaddam, M., and Ottersen, O.P. (2003). The molecular basis of water transport in the brain. *Nature Reviews Neuroscience* 4, 991–1001. <https://doi.org/10.1038/nrn1252>.

Amiry-Moghaddam, M., Otsuka, T., Hurn, P.D., Traystman, R.J., Haug, F.-M., Froehner, S.C., Adams, M.E., Neely, J.D., Agre, P., Ottersen, O.P., et al. (2003). An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2106–2111. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437946100>.

Bibliographie

Apiwattanakul, M., Popescu, B.F., Matiello, M., Weinshenker, B.G., Lucchinetti, C.F., Lennon, V.A., McKeon, A., Carpenter, A.F., Miller, G.M., and Pittock, S.J. (2010). Intractable vomiting as the initial presentation of neuromyelitis optica. *Ann Neurol* 68, 757–761. <https://doi.org/10.1002/ana.22121>.

Asada-Kubota, M., Ueda, T., Nakashima, T., Kobayashi, M., Shimada, M., Takeda, K., Hamada, K., Maekawa, S., and Sokawa, Y. (1997). Localization of 2',5'-oligoadenylate synthetase and the enhancement of its activity with recombinant interferon-alpha A/D in the mouse brain. *Anat. Embryol.* 195, 251–257. <https://doi.org/10.1007/s004290050044>.

Asavapanumas, N., and Verkman, A.S. (2014). Neuromyelitis optica pathology in rats following intraperitoneal injection of NMO-IgG and intracerebral needle injury. *Acta Neuropathol Commun* 2, 48. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-48>.

Asavapanumas, N., Ratelade, J., and Verkman, A.S. (2014a). Unique neuromyelitis optica pathology produced in naïve rats by intracerebral administration of NMO-IgG. *Acta Neuropathol* 127, 539–551. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1204-8>.

Asavapanumas, N., Ratelade, J., Papadopoulos, M.C., Bennett, J.L., Levin, M.H., and Verkman, A.S. (2014b). Experimental mouse model of optic neuritis with inflammatory demyelination produced by passive transfer of neuromyelitis optica-immunoglobulin G. *J Neuroinflammation* 11, 16. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-16>.

Asgari, N., Khorrooshi, R., Lillevang, S.T., and Owens, T. (2013). Complement-dependent pathogenicity of brain-specific antibodies in cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroimmunology* 254, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.09.010>.

Asgari, N., Berg, C.T., Mørch, M.T., Khorrooshi, R., and Owens, T. (2015). Cerebrospinal fluid aquaporin-4-immunoglobulin G disrupts blood brain barrier. *Ann Clin Transl Neurol* 2, 857–863. <https://doi.org/10.1002/acn3.221>.

Aykac, A., and Sehirli, A.Ö. (2021). The Function and Expression of ATP-Binding Cassette Transporters Proteins in the Alzheimer's Disease. *Glob Med Genet* 8, 149–155. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1735541>.

Azim, K., Berninger, B., and Raineteau, O. (2016). Mosaic Subventricular Origins of Forebrain Oligodendrogenesis. *Frontiers in Neuroscience* 10, 107. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00107>.

- Bai, F., Hu, N., Yang, R., Qu, L.-Y., Ma, S., Huang, J., Wang, J.-H., Yang, B.-F., and Li, C.-L. (2022). Tongmai granules improve rat hippocampal injury by regulating TLR4/MyD88/AP-1 signaling pathway. *J Ethnopharmacol* 285, 114874. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114874>.
- Baker, K., and Beales, P.L. (2009). Making sense of cilia in disease: The human ciliopathies. *Am. J. Med. Genet. 151C*, 281–295. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30231>.
- Banker, P., Sonni, S., Kister, I., Loh, J.P., and Lui, Y.W. (2012). Pencil-thin ependymal enhancement in neuromyelitis optica spectrum disorders. *Multiple Sclerosis Journal* 18, 1050–1053. <https://doi.org/10.1177/1352458511431730>.
- Bartanusz, V., Jezova, D., Alajajian, B., and Digicaylioglu, M. (2011). The blood-spinal cord barrier: morphology and clinical implications. *Ann Neurol* 70, 194–206. <https://doi.org/10.1002/ana.22421>.
- Beckervordersandforth, R., and Rolando, C. (2020). Untangling human neurogenesis to understand and counteract brain disorders. *Current Opinion in Pharmacology* 50, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.12.002>.
- Bedussi, B., van Lier, M.G.J.T.B., Bartstra, J.W., de Vos, J., Siebes, M., VanBavel, E., and Bakker, E.N.T.P. (2015). Clearance from the mouse brain by convection of interstitial fluid towards the ventricular system. *Fluids Barriers CNS* 12, 23. <https://doi.org/10.1186/s12987-015-0019-5>.
- Bejerot, S., Hesselmark, E., Mobarrez, F., Wallén, H., Hietala, M.A., Nybom, R., and Wetterberg, L. (2019). Neuromyelitis optica spectrum disorder with increased aquaporin-4 microparticles prior to autoantibodies in cerebrospinal fluid: a case report. *J Med Case Reports* 13, 27. <https://doi.org/10.1186/s13256-018-1929-z>.
- Belenguer, G., Duart-Abadia, P., Domingo-Muelas, A., Morante-Redolat, J.M., and Fariñas, I. (2021a). Cell population analysis of the adult murine subependymal neurogenic lineage by flow cytometry. *STAR Protocols* 2, 100425. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100425>.
- Belenguer, G., Duart-Abadia, P., Jordán-Pla, A., Domingo-Muelas, A., Blasco-Chamarro, L., Ferrón, S.R., Morante-Redolat, J.M., and Fariñas, I. (2021b). Adult Neural Stem Cells Are Alerted by Systemic Inflammation through TNF- α Receptor Signaling. *Cell Stem Cell* 28, 285-299.e9. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.10.016>.
- Belmadani, A., Tran, P.B., Ren, D., and Miller, R.J. (2006). Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation. *J. Neurosci.* 26, 3182–3191. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0156-06.2006>.

Bibliographie

- Benner, E.J., Luciano, D., Jo, R., Abdi, K., Paez-Gonzalez, P., Sheng, H., Warner, D.S., Liu, C., Eroglu, C., and Kuo, C.T. (2013). Protective astrogenesis from the SVZ niche after injury is controlled by Notch modulator Thbs4. *Nature* 497, 369–373. <https://doi.org/10.1038/nature12069>.
- Bennett, J.L., Lam, C., Kalluri, S.R., Saikali, P., Bautista, K., Dupree, C., Glogowska, M., Case, D., Antel, J.P., Owens, G.P., et al. (2009). Intrathecal pathogenic anti-aquaporin-4 antibodies in early neuromyelitis optica. *Ann Neurol* 66, 617–629. <https://doi.org/10.1002/ana.21802>.
- Bernstock, J., Verheyen, J., Huang, B., Hallenbeck, J., and Pluchino, S. (2014). Typical and Atypical Stem Cell Niches of the Adult Nervous System in Health and Inflammatory Brain and Spinal Cord Diseases. In *Adult Stem Cell Niches*, S. Wislet-Gendebien, ed. (InTech), p.
- Blacque, O.E., Cevik, S., and Kaplan, O.I. (2008). Intraflagellar transport: from molecular characterisation to mechanism. *Front Biosci* 13, 2633–2652. <https://doi.org/10.2741/2871>.
- Blanco, Y., Ercilla-González, G., Llufríu, S., Casanova-Estruch, B., Magraner, M.J., Ramió-Torrentá, L., Mendibe-Bilbao, M.M., Uclés-Sánchez, A.J., Casado-Chocán, J.L., López de Munain, A., et al. (2011). [HLA-DRB1 typing in Caucasians patients with neuromyelitis optica]. *Rev Neurol* 53, 146–152. .
- Borsini, A., Zunszain, P.A., Thuret, S., and Pariante, C.M. (2015). The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. *Trends in Neurosciences* 38, 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.12.006>.
- Bosch Grau, M., Gonzalez Curto, G., Rocha, C., Magiera, M.M., Marques Sousa, P., Giordano, T., Spassky, N., and Janke, C. (2013). Tubulin glycolases and glutamylases have distinct functions in stabilization and motility of ependymal cilia. *J Cell Biol* 202, 441–451. <https://doi.org/10.1083/jcb.201305041>.
- Boutin, C., Labedan, P., Dimidschstein, J., Richard, F., Cremer, H., Andre, P., Yang, Y., Montcouquiol, M., Goffinet, A.M., and Tissir, F. (2014). A dual role for planar cell polarity genes in ciliated cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, E3129–E3138. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404988111>.
- Brightman, M.W. (1965). The distribution within the brain of ferritin injected into cerebrospinal fluid compartments. I. Ependymal distribution. *J Cell Biol* 26, 99–123. <https://doi.org/10.1083/jcb.26.1.99>.

- Brimberg, L., Mader, S., Fujieda, Y., Arinuma, Y., Kowal, C., Volpe, B.T., and Diamond, B. (2015). Antibodies as Mediators of Brain Pathology. *Trends in Immunology* 36, 709–724. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.09.008>.
- Brooks, E.R., and Wallingford, J.B. (2014). Multiciliated Cells. *Current Biology* 24, R973–R982. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.047>.
- Brousse, B., Magalon, K., Durbec, P., and Cayre, M. (2015). Region and dynamic specificities of adult neural stem cells and oligodendrocyte precursors in myelin regeneration in the mouse brain. *Biol Open* 4, 980–992. <https://doi.org/10.1242/bio.012773>.
- Bruzzone, R., White, T.W., and Paul, D.L. (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* 238, 1–27. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0001q.x>.
- Butovsky, O., Ziv, Y., Schwartz, A., Landa, G., Talpalar, A.E., Pluchino, S., Martino, G., and Schwartz, M. (2006). Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.10.006>.
- Campbell, J.N., Macosko, E.Z., Fenselau, H., Pers, T.H., Lyubetskaya, A., Tenen, D., Goldman, M., Verstegen, A.M.J., Resch, J.M., McCarroll, S.A., et al. (2017). A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. *Nat. Neurosci.* 20, 484–496. <https://doi.org/10.1038/nn.4495>.
- Canova, C., Neal, J.W., and Gasque, P. (2006). Expression of innate immune complement regulators on brain epithelial cells during human bacterial meningitis. *J Neuroinflammation* 3, 22. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-3-22>.
- Casaca-Carreira, J., Temel, Y., Heschem, S.-A., and Jahanshahi, A. (2018). Transependymal Cerebrospinal Fluid Flow: Opportunity for Drug Delivery? *Molecular Neurobiology* 55, 2780–2788. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0501-y>.
- Castañeyra-Ruiz, L., González-Marrero, I., Castañeyra-Ruiz, A., González-Toledo, J.M., Castañeyra-Ruiz, M., Perez-Molto, F.J., Carmona-Calero, E.M., and Castañeyra-Perdomo, A. (2014). The Neuroepithelium Disruption Could Generate Autoantibodies against AQP4 and Cause Neuromyelitis Optica and Hydrocephalus. *Int Sch Res Notices* 2014, 580572. <https://doi.org/10.1155/2014/580572>.

Bibliographie

- Cate, H.S., Sabo, J.K., Merlo, D., Kemper, D., Aumann, T.D., Robinson, J., Merson, T.D., Emery, B., Perreau, V.M., and Kilpatrick, T.J. (2010). Modulation of bone morphogenic protein signalling alters numbers of astrocytes and oligodendroglia in the subventricular zone during cuprizone-induced demyelination. *J. Neurochem.* *115*, 11–22. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06660.x>.
- Chakravarty, S., and Herkenham, M. (2005). Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *J. Neurosci.* *25*, 1788–1796. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4268-04.2005>.
- Chen, R., Wu, X., Jiang, L., and Zhang, Y. (2017). Single-Cell RNA-Seq Reveals Hypothalamic Cell Diversity. *Cell Rep* *18*, 3227–3241. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.004>.
- Chen, T., Bosco, D.B., Ying, Y., Tian, D.-S., and Wu, L.-J. (2021). The Emerging Role of Microglia in Neuromyelitis Optica. *Front Immunol* *12*, 616301. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.616301>.
- Chen, Y., McNeill, J.R., Hajek, I., and Hertz, L. (1992). Effect of vasopressin on brain swelling at the cellular level: do astrocytes exhibit a furosemide--vasopressin-sensitive mechanism for volume regulation? *Can J Physiol Pharmacol* *70 Suppl*, S367-373. <https://doi.org/10.1139/y92-285>.
- Chi, L., Ke, Y., Luo, C., Li, B., Gozal, D., Kalyanaraman, B., and Liu, R. (2006). Motor Neuron Degeneration Promotes Neural Progenitor Cell Proliferation, Migration, and Neurogenesis in the Spinal Cords of Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice. *STEM CELLS* *24*, 34–43. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0076>.
- Chien, Y.-H., Werner, M.E., Stubbs, J., Joens, M.S., Li, J., Chien, S., Fitzpatrick, J.A.J., Mitchell, B.J., and Kintner, C. (2013). Bbofl1 is required to maintain cilia orientation. *Development* *140*, 3468–3477. <https://doi.org/10.1242/dev.096727>.
- Cho, E.B., Cho, H.-J., Choi, M., Seok, J.M., Shin, H.Y., Kim, B.J., and Min, J.-H. (2020). Low high-density lipoprotein cholesterol and high triglycerides lipid profile in neuromyelitis optica spectrum disorder: Associations with disease activity and disability. *Mult Scler Relat Disord* *40*, 101981. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2020.101981>.
- Clardy, S.L., Lucchinetti, C.F., Krecke, K.N., Lennon, V.A., O’Toole, O., Weinshenker, B.G., Boyd, C.D., Krieger, S., McGraw, C., Guo, Y., et al. (2014). Hydrocephalus in neuromyelitis optica. *Neurology* *82*, 1841–1843. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000428>.
- Cobo-Calvo, Á., Sepúlveda, M., Bernard-Valnet, R., Ruiz, A., Brassat, D., Martínez-Yélamos, S., Saiz, A., and Marignier, R. (2016). Antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in aquaporin 4

antibody seronegative longitudinally extensive transverse myelitis: Clinical and prognostic implications. *Mult. Scler.* 22, 312–319. <https://doi.org/10.1177/1352458515591071>.

Cobo-Calvo, A., Ruiz, A., Richard, C., Blondel, S., Cavagna, S., Strazielle, N., Ghersi-Egea, J.-F., Giraudon, P., and Marignier, R. (2020). Purified IgG from aquaporin-4 neuromyelitis optica spectrum disorder patients alters blood-brain barrier permeability. *PLoS ONE* 15, e0238301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238301>.

Colak, D., Mori, T., Brill, M.S., Pfeifer, A., Falk, S., Deng, C., Monteiro, R., Mummery, C., Sommer, L., and Götz, M. (2008). Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenic protein signaling in stem cells. *J. Neurosci.* 28, 434–446. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4374-07.2008>.

Conductier, G., Brau, F., Viola, A., Langlet, F., Ramkumar, N., Dehouck, B., Lemaire, T., Chapot, R., Lucas, L., Rovère, C., et al. (2013). Melanin-concentrating hormone regulates beat frequency of ependymal cilia and ventricular volume. *Nat. Neurosci.* 16, 845–847. <https://doi.org/10.1038/nn.3401>.

Cornaby, C., Gibbons, L., Mayhew, V., Sloan, C.S., Welling, A., and Poole, B.D. (2015). B cell epitope spreading: mechanisms and contribution to autoimmune diseases. *Immunol Lett* 163, 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.11.001>.

Cousins, O., Hodges, A., Schubert, J., Veronese, M., Turkheimer, F., Miyan, J., Engelhardt, B., and Roncaroli, F. (2021). The Blood-CSF-Brain Route of Neurological Disease: The Indirect Pathway into the Brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* <https://doi.org/10.1111/nan.12789>.

Cree, B.A.C., Spencer, C.M., Varrin-Doyer, M., Baranzini, S.E., and Zamvil, S.S. (2016). Gut microbiome analysis in neuromyelitis optica reveals overabundance of *Clostridium perfringens*. *Annals of Neurology* 80, 443–447. <https://doi.org/10.1002/ana.24718>.

Cronin, M., Anderson, P.N., Cook, J.E., Green, C.R., and Becker, D.L. (2008). Blocking connexin43 expression reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *Mol. Cell. Neurosci.* 39, 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.06.005>.

Danilov, A.I., Covacu, R., Moe, M.C., Langmoen, I.A., Johansson, C.B., Olsson, T., and Brundin, L. (2006). Neurogenesis in the adult spinal cord in an experimental model of multiple sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* 23, 394–400. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04563.x>.

De Bellis, M., Pisani, F., Mola, M.G., Rosito, S., Simone, L., Buccoliero, C., Trojano, M., Nicchia, G.P., Svelto, M., and Frigeri, A. (2017). Translational readthrough generates new astrocyte AQP4 isoforms

Bibliographie

that modulate supramolecular clustering, glial endfeet localization, and water transport: DE BELLIS et al. *Glia* 65, 790–803. <https://doi.org/10.1002/glia.23126>.

Deffner, F., Gleiser, C., Mattheus, U., Wagner, A., Neckel, P.H., Fallier-Becker, P., Hirt, B., and Mack, A.F. (2022). Aquaporin-4 expression in the human choroid plexus. *Cell Mol Life Sci* 79, 90. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04136-1>.

Del Bigio, M.R. (1995). The ependyma: A protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia* 14, 1–13. <https://doi.org/10.1002/glia.440140102>.

Del Bigio, M.R. (2010). Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathologica* 119, 55–73. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0624-y>.

Del Carmen Gómez-Roldán, M., Pérez-Martín, M., Capilla-González, V., Cifuentes, M., Pérez, J., García-Verdugo, J.M., and Fernández-Llebrez, P. (2008). Neuroblast proliferation on the surface of the adult rat striatal wall after focal ependymal loss by intracerebroventricular injection of neuraminidase. *J. Comp. Neurol.* 507, 1571–1587. <https://doi.org/10.1002/cne.21618>.

Delgado, A.C., Maldonado-Soto, A.R., Silva-Vargas, V., Mizrak, D., Känel, T. von, Tan, K.R., Paul, A., Madar, A., Cuervo, H., Kitajewski, J., et al. (2021). Release of stem cells from quiescence reveals gliogenic domains in the adult mouse brain. *Science* 372, 1205–1209. <https://doi.org/10.1126/science.abg8467>.

Delgehr, N., Meunier, A., Faucourt, M., Bosch Grau, M., Strehl, L., Janke, C., and Spassky, N. (2015). Ependymal cell differentiation, from monociliated to multiciliated cells. In *Methods in Cell Biology*, (Elsevier), pp. 19–35.

Delhaye, S., Paul, S., Blakqori, G., Minet, M., Weber, F., Staeheli, P., and Michiels, T. (2006). Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 7835–7840. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602460103>.

Desai, B., Hsu, Y., Schneller, B., Hobbs, J.G., Mehta, A.I., and Linninger, A. (2016). Hydrocephalus: the role of cerebral aquaporin-4 channels and computational modeling considerations of cerebrospinal fluid. *Neurosurg Focus* 41, E8. <https://doi.org/10.3171/2016.7.FOCUS16191>.

Devenport, D. (2014). The cell biology of planar cell polarity. *The Journal of Cell Biology* 207, 171–179. <https://doi.org/10.1083/jcb.201408039>.

Devic, E. (1895). Myélite aiguë dorso-lombaire avec névrite optique - Autopsie (Congrès français de médecine (Première Session; Lyon, 1894; procès-verbaux, mémoires et discussions; publiés par M. le Dr L. Bard)).

Diamond, B., Huerta, P.T., Mina-Osorio, P., Kowal, C., and Volpe, B.T. (2009). Losing your nerves? Maybe it's the antibodies. *Nat Rev Immunol* 9, 449–456. <https://doi.org/10.1038/nri2529>.

Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell* 97, 703–716. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80783-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80783-7).

Donega, V., Burm, S.M., van Strien, M.E., van Bodegraven, E.J., Paliukhovich, I., Geut, H., van de Berg, W.D.J., Li, K.W., Smit, A.B., Basak, O., et al. (2019). Transcriptome and proteome profiling of neural stem cells from the human subventricular zone in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun* 7, 84. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0736-0>.

Dray, N., Mancini, L., Binshtok, U., Cheysson, F., Supatto, W., Mahou, P., Bedu, S., Ortica, S., Than-Trong, E., Krecsmarik, M., et al. (2021). Dynamic spatiotemporal coordination of neural stem cell fate decisions occurs through local feedback in the adult vertebrate brain. *Cell Stem Cell* 28, 1457-1472.e12. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.03.014>.

Duan, T., and Verkman, A.S. (2020). Experimental animal models of aquaporin-4-IgG-seropositive neuromyelitis optica spectrum disorders: progress and shortcomings. *Brain Pathol* 30, 13–25. <https://doi.org/10.1111/bpa.12793>.

Duan, T., Smith, A.J., and Verkman, A.S. (2018). Complement-dependent bystander injury to neurons in AQP4-IgG seropositive neuromyelitis optica. *J Neuroinflammation* 15, 294. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1333-z>.

Duan, T., Smith, A.J., and Verkman, A.S. (2019). Complement-independent bystander injury in AQP4-IgG seropositive neuromyelitis optica produced by antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Acta Neuropathol Commun* 7, 112. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0766-7>.

Ducloyer, J.-B., Marignier, R., Wiertlewski, S., and Lebranchu, P. (2021). Optic neuritis classification in 2021. *Eur J Ophthalmol* 11206721211028050. <https://doi.org/10.1177/11206721211028050>.

Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., and Frisén, J. (2014). Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 156, 1072–1083. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.044>.

Bibliographie

- Estrada, K., Whelan, C.W., Zhao, F., Bronson, P., Handsaker, R.E., Sun, C., Carulli, J.P., Harris, T., Ransohoff, R.M., McCarroll, S.A., et al. (2018). A whole-genome sequence study identifies genetic risk factors for neuromyelitis optica. *Nat Commun* 9, 1929. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04332-3>.
- Fabbiani, G., Reali, C., Valentín-Kahan, A., Rehmann, M.I., Fagetti, J., Falco, M.V., and Russo, R.E. (2020). Connexin Signaling Is Involved in the Reactivation of a Latent Stem Cell Niche after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* 40, 2246–2258. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2056-19.2020>.
- Fadaee-Shohada, M.J., Hirst, R.A., Rutman, A., Roberts, I.S., O’Callaghan, C., and Andrew, P.W. (2010). The Behaviour of Both *Listeria monocytogenes* and Rat Ciliated Ependymal Cells Is Altered during Their Co-Culture. *PLoS ONE* 5, e10450. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010450>.
- Fame, R.M., and Lehtinen, M.K. (2019). Sister, Sister: Ependymal Cells and Adult Neural Stem Cells Are Separated at Birth by Geminin Family Members. *Neuron* 102, 278–279. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.040>.
- Faubel, R., Westendorf, C., Bodenschatz, E., and Eichele, G. (2016). Cilia-based flow network in the brain ventricles. *Science* 353, 176–178. <https://doi.org/10.1126/science.aae0450>.
- Favre-Kontula, L., Rolland, A., Bernasconi, L., Karmirantzou, M., Power, C., Antonsson, B., and Boschert, U. (2008). GlialCAM, an immunoglobulin-like cell adhesion molecule is expressed in glial cells of the central nervous system. *Glia* 56, 633–645. <https://doi.org/10.1002/glia.20640>.
- Feng, X., Papadopoulos, M.C., Liu, J., Li, L., Zhang, D., Zhang, H., Verkman, A.S., and Ma, T. (2009). Sporadic obstructive hydrocephalus in *Aqp4* null mice. *J. Neurosci. Res.* 87, 1150–1155. <https://doi.org/10.1002/jnr.21927>.
- Fernández-Arjona, M.D.M., León-Rodríguez, A., López-Ávalos, M.D., and Grondona, J.M. (2021). Microglia activated by microbial neuraminidase contributes to ependymal cell death. *Fluids Barriers CNS* 18, 15. <https://doi.org/10.1186/s12987-021-00249-0>.
- Fiorelli, R., Azim, K., Fischer, B., and Raineteau, O. (2015). Adding a spatial dimension to postnatal ventricular-subventricular zone neurogenesis. *Development* 142, 2109–2120. <https://doi.org/10.1242/dev.119966>.
- Fliegau, M., Benzing, T., and Omran, H. (2007). When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 880–893. <https://doi.org/10.1038/nrm2278>.

- Forest-Nault, C., Gaudreault, J., Henry, O., Durocher, Y., and De Crescenzo, G. (2021). On the Use of Surface Plasmon Resonance Biosensing to Understand IgG-FcγR Interactions. *Int J Mol Sci* 22, 6616. <https://doi.org/10.3390/ijms22126616>.
- Freitas, A.S., Xavier, A.L.R., Furtado, C.M., Hedin-Pereira, C., Fróes, M.M., and Menezes, J.R.L. (2012). Dye coupling and connexin expression by cortical radial glia in the early postnatal subventricular zone. *Devel Neurobio* 72, 1482–1497. <https://doi.org/10.1002/dneu.22005>.
- Fujihara, K., Misu, T., Nakashima, I., Takahashi, T., Bradl, M., Lassmann, H., Takano, R., Nishiyama, S., Takai, Y., Suzuki, C., et al. (2012). Neuromyelitis optica should be classified as an astrocytopathic disease rather than a demyelinating disease. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 3, 58–73. <https://doi.org/10.1111/j.1759-1961.2012.00030.x>.
- Fujita, A., Inanobe, A., Hibino, H., Nielsen, S., Ottersen, O.P., and Kurachi, Y. (2015). Clustering of Kir4.1 at specialized compartments of the lateral membrane in ependymal cells of rat brain. *Cell Tissue Res* 359, 627–634. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-2030-6>.
- Fuller, J.P., Stavenhagen, J.B., and Teeling, J.L. (2014). New roles for Fc receptors in neurodegeneration-the impact on Immunotherapy for Alzheimer’s Disease. *Front Neurosci* 8, 235. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00235>.
- Gajera, C.R., Emich, H., Lioubinski, O., Christ, A., Beckervordersandforth-Bonk, R., Yoshikawa, K., Bachmann, S., Christensen, E.I., Götz, M., Kempermann, G., et al. (2010). LRP2 in ependymal cells regulates BMP signaling in the adult neurogenic niche. *J. Cell. Sci.* 123, 1922–1930. <https://doi.org/10.1242/jcs.065912>.
- Gault, F. (1894). *De la neuromyéélite optique aiguë* (Thèse : Faculté de Médecine et de Pharmacie).
- Geis, C., Ritter, C., Ruschil, C., Weishaupt, A., Grünewald, B., Stoll, G., Holmoy, T., Misu, T., Fujihara, K., Hemmer, B., et al. (2015). The intrinsic pathogenic role of autoantibodies to aquaporin 4 mediating spinal cord disease in a rat passive-transfer model. *Exp Neurol* 265, 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.12.015>.
- Gheber, L., Priel, Z., Aflalo, C., and Shoshan-Barmatz, V. (1995). Extracellular ATP binding proteins as potential receptors in mucociliary epithelium: characterization using [32P]3’-O-(4-benzoyl)benzoyl ATP, a photoaffinity label. *J. Membr. Biol.* 147, 83–93. .

Bibliographie

- Gleiser, C., Wagner, A., Fallier-Becker, P., Wolburg, H., Hirt, B., and Mack, A.F. (2016). Aquaporin-4 in Astroglial Cells in the CNS and Supporting Cells of Sensory Organs-A Comparative Perspective. *Int J Mol Sci* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17091411>.
- Gómez-Pinedo, U., García-Ávila, Y., Gallego-Villarejo, L., Matías-Guiu, J.A., Benito-Martín, M.S., Esteban-García, N., Sanclemente-Alamán, I., Pytel, V., Moreno-Jiménez, L., Sancho-Bielsa, F., et al. (2021). Sera from Patients with NMOSD Reduce the Differentiation Capacity of Precursor Cells in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci* 22, 5192. <https://doi.org/10.3390/ijms22105192>.
- Gong, J., Qiu, W., Zeng, Q., Liu, X., Sun, X., Li, H., Yang, Y., Wu, A., Bao, J., Wang, Y., et al. (2019). Lack of short-chain fatty acids and overgrowth of opportunistic pathogens define dysbiosis of neuromyelitis optica spectrum disorders: A Chinese pilot study. *Mult. Scler.* 25, 1316–1325. <https://doi.org/10.1177/1352458518790396>.
- Gonzalez-Santander, R. (1979). Electron-microscopic study of the secretion of the ependymal cells in the domestic cat (ependymin-beta cells). *Acta Anat (Basel)* 103, 266–277. .
- Grondona, J.M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P., and López-Ávalos, M.D. (2013). A simple method to obtain pure cultures of multiciliated ependymal cells from adult rodents. *Histochemistry and Cell Biology* 139, 205–220. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-1008-2>.
- Guirao, B., Meunier, A., Mortaud, S., Aguilar, A., Corsi, J.-M., Strehl, L., Hirota, Y., Desoeuvre, A., Boutin, C., Han, Y.-G., et al. (2010). Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia. *Nature Cell Biology* 12, 341–350. <https://doi.org/10.1038/ncb2040>.
- Guo, J., Mi, X., Zhan, R., Li, M., Wei, L., and Sun, J. (2018). Aquaporin 4 Silencing Aggravates Hydrocephalus Induced by Injection of Autologous Blood in Rats. *Med. Sci. Monit.* 24, 4204–4212. <https://doi.org/10.12659/MSM.906936>.
- Guo, Y., Weigand, S.D., Popescu, B.F., Lennon, V.A., Parisi, J.E., Pittock, S.J., Parks, N.E., Clardy, S.L., Howe, C.L., and Lucchinetti, C.F. (2017). Pathogenic implications of cerebrospinal fluid barrier pathology in neuromyelitis optica. *Acta Neuropathologica* 133, 597–612. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1682-1>.
- Haider, L., Simeonidou, C., Steinberger, G., Hametner, S., Grigoriadis, N., Deretzi, G., Kovacs, G.G., Kutzelnigg, A., Lassmann, H., and Frischer, J.M. (2014). Multiple sclerosis deep grey matter: the relation between demyelination, neurodegeneration, inflammation and iron. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85, 1386–1395. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-307712>.

Hammoud, D.A., Mahdi, E., Panackal, A.A., Wakim, P., Sheikh, V., Sereti, I., Bielakova, B., Bennett, J.E., and Williamson, P.R. (2017). Choroid Plexitis and Ependymitis by Magnetic Resonance Imaging are Biomarkers of Neuronal Damage and Inflammation in HIV-negative Cryptococcal Meningoencephalitis. *Sci Rep* 7, 9184. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09694-0>.

Healy, L.M., Stratton, J.A., Kuhlmann, T., and Antel, J. (2022). The role of glial cells in multiple sclerosis disease progression. *Nat Rev Neurol* 18, 237–248. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00624-x>.

Heinrich Martin, F., Ricardo Seoane, J., and Baile, C.A. (1973). Feeding in satiated sheep elicited by intraventricular injections of CSF from fasted sheep. *Life Sciences* 13, 177–184. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(73\)90193-8](https://doi.org/10.1016/0024-3205(73)90193-8).

Hinson, S.R., Romero, M.F., Popescu, B.F.G., Lucchinetti, C.F., Fryer, J.P., Wolburg, H., Fallier-Becker, P., Noell, S., and Lennon, V.A. (2012). Molecular outcomes of neuromyelitis optica (NMO)-IgG binding to aquaporin-4 in astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 1245–1250. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109980108>.

Hirota, Y., Meunier, A., Huang, S., Shimozawa, T., Yamada, O., Kida, Y.S., Inoue, M., Ito, T., Kato, H., Sakaguchi, M., et al. (2010). Planar polarity of multiciliated ependymal cells involves the anterior migration of basal bodies regulated by non-muscle myosin II. *Development* 137, 3037–3046. <https://doi.org/10.1242/dev.050120>.

Hirst, R.A., Rutman, A., Sikand, K., Andrew, P.W., Mitchell, T.J., and O’Callaghan, C. (2000a). Effect of Pneumolysin on Rat Brain Ciliary Function: Comparison of Brain Slices with Cultured Ependymal Cells. *Pediatric Research* 47, 381–384. <https://doi.org/10.1203/00006450-200003000-00016>.

Hirst, R.A., Sikand, K.S., Rutman, A., Mitchell, T.J., Andrew, P.W., and O’Callaghan, C. (2000b). Relative Roles of Pneumolysin and Hydrogen Peroxide from *Streptococcus pneumoniae* in Inhibition of Ependymal Ciliary Beat Frequency. *Infection and Immunity* 68, 1557–1562. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.3.1557-1562.2000>.

Hirst, R.A., Gosai, B., Rutman, A., Andrew, P.W., and O’Callaghan, C. (2003). *Streptococcus pneumoniae* damages the ciliated ependyma of the brain during meningitis. *Infect. Immun.* 71, 6095–6100. <https://doi.org/10.1128/iai.71.10.6095-6100.2003>.

Bibliographie

Hofman, P., Hoyng, P., vanderWerf, F., Vrensen, G.F., and Schlingemann, R.O. (2001). Lack of blood-brain barrier properties in microvessels of the prelaminar optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 895–901. .

den Hollander, A.I., Roepman, R., Koenekoop, R.K., and Cremers, F.P.M. (2008). Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res* 27, 391–419. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.05.003>.

Howe, C.L., Kaptzan, T., Magaña, S.M., Ayers-Ringler, J.R., LaFrance-Corey, R.G., and Lucchinetti, C.F. (2014). Neuromyelitis optica IgG stimulates an immunological response in rat astrocyte cultures. *Glia* 62, 692–708. <https://doi.org/10.1002/glia.22635>.

Ihrle, R.A., and Álvarez-Buylla, A. (2011). Lake-Front Property: A Unique Germinal Niche by the Lateral Ventricles of the Adult Brain. *Neuron* 70, 674–686. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.004>.

Iloff, J.J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B.A., Peng, W., Gundersen, G.A., Benveniste, H., Vates, G.E., Deane, R., Goldman, S.A., et al. (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med* 4, 147ra111. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748>.

Illes, S. (2017). More than a drainage fluid: the role of CSF in signaling in the brain and other effects on brain tissue. *Handb Clin Neurol* 146, 33–46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804279-3.00003-4>.

Iorio, R., Lucchinetti, C.F., Lennon, V.A., Costanzi, C., Hinson, S., Weinschenker, B.G., and Pittock, S.J. (2011). Syndrome of inappropriate antidiuresis may herald or accompany neuromyelitis optica. *Neurology* 77, 1644–1646. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182343377>.

Iorio, R., Fryer, J.P., Hinson, S.R., Fallier-Becker, P., Wolburg, H., Pittock, S.J., and Lennon, V.A. (2013). Astrocytic autoantibody of neuromyelitis optica (NMO-IgG) binds to aquaporin-4 extracellular loops, monomers, tetramers and high order arrays. *J. Autoimmun.* 40, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.07.008>.

Jablonska, B., Aguirre, A., Raymond, M., Szabo, G., Kitabatake, Y., Sailor, K.A., Ming, G.-L., Song, H., and Gallo, V. (2010). Chordin-induced lineage plasticity of adult SVZ neuroblasts after demyelination. *Nat. Neurosci.* 13, 541–550. <https://doi.org/10.1038/nn.2536>.

Jacquet, B.V., Salinas-Mondragon, R., Liang, H., Therit, B., Buie, J.D., Dykstra, M., Campbell, K., Ostrowski, L.E., Brody, S.L., and Ghoshghaei, 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. <https://doi.org/10.1242/dev.041129>.

Jarius, S., Franciotta, D., Paul, F., Ruprecht, K., Bergamaschi, R., Rommer, P.S., Reuss, R., Probst, C., Kristoferitsch, W., Wandinger, K.P., et al. (2010). Cerebrospinal fluid antibodies to aquaporin-4 in neuromyelitis optica and related disorders: frequency, origin, and diagnostic relevance. *J Neuroinflammation* 7, 52. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-52>.

Jarius, S., Wandinger, K.P., Platzner, S., and Wildemann, B. (2011). Homology between *Klebsiella pneumoniae* and human aquaporin-4: no evidence for cross-reactivity in neuromyelitis optica. A study on 114 patients. *J. Neurol.* 258, 929–931. <https://doi.org/10.1007/s00415-010-5839-2>.

Jarius, S., Paul, F., Weinshenker, B.G., Levy, M., Kim, H.J., and Wildemann, B. (2020). Neuromyelitis optica. *Nat Rev Dis Primers* 6, 85. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0214-9>.

Jessen, N.A., Munk, A.S.F., Lundgaard, I., and Nedergaard, M. (2015). The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem. Res.* 40, 2583–2599. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1581-6>.

Jiao, Q., Li, X., An, J., Zhang, Z., Chen, X., Tan, J., Zhang, P., Lu, H., and Liu, Y. (2017). Cell-Cell Connection Enhances Proliferation and Neuronal Differentiation of Rat Embryonic Neural Stem/Progenitor Cells. *Front. Cell. Neurosci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00200>.

Keegan, M., Pineda, A.A., McClelland, R.L., Darby, C.H., Rodriguez, M., and Weinshenker, B.G. (2002). Plasma exchange for severe attacks of CNS demyelination: predictors of response. *Neurology* 58, 143–146. <https://doi.org/10.1212/wnl.58.1.143>.

Kempeneers, C., Seaton, C., Garcia Espinosa, B., and Chilvers, M.A. (2019). Ciliary functional analysis: Beating a path towards standardization. *Pediatr Pulmonol* 54, 1627–1638. <https://doi.org/10.1002/ppul.24439>.

Khodosevich, K., Zuccotti, A., Kreuzberg, M.M., Le Magueresse, C., Frank, M., Willecke, K., and Monyer, H. (2012). Connexin45 modulates the proliferation of transit-amplifying precursor cells in the mouse subventricular zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 20107–20112. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217103109>.

Kidd, B.A., Ho, P.P., Sharpe, O., Zhao, X., Tomooka, B.H., Kanter, J.L., Steinman, L., and Robinson, W.H. (2008). Epitope spreading to citrullinated antigens in mouse models of autoimmune arthritis and demyelination. *Arthritis Res Ther* 10, R119. <https://doi.org/10.1186/ar2523>.

Bibliographie

- Kim, S.-M., Woodhall, M.R., Kim, J.-S., Kim, S.-J., Park, K.S., Vincent, A., Lee, K.-W., and Waters, P. (2015). Antibodies to MOG in adults with inflammatory demyelinating disease of the CNS. *Neuro Immunol Neuroinflamm* 2, e163. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000163>.
- Kim, W., Min Su Park, Sang Hyun Lee, Kim, S.-H., In Ja Jung, Takahashi, T., Misu, T., Fujihara, K., and Ho Jin Kim (2010). Characteristic brain magnetic resonance imaging abnormalities in central nervous system aquaporin-4 autoimmunity. *Multiple Sclerosis Journal* 16, 1229–1236. <https://doi.org/10.1177/1352458510376640>.
- Kimbrough, D.J., Fujihara, K., Jacob, A., Lana-Peixoto, M.A., Leite, M.I., Levy, M., Marignier, R., Nakashima, I., Palace, J., de Seze, J., et al. (2012). Treatment of Neuromyelitis Optica: Review and Recommendations. *Mult Scler Relat Disord* 1, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2012.06.002>.
- Kira, J. (2011). Autoimmunity in neuromyelitis optica and opticospinal multiple sclerosis: Astrocytopathy as a common denominator in demyelinating disorders. *Journal of the Neurological Sciences* 311, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.08.043>.
- Kitley, J., Woodhall, M., Waters, P., Leite, M.I., Devenney, E., Craig, J., Palace, J., and Vincent, A. (2012). Myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibodies in adults with a neuromyelitis optica phenotype. *Neurology* 79, 1273–1277. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31826aac4e>.
- Kofuji, P., and Newman, E.A. (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129, 1043–1054. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.008>.
- Koper, O.M., Kamińska, J., Grygorczuk, S., Zajkowska, J., and Kemon, H. (2018). CXCL9 concentrations in cerebrospinal fluid and serum of patients with tick-borne encephalitis. *Arch Med Sci* 14, 313–320. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58667>.
- Kovacs, G.G. (2018). Cellular reactions of the central nervous system. In *Handbook of Clinical Neurology*, (Elsevier), pp. 13–23.
- Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annual Review of Neuroscience* 32, 149–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600>.
- Kunzelmann, P., Schröder, W., Traub, O., Steinhäuser, C., Dermietzel, R., and Willecke, K. (1999). Late onset and increasing expression of the gap junction protein connexin30 in adult murine brain and long-term cultured astrocytes. *Glia* 25, 111–119. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1136\(19990115\)25:2<111::aid-glia2>3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1136(19990115)25:2<111::aid-glia2>3.0.co;2-i).

Kyrousi, C., Lygerou, Z., and Taraviras, S. (2017). How a radial glial cell decides to become a multiciliated ependymal cell. *Glia* 65, 1032–1042. <https://doi.org/10.1002/glia.23118>.

Lanz, T.V., Brewer, R.C., Ho, P.P., Moon, J.-S., Jude, K.M., Fernandez, D., Fernandes, R.A., Gomez, A.M., Nadj, G.-S., Bartley, C.M., et al. (2022). Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. *Nature* 603, 321–327. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04432-7>.

Lazarini, F., and Lledo, P.-M. (2011). Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends Neurosci.* 34, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.09.006>.

Lee, L. (2013). Riding the wave of ependymal cilia: genetic susceptibility to hydrocephalus in primary ciliary dyskinesia. *J. Neurosci. Res.* 91, 1117–1132. <https://doi.org/10.1002/jnr.23238>.

Lennon, V.A., Wingerchuk, D.M., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., Lucchinetti, C.F., Fujihara, K., Nakashima, I., and Weinshenker, B.G. (2004). A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *The Lancet* 364, 2106–2112. .

Lennon, V.A., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., Verkman, A.S., and Hinson, S.R. (2005). IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *The Journal of Experimental Medicine* 202, 473–477. <https://doi.org/10.1084/jem.20050304>.

Lewis, M., and Stracker, T.H. (2020). Transcriptional regulation of multiciliated cell differentiation. *Semin. Cell Dev. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.04.007>.

Li, X., Kong, H., Wu, W., Xiao, M., Sun, X., and Hu, G. (2009). Aquaporin-4 maintains ependymal integrity in adult mice. *Neuroscience* 162, 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.04.044>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.10.035>.

Lim, D.A., and Alvarez-Buylla, A. (2014). Adult neural stem cells stake their ground. *Trends in Neurosciences* 37, 563–571. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.08.006>.

Lim, D.A., Tramontin, A.D., Trevejo, J.M., Herrera, D.G., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28, 713–726. .

Lindemann, C.B., and Lesich, K.A. (2010). Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible. *Journal of Cell Science* 123, 519–528. <https://doi.org/10.1242/jcs.051326>.

Bibliographie

- Liu, T., Jin, X., Prasad, R.M., Sari, Y., and Nauli, S.M. (2014). Three types of ependymal cells with intracellular calcium oscillation are characterized by distinct cilia beating properties. *J. Neurosci. Res.* 92, 1199–1204. <https://doi.org/10.1002/jnr.23405>.
- Llorens-Bobadilla, E., Zhao, S., Baser, A., Saiz-Castro, G., Zwadlo, K., and Martin-Villalba, A. (2015). Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell* 17, 329–340. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.002>.
- Llorens-Bobadilla, E., Chell, J.M., Le Merre, P., Wu, Y., Zamboni, M., Bergenstr hle, J., Stenudd, M., Sopova, E., Lundeborg, J., Shupliakov, O., et al. (2020). A latent lineage potential in resident neural stem cells enables spinal cord repair. *Science* 370. <https://doi.org/10.1126/science.abb8795>.
- long, Y., Chen, M., Zhang, B., Gao, C., Zheng, Y., Xie, L., Gao, Q., and Yin, J. (2014). Brain gadolinium enhancement along the ventricular and leptomeningeal regions in patients with aquaporin-4 antibodies in cerebral spinal fluid. *Journal of Neuroimmunology* 269, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.02.006>.
- Lorencova, M., Mitro, A., Jurikova, M., Galfiova, P., Mikusova, R., Krivosikova, L., Janegova, A., Palkovic, M., and Polak, S. (2020). Ependymal cells surface of human third brain ventricle by scanning electron microscopy. *Bratisl Lek Listy* 121, 437–443. https://doi.org/10.4149/BLL_2020_071.
- Louveau, A., Plog, B.A., Antila, S., Alitalo, K., Nedergaard, M., and Kipnis, J. (2017). Understanding the functions and relationships of the glymphatic system and meningeal lymphatics. *J. Clin. Invest.* 127, 3210–3219. <https://doi.org/10.1172/JCI90603>.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
- Lu, D.C., Zhang, H., Zador, Z., and Verkman, A.S. (2008). Impaired olfaction in mice lacking aquaporin-4 water channels. *FASEB J* 22, 3216–3223. <https://doi.org/10.1096/fj.07-104836>.
- Lucchinetti, C.F., Guo, Y., Popescu, B.F.Gh., Fujihara, K., Itoyama, Y., and Misu, T. (2014). The Pathology of an Autoimmune Astrocytopathy: Lessons Learned from Neuromyelitis Optica: Autoimmune Astrocytopathy. *Brain Pathology* 24, 83–97. <https://doi.org/10.1111/bpa.12099>.
- Ma, Q., Ineichen, B.V., Detmar, M., and Proulx, S.T. (2017). Outflow of cerebrospinal fluid is predominantly through lymphatic vessels and is reduced in aged mice. *Nat Commun* 8, 1434. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01484-6>.

Macas, J., Nern, C., Plate, K.H., and Momma, S. (2006). Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. *J. Neurosci.* *26*, 13114–13119. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4667-06.2006>.

MacDonald, A., Lu, B., Caron, M., Caporicci-Dinucci, N., Hatrock, D., Petrecca, K., Bourque, G., and Stratton, J.A. (2021). Single Cell Transcriptomics of Ependymal Cells Across Age, Region and Species Reveals Cilia-Related and Metal Ion Regulatory Roles as Major Conserved Ependymal Cell Functions. *Front Cell Neurosci* *15*, 703951. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.703951>.

Mack, A., Neuhaus, J., and Wolburg, H. (1987). Relationship between orthogonal arrays of particles and tight junctions as demonstrated in cells of the ventricular wall of the rat brain. *Cell Tissue Res.* *248*, 619–625. <https://doi.org/10.1007/bf00216492>.

Mahuzier, A., Shihavuddin, A., Fournier, C., Lansade, P., Faucourt, M., Menezes, N., Meunier, A., Garfa-Traoré, M., Carlier, M.-F., Voituriez, R., et al. (2018). Ependymal cilia beating induces an actin network to protect centrioles against shear stress. *Nat Commun* *9*, 2279. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04676-w>.

von Maltzahn, J., Kreuzberg, M.M., Matern, G., Euwens, C., Höher, T., Wörsdörfer, P., and Willecke, K. (2009). C-terminal tagging with eGFP yields new insights into expression of connexin45 but prevents rescue of embryonic lethal connexin45-deficient mice. *European Journal of Cell Biology* *88*, 481–494. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.04.004>.

Marichal, N., García, G., Radmilovich, M., Trujillo-Cenóz, O., and Russo, R.E. (2012). Spatial Domains of Progenitor-Like Cells and Functional Complexity of a Stem Cell Niche in the Neonatal Rat Spinal Cord. *STEM CELLS* *30*, 2020–2031. <https://doi.org/10.1002/stem.1175>.

Marichal, N., Reali, C., Trujillo-Cenóz, O., and Russo, R.E. (2017a). Spinal Cord Stem Cells In Their Microenvironment: The Ependyma as a Stem Cell Niche. *Adv. Exp. Med. Biol.* *1041*, 55–79. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69194-7_5.

Marichal, N., Reali, C., Reherrmann, M.I., Trujillo-Cenóz, O., and Russo, R.E. (2017b). Progenitors in the Ependyma of the Spinal Cord: A Potential Resource for Self-Repair After Injury. *Adv. Exp. Med. Biol.* *1015*, 241–264. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62817-2_13.

Marignier, R., Nicolle, A., Watrin, C., Touret, M., Cavagna, S., Varrin-Doyer, M., Cavillon, G., Rogemond, V., Confavreux, C., Honnorat, J., et al. (2010). Oligodendrocytes are damaged by

Bibliographie

neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury. *Brain* 133, 2578–2591. <https://doi.org/10.1093/brain/awq177>.

Marignier, R., Ruiz, A., Cavagna, S., Nicole, A., Watrin, C., Touret, M., Parrot, S., Malleret, G., Peyron, C., Benetollo, C., et al. (2016). Neuromyelitis optica study model based on chronic infusion of autoantibodies in rat cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroinflammation* 13. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0577-8>.

Marignier, R., Cobo Calvo, A., and Vukusic, S. (2017). Neuromyelitis optica and neuromyelitis optica spectrum disorders: Current Opinion in Neurology 30, 208–215. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000455>.

Marques, M.M., Villoch-Fernandez, J., Maeso-Alonso, L., Fuertes-Alvarez, S., and Marin, M.C. (2019). The Trp73 Mutant Mice: A Ciliopathy Model That Uncouples Ciliogenesis From Planar Cell Polarity. *Front Genet* 10, 154. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00154>.

Marshall, W.F. (2010). Cilia self-organize in response to planar cell polarity and flow. *Nature Cell Biology* 12, 314–315. <https://doi.org/10.1038/ncb0410-314>.

Martin, M. (2011). Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads. 10–12. .

Matiello, M., Schaefer-Klein, J.L., Hebrink, D.D., Kingsbury, D.J., Atkinson, E.J., Weinshenker, B.G., and NMO Genetics Collaborators (2011). Genetic analysis of aquaporin-4 in neuromyelitis optica. *Neurology* 77, 1149–1155. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31822f045b>.

Matsumoto, Y., Kanamori, A., Nakamura, M., Takahashi, T., Nakashima, I., and Negi, A. (2014). Sera from patients with seropositive neuromyelitis optica spectral disorders caused the degeneration of rodent optic nerve. *Exp Eye Res* 119, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.12.010>.

Matsushita, T., Masaki, K., Isobe, N., Sato, S., Yamamoto, K., Nakamura, Y., Watanabe, M., Suenaga, T., Kira, J.-I., and Japan Multiple Sclerosis Genetic Consortium (2020). Genetic factors for susceptibility to and manifestations of neuromyelitis optica. *Ann Clin Transl Neurol* 7, 2082–2093. <https://doi.org/10.1002/acn3.51147>.

McClenahan, F.K., Sharma, H., Shan, X., Eyermann, C., and Colognato, H. (2016). Dystroglycan Suppresses Notch to Regulate Stem Cell Niche Structure and Function in the Developing Postnatal Subventricular Zone. *Dev Cell* 38, 548–566. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.07.017>.

- Melo, G.D., Grano, F.G., Silva, J.E.S., Kremer, B.E., Lima, V.M.F., and Machado, G.F. (2015). Blood–brain barrier disruption during spontaneous canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology* 37, 635–645. <https://doi.org/10.1111/pim.12285>.
- Menn, B., Garcia-Verdugo, J.M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., and Alvarez-Buylla, A. (2006). Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J. Neurosci.* 26, 7907–7918. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1299-06.2006>.
- Mercier, F., and Hatton, G.I. (2001). Connexin 26 and basic fibroblast growth factor are expressed primarily in the subpial and subependymal layers in adult brain parenchyma: roles in stem cell proliferation and morphological plasticity? *J. Comp. Neurol.* 431, 88–104. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20010226\)431:1<88::aid-cne1057>3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20010226)431:1<88::aid-cne1057>3.0.co;2-d).
- Merico, D., Isserlin, R., Stueker, O., Emili, A., and Bader, G.D. (2010). Enrichment map: a network-based method for gene-set enrichment visualization and interpretation. *PLoS One* 5, e13984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013984>.
- Merkle, F.T., Tramontin, A.D., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 17528–17532. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407893101>.
- Meunier, A., Sawamoto, K., and Spassky, N. (2020). Chapter 42 - Ependyma. In *Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS (Second Edition)*, J. Rubenstein, P. Rakic, B. Chen, and K.Y. Kwan, eds. (Academic Press), pp. 1021–1036.
- Milhorat, T.H., Kotzen, R.M., and Anzil, A.P. (1994). Stenosis of central canal of spinal cord in man: incidence and pathological findings in 232 autopsy cases. *Journal of Neurosurgery* 80, 716–722. <https://doi.org/10.3171/jns.1994.80.4.0716>.
- Millward, J.M., Caruso, M., Campbell, I.L., Gauldie, J., and Owens, T. (2007). IFN-gamma-induced chemokines synergize with pertussis toxin to promote T cell entry to the central nervous system. *J. Immunol.* 178, 8175–8182. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.8175>.
- Mirzadeh, Z., Merkle, F.T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Neural Stem Cells Confer Unique Pinwheel Architecture to the Ventricular Surface in Neurogenic Regions of the Adult Brain. *Cell Stem Cell* 3, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.004>.

Bibliographie

- Mirzadeh, Z., Han, Y.-G., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2010a). Cilia Organize Ependymal Planar Polarity. *Journal of Neuroscience* 30, 2600–2610. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3744-09.2010>.
- Mirzadeh, Z., Doetsch, F., Sawamoto, K., Wichterle, H., and Alvarez-Buylla, A. (2010b). The Subventricular Zone En-face: Wholemount Staining and Ependymal Flow. *Journal of Visualized Experiments* <https://doi.org/10.3791/1938>.
- Mirzadeh, Z., Kusne, Y., Duran-Moreno, M., Cabrales, E., Gil-Perotin, S., Ortiz, C., Chen, B., Garcia-Verdugo, J.M., Sanai, N., and Alvarez-Buylla, A. (2017). Bi- and unciliated ependymal cells define continuous floor-plate-derived tanyctic territories. *Nature Communications* 8, 13759. <https://doi.org/10.1038/ncomms13759>.
- Misu, T., Höftberger, R., Fujihara, K., Wimmer, I., Takai, Y., Nishiyama, S., Nakashima, I., Konno, H., Bradl, M., Garzuly, F., et al. (2013). Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica. *Acta Neuropathologica* 125, 815–827. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1116-7>.
- Mnkkönen, K.S., Hirst, R.A., Laitinen, J.T., and O’Callaghan, C. (2008). PACAP27 regulates ciliary function in primary cultures of rat brain ependymal cells. *Neuropeptides* 42, 633–640. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2008.09.006>.
- Moe, S.E., Sorbo, J.G., Sogaard, R., Zeuthen, T., Petter Ottersen, O., and Holen, T. (2008). New isoforms of rat Aquaporin-4. *Genomics* 91, 367–377. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.12.003>.
- Mohammed, B.J., Mitchell, T.J., Andrew, P.W., Hirst, R.A., and O’Callaghan, C. (1999). The effect of the pneumococcal toxin, pneumolysin on brain ependymal cilia. *Microbial Pathogenesis* 27, 303–309. <https://doi.org/10.1006/mpat.1999.0306>.
- Mönkkönen, K.S., Hakumäki, J.M., Hirst, R.A., Miettinen, R.A., O’Callaghan, C., Männistö, P.T., and Laitinen, J.T. (2007). Intracerebroventricular antisense knockdown of Gai2 results in ciliary stasis and ventricular dilatation in the rat. *BMC Neuroscience* 8, 26. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-26>.
- Moore, S.A. (2016). The Spinal Ependymal Layer in Health and Disease. *Veterinary Pathology* 53, 746–753. <https://doi.org/10.1177/0300985815618438>.
- Morales, A., Bonnet, C., Bourgoïn, N., Touvier, T., Nadam, J., Laglaine, A., Navarro, F., Moulin, C., Georges, B., Pequignot, J.-M., et al. (2006). Unexpected expression of orexin-B in basal conditions and

increased levels in the adult rat hippocampus during pilocarpine-induced epileptogenesis. *Brain Res* 1109, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.06.075>.

Morante-Redolat, J.M., and Porlan, E. (2019). Neural Stem Cell Regulation by Adhesion Molecules Within the Subependymal Niche. *Front Cell Dev Biol* 7, 102. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00102>.

Moreno-Manzano, V. (2020). Ependymal cells in the spinal cord as neuronal progenitors. *Current Opinion in Pharmacology* 50, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.11.008>.

Moreno-Manzano, V., Rodríguez-Jiménez, F.J., García-Roselló, M., Láinez, S., Erceg, S., Calvo, M.T., Ronaghi, M., Lloret, M., Planells-Cases, R., Sánchez-Puelles, J.M., et al. (2009). Activated spinal cord ependymal stem cells rescue neurological function. *Stem Cells* 27, 733–743. <https://doi.org/10.1002/stem.24>.

Morse, D.M., Smullen, J.L., and Davis, C.W. (2001). Differential effects of UTP, ATP, and adenosine on ciliary activity of human nasal epithelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 280, C1485–C1497. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.6.C1485>.

Nadarajah, B., Jones, A.M., Evans, W.H., and Parnavelas, J.G. (1997). Differential expression of connexins during neocortical development and neuronal circuit formation. *J. Neurosci.* 17, 3096–3111.

Nagelhus, E.A., and Ottersen, O.P. (2013). Physiological Roles of Aquaporin-4 in Brain. *Physiological Reviews* 93, 1543–1562. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2013>.

Nagra, G., Koh, L., Zakharov, A., Armstrong, D., and Johnston, M. (2006). Quantification of cerebrospinal fluid transport across the cribriform plate into lymphatics in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R1383-1389. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00235.2006>.

Nascimento, M.A., Sorokin, L., and Coelho-Sampaio, T. (2018). Fractone Bulbs Derive from Ependymal Cells and Their Laminin Composition Influence the Stem Cell Niche in the Subventricular Zone. *J. Neurosci.* 38, 3880–3889. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3064-17.2018>.

Neal, J.W., and Gasque, P. (2013). How does the brain limit the severity of inflammation and tissue injury during bacterial meningitis? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 72, 370–385. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182909f2f>.

Nguyen, T., Chin, W.C., O'Brien, J.A., Verdugo, P., and Berger, A.J. (2001). Intracellular pathways regulating ciliary beating of rat brain ependymal cells. *J. Physiol. (Lond.)* 531, 131–140. .

Bibliographie

- Nicchia, G.P., Srinivas, M., Li, W., Brosnan, C.F., Frigeri, A., and Spray, D.C. (2005). New possible roles for aquaporin-4 in astrocytes: cell cytoskeleton and functional relationship with connexin43. *FASEB J.* *19*, 1674–1676. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3281fje>.
- Nielsen, S., Nagelhus, E.A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P., and Ottersen, O.P. (1997). Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *Journal of Neuroscience* *17*, 171–180. .
- Nishiyama, S., Misu, T., Nuriya, M., Takano, R., Takahashi, T., Nakashima, I., Yasui, M., Itoyama, Y., Aoki, M., and Fujihara, K. (2016). Complement-dependent and -independent aquaporin 4-antibody-mediated cytotoxicity in human astrocytes: Pathogenetic implications in neuromyelitis optica. *Biochem Biophys Rep* *7*, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.05.012>.
- Obernier, K., Cebrian-Silla, A., Thomson, M., Parraguez, J.I., Anderson, R., Guinto, C., Rodas Rodriguez, J., Garcia-Verdugo, J.-M., and Alvarez-Buylla, A. (2018). Adult Neurogenesis Is Sustained by Symmetric Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell* *22*, 221-234.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.01.003>.
- O’Callaghan, C., Sikand, K., and Chilvers, M.A. (2012). Analysis of ependymal ciliary beat pattern and beat frequency using high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods. *Cilia* *1*, 8. <https://doi.org/10.1186/2046-2530-1-8>.
- Ohata, S., and Alvarez-Buylla, A. (2016). Planar Organization of Multiciliated Ependymal (E1) Cells in the Brain Ventricular Epithelium. *Trends in Neurosciences* *39*, 543–551. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.05.004>.
- Ohata, S., Nakatani, J., Herranz-Pérez, V., Cheng, J., Belinson, H., Inubushi, T., Snider, W.D., García-Verdugo, J.M., Wynshaw-Boris, A., and Álvarez-Buylla, A. (2014). Loss of Dishevelleds Disrupts Planar Polarity in Ependymal Motile Cilia and Results in Hydrocephalus. *Neuron* *83*, 558–571. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.022>.
- Ommaya, A.K. (1963). Subcutaneous reservoir and pump for sterile access to ventricular cerebrospinal fluid. *Lancet* *2*, 983–984. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(63\)90681-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(63)90681-0).
- Ortiz-Álvarez, G., and Spassky, N. (2020). One progenitor to generate them all: new evidence for multifated neural progenitors. *Curr Opin Neurobiol* *66*, 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.10.013>.
- Ortiz-Álvarez, G., Daclin, M., Shihavuddin, A., Lansade, P., Fortoul, A., Faucourt, M., Clavreul, S., Lalioti, M.-E., Taraviras, S., Hippenmeyer, S., et al. (2019). Adult Neural Stem Cells and Multiciliated

Ependymal Cells Share a Common Lineage Regulated by the Geminin Family Members. *Neuron* 102, 159-172.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.051>.

Paez-Gonzalez, P., Abdi, K., Luciano, D., Liu, Y., Soriano-Navarro, M., Rawlins, E., Bennett, V., Garcia-Verdugo, J.M., and Kuo, C.T. (2011). Ank3-dependent SVZ niche assembly is required for the continued production of new neurons. *Neuron* 71, 61–75. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.029>.

Palazzo, C., Buccoliero, C., Mola, M.G., Abbrescia, P., Nicchia, G.P., Trojano, M., and Frigeri, A. (2019). AQP4^{ex} is crucial for the anchoring of AQP4 at the astrocyte end-feet and for neuromyelitis optica antibody binding. *Acta Neuropathol Commun* 7, 51. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0707-5>.

Papadopoulos, M.C., and Verkman, A.S. (2012). Aquaporin 4 and neuromyelitis optica. *Lancet Neurol* 11, 535–544. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70133-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70133-3).

Pappenheimer, J.R., Miller, T.B., and Goodrich, C.A. (1967). Sleep-promoting effects of cerebrospinal fluid from sleep-deprived goats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 58, 513–517. .

Park, S., Lee, H., Lee, J., Park, E., and Park, S. (2019). Ependymal Cells Require Anks1a for Their Proper Development. *Mol. Cells* 42, 245–251. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0432>.

Pellicciotta, N., Das, D., Kotar, J., Faucourt, M., Spassky, N., Lauga, E., and Cicuta, P. (2020). Cilia density and flow velocity affect alignment of motile cilia from brain cells. *J Exp Biol* 223. <https://doi.org/10.1242/jeb.229310>.

Peretto, P., Dati, C., De Marchis, S., Kim, H.H., Ukhanova, M., Fasolo, A., and Margolis, F.L. (2004). Expression of the secreted factors noggin and bone morphogenetic proteins in the subependymal layer and olfactory bulb of the adult mouse brain. *Neuroscience* 128, 685–696. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.053>.

Perez-Asensio, F.J., Perpiñá, U., Planas, A.M., and Pozas, E. (2013). Interleukin-10 regulates progenitor differentiation and modulates neurogenesis in adult brain. *J. Cell. Sci.* 126, 4208–4219. <https://doi.org/10.1242/jcs.127803>.

Petrik, D., Myoga, M.H., Grade, S., Gerkau, N.J., Pusch, M., Rose, C.R., Grothe, B., and Götz, M. (2018). Epithelial Sodium Channel Regulates Adult Neural Stem Cell Proliferation in a Flow-Dependent Manner. *Cell Stem Cell* 22, 865-878.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.016>.

Pfenninger, C.V., Steinhoff, C., Hertwig, F., and Nuber, U.A. (2011). Prospectively isolated CD133/CD24-positive ependymal cells from the adult spinal cord and lateral ventricle wall differ in

Bibliographie

their long-term in vitro self-renewal and in vivo gene expression. *Glia* 59, 68–81. <https://doi.org/10.1002/glia.21077>.

Pierre, K., Pellerin, L., Debernardi, R., Riederer, B.M., and Magistretti, P.J. (2000). Cell-specific localization of monocarboxylate transporters, MCT1 and MCT2, in the adult mouse brain revealed by double immunohistochemical labeling and confocal microscopy. *Neuroscience* 100, 617–627. .

Pittock, S.J., Lennon, V.A., Krecke, K., Wingerchuk, D.M., Lucchinetti, C.F., and Weinshenker, B.G. (2006). Brain abnormalities in neuromyelitis optica. *Archives of Neurology* 63, 390–396. .

Ponti, G., Obernier, K., Guinto, C., Jose, L., Bonfanti, L., and Alvarez-Buylla, A. (2013). Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, E1045–E1054. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219563110>.

Porlan, E., Martí-Prado, B., Morante-Redolat, J.M., Consiglio, A., Delgado, A.C., Kypta, R., López-Otín, C., Kirstein, M., and Fariñas, I. (2014). MT5-MMP regulates adult neural stem cell functional quiescence through the cleavage of N-cadherin. *Nat. Cell Biol.* 16, 629–638. <https://doi.org/10.1038/ncb2993>.

Pourabdolhossein, F., Gil-Perotín, S., Garcia-Belda, P., Dauphin, A., Mozafari, S., Tepavcevic, V., Manuel Garcia Verdugo, J., and Baron-Van Evercooren, A. (2017). Inflammatory demyelination induces ependymal modifications concomitant to activation of adult (SVZ) stem cell proliferation: POURABDOLHOSSEIN et al. *Glia* 65, 756–772. <https://doi.org/10.1002/glia.23124>.

Privat, A. (1977). The ependyma and subependymal layer of the young rat: A new contribution with freeze-fracture. *Neuroscience* 2, 447–457. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(77\)90010-0](https://doi.org/10.1016/0306-4522(77)90010-0).

Prothmann, C., Wellard, J., Berger, J., Hamprecht, B., and Verleysdonk, S. (2001). Primary cultures as a model for studying ependymal functions: glycogen metabolism in ependymal cells. *Brain Research* 920, 74–83. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03021-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03021-9).

Qu, Z., Yimer, T.A., Xie, S., Wong, F., Yu, S., Liu, X., Han, S., Ma, J., Lu, Z., Hu, X., et al. (2019). Knocking out lca5 in zebrafish causes cone-rod dystrophy due to impaired outer segment protein trafficking. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1865, 2694–2705. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.07.009>.

Rao, S.B., Skauli, N., Jovanovic, N., Katoozi, S., Frigeri, A., Froehner, S.C., Adams, M.E., Ottersen, O.P., and Amiry-Moghaddam, M. (2021). Orchestrating aquaporin-4 and connexin-43 expression in

brain: Differential roles of α 1- and β 1-syntrophin. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 183616. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183616>.

Rash, J.E., and Yasumura, T. (1999). Direct immunogold labeling of connexins and aquaporin-4 in freeze-fracture replicas of liver, brain, and spinal cord: factors limiting quantitative analysis. *Cell Tissue Res* 296, 307–321. <https://doi.org/10.1007/s004410051291>.

Ratelade, J., and Verkman, A.S. (2012). Neuromyelitis optica: Aquaporin-4 based pathogenesis mechanisms and new therapies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44, 1519–1530. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.06.013>.

Ratelade, J., Zhang, H., Saadoun, S., Bennett, J.L., Papadopoulos, M.C., and Verkman, A.S. (2012). Neuromyelitis optica IgG and natural killer cells produce NMO lesions in mice without myelin loss. *Acta Neuropathol* 123, 861–872. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-0986-4>.

Ratelade, J., Asavapanumas, N., Ritchie, A.M., Wemlinger, S., Bennett, J.L., and Verkman, A.S. (2013). Involvement of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in inflammatory demyelination in a mouse model of neuromyelitis optica. *Acta Neuropathol* 126, 699–709. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1172-z>.

Recabal, A., Elizondo-Vega, R., Philippot, C., Salgado, M., López, S., Palma, A., Tarifeño-Saldivia, E., Timmermann, A., Seifert, G., Caprile, T., et al. (2018). Connexin-43 Gap Junctions Are Responsible for the Hypothalamic Tancocyte-Coupled Network. *Front Cell Neurosci* 12, 406. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00406>.

Redmond, S.A., Figueres-Oñate, M., Obernier, K., Nascimento, M.A., Parraguez, J.I., López-Mascaraque, L., Fuentealba, L.C., and Alvarez-Buylla, A. (2019). Development of Ependymal and Postnatal Neural Stem Cells and Their Origin from a Common Embryonic Progenitor. *Cell Rep* 27, 429–441.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.088>.

Ren, Z., Wang, Y., Duan, T., Patel, J., Liggett, T., Loda, E., Brahma, S., Goswami, R., Grouse, C., Byrne, R., et al. (2012). Cross-immunoreactivity between bacterial aquaporin-Z and human aquaporin-4: potential relevance to neuromyelitis optica. *J. Immunol.* 189, 4602–4611. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200486>.

Richard, C., Ruiz, A., Cavagna, S., Bigotte, M., Vukusic, S., Masaki, K., Suenaga, T., Kira, J.-I., Giraudon, P., and Marignier, R. (2020). Connexins in neuromyelitis optica: a link between astrocytopathy and demyelination. *Brain* <https://doi.org/10.1093/brain/awaa227>.

Bibliographie

- Roales-Buján, R., Páez, P., Guerra, M., Rodríguez, S., Vío, K., Ho-Plagaro, A., García-Bonilla, M., Rodríguez-Pérez, L.-M., Domínguez-Pinos, M.-D., Rodríguez, E.-M., et al. (2012). Astrocytes acquire morphological and functional characteristics of ependymal cells following disruption of ependyma in hydrocephalus. *Acta Neuropathologica* 124, 531–546. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-0992-6>.
- Rodriguez-Jimenez, F.J., Alastrue, A., Stojkovic, M., Erceg, S., and Moreno-Manzano, V. (2016). Connexin 50 modulates Sox2 expression in spinal-cord-derived ependymal stem/progenitor cells. *Cell Tissue Res.* 365, 295–307. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2421-y>.
- Rosenberg, G.A., Kyner, W.T., and Estrada, E. (1980). Bulk flow of brain interstitial fluid under normal and hyperosmolar conditions. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 238, F42–F49. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1980.238.1.F42>.
- Rosenberg, G.A., Kyner, W.T., Fenstermacher, J.D., and Patlak, C.S. (1986). Effect of vasopressin on ependymal and capillary permeability to tritiated water in cat. *Am J Physiol* 251, F485–489. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1986.251.3.F485>.
- Rosu, G.-C., Catalin, B., Balseanu, T.A., Laurentiu, M., Claudiu, M., Kumar-Singh, S., and Daniel, P. (2020). Inhibition of Aquaporin 4 Decreases Amyloid A β 40 Drainage Around Cerebral Vessels. *Mol Neurobiol* 57, 4720–4734. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02044-8>.
- Russo, R.E., Reali, C., Radmilovich, M., Fernandez, A., and Trujillo-Cenoz, O. (2008). Connexin 43 Delimits Functional Domains of Neurogenic Precursors in the Spinal Cord. *Journal of Neuroscience* 28, 3298–3309. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5736-07.2008>.
- Saadoun, S., Waters, P., Bell, B.A., Vincent, A., Verkman, A.S., and Papadopoulos, M.C. (2010). Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice. *Brain* 133, 349–361. <https://doi.org/10.1093/brain/awp309>.
- Sakka, L., Coll, G., and Chazal, J. (2011). Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases* 128, 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.anorl.2011.03.002>.
- Sanai, N., Tramontin, A.D., Quiñones-Hinojosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M.T., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Manuel-García Verdugo, J., et al. (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427, 740–744. <https://doi.org/10.1038/nature02301>.

Sarnat, H.B. (1998). Histochemistry and immunocytochemistry of the developing ependyma and choroid plexus. *Microsc. Res. Tech.* 41, 14–28. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19980401\)41:1<14::AID-JEMT3>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980401)41:1<14::AID-JEMT3>3.0.CO;2-U).

Sato, D.K. (2014). Distinction between MOG antibody- positive and AQP4 antibody-positive NMO spectrum disorders. 8. .

Sato, D.K., Callegaro, D., Jorge, H., Frederico, M., Nakashima, I., Nishiyama, S., Takahashi, T., Simm, R.F., Apostolos-Pereira, S.L., and Misu, T. (2014). Cerebrospinal fluid aquaporin-4 antibody levels in neuromyelitis optica attacks. *Annals of Neurology* 76, 305–309. .

Sato, Y., Kiyozumi, D., Futaki, S., Nakano, I., Shimono, C., Kaneko, N., Ikawa, M., Okabe, M., Sawamoto, K., and Sekiguchi, K. (2019). Ventricular-subventricular zone fractones are speckled basement membranes that function as a neural stem cell niche. *Mol. Biol. Cell* 30, 56–68. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-05-0286>.

Sawamoto, K. (2006). New Neurons Follow the Flow of Cerebrospinal Fluid in the Adult Brain. *Science* 311, 629–632. <https://doi.org/10.1126/science.1119133>.

Schmidt, F., Göktas, O., Jarius, S., Wildemann, B., Ruprecht, K., Paul, F., and Harms, L. (2013). Olfactory dysfunction in patients with neuromyelitis optica. *Mult Scler Int* 2013, 654501. <https://doi.org/10.1155/2013/654501>.

Schneider, R., Bellenberg, B., Kleiter, I., Gold, R., Köster, O., Weiler, F., Hahn, H., and Lukas, C. (2017). Cervical cord and ventricle affection in neuromyelitis optica. *Acta Neurol. Scand.* 135, 324–331. <https://doi.org/10.1111/ane.12601>.

Seidenfaden, R., Desoeuvre, A., Bosio, A., Virard, I., and Cremer, H. (2006). Glial conversion of SVZ-derived committed neuronal precursors after ectopic grafting into the adult brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 32, 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.04.003>.

Shah, P.T., Stratton, J.A., Stykel, M.G., Abbasi, S., Sharma, S., Mayr, K.A., Koblinger, K., Whelan, P.J., and Biernaskie, J. (2018). Single-Cell Transcriptomics and Fate Mapping of Ependymal Cells Reveals an Absence of Neural Stem Cell Function. *Cell* 173, 1045-1057.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.063>.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13, 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>.

Bibliographie

Shimizu, F., Schaller, K.L., Owens, G.P., Cotleur, A.C., Kellner, D., Takeshita, Y., Obermeier, B., Kryzer, T.J., Sano, Y., Kanda, T., et al. (2017). Glucose-regulated protein 78 autoantibody associates with blood-brain barrier disruption in neuromyelitis optica. *Sci Transl Med* 9, eaai9111. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aai9111>.

Šimon, F. (2016). On the origin of the term ependyma. *Journal of the History of the Neurosciences* 25, 437–443. <https://doi.org/10.1080/0964704X.2015.1117894>.

Sival, D.A., Guerra, M., den Dunnen, W.F.A., Bátiz, L.F., Alvial, G., Castañeyra-Perdomo, A., and Rodríguez, E.M. (2011). Neuroependymal Denudation is in Progress in Full-term Human Foetal Spina Bifida Aperta: Ependymal Disruption in Human Spina Bifida. *Brain Pathology* 21, 163–179. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2010.00432.x>.

Smith, K.G.C., and Clatworthy, M.R. (2010). FcγRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nat Rev Immunol* 10, 328–343. <https://doi.org/10.1038/nri2762>.

Soerensen, S.F., Wirenfeldt, M., Wlodarczyk, A., Moerch, M.T., Khoroshi, R., Arengoth, D.S., Lillevang, S.T., Owens, T., and Asgari, N. (2021). An Experimental Model of Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder-Optic Neuritis: Insights Into Disease Mechanisms. *Front Neurol* 12, 703249. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.703249>.

Sohn, J., Orosco, L., Guo, F., Chung, S.-H., Bannerman, P., Mills Ko, E., Zarbalis, K., Deng, W., and Pleasure, D. (2015). The subventricular zone continues to generate corpus callosum and rostral migratory stream astroglia in normal adult mice. *J. Neurosci.* 35, 3756–3763. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3454-14.2015>.

Solan, J.L., and Lampe, P.D. (2018). Spatio-temporal regulation of connexin43 phosphorylation and gap junction dynamics. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.008>.

Spassky, N. (2005). Adult Ependymal Cells Are Postmitotic and Are Derived from Radial Glial Cells during Embryogenesis. *Journal of Neuroscience* 25, 10–18. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1108-04.2005>.

Spassky, N., and Meunier, A. (2017). The development and functions of multiciliated epithelia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 423–436. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.21>.

Spector, R., Robert Snodgrass, S., and Johanson, C.E. (2015). A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans. *Experimental Neurology* 273, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.07.027>.

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *PNAS* 102, 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>.

Tada, T., Nguyen, J.B., Hitoshi, Y., Watson, N.P., Dunn, J.F., Ohara, S., Nagano, S., Kosai, K.-I., and Israel, M.A. (2005). Diffuse encephaloventriculitis and substantial leukoencephalopathy after intraventricular administration of recombinant adenovirus. *Neurol. Res.* 27, 378–386. <https://doi.org/10.1179/016164105X22075>.

Tait, M.J., Saadoun, S., Bell, B.A., and Papadopoulos, M.C. (2008). Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends in Neurosciences* 31, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.11.003>.

Takagishi, M., Sawada, M., Ohata, S., Asai, N., Enomoto, A., Takahashi, K., Weng, L., Ushida, K., Ara, H., Matsui, S., et al. (2017). Daple Coordinates Planar Polarized Microtubule Dynamics in Ependymal Cells and Contributes to Hydrocephalus. *Cell Reports* 20, 960–972. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.089>.

Takai, Y., Misu, T., Suzuki, H., Takahashi, T., Okada, H., Tanaka, S., Okita, K., Sasou, S., Watanabe, M., Namatame, C., et al. (2021). Staging of astrocytopathy and complement activation in neuromyelitis optica spectrum disorders. *Brain* <https://doi.org/10.1093/brain/awab102>.

Tomé, M., Moreira, E., Pérez-Fígares, J.-M., and Jiménez, A.J. (2007). Presence of D1- and D2-like dopamine receptors in the rat, mouse and bovine multiciliated ependyma. *J Neural Transm (Vienna)* 114, 983–994. <https://doi.org/10.1007/s00702-007-0666-z>.

Torrillas de la Cal, A., Paniagua-Torija, B., Arevalo-Martin, A., Faulkes, C.G., Jiménez, A.J., Ferrer, I., Molina-Holgado, E., and Garcia-Ovejero, D. (2021). The Structure of the Spinal Cord Ependymal Region in Adult Humans Is a Distinctive Trait among Mammals. *Cells* 10, 2235. <https://doi.org/10.3390/cells10092235>.

Trillo-Contreras, J.L., Ramírez-Lorca, R., Hiraldo-González, L., Sánchez-Gomar, I., Galán-Cobo, A., Suárez-Luna, N., Sánchez de Rojas-de Pedro, E., Toledo-Aral, J.J., Villadiego, J., and Echevarría, M.

Bibliographie

- (2018). Combined effects of aquaporin-4 and hypoxia produce age-related hydrocephalus. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864, 3515–3526. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.006>.
- Trillo-Contreras, J.L., Toledo-Aral, J.J., Echevarría, M., and Villadiego, J. (2019). AQP1 and AQP4 Contribution to Cerebrospinal Fluid Homeostasis. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8020197>.
- Tritschler, F., Murín, R., Birk, B., Berger, J., Rapp, M., Hamprecht, B., and Verleysdonk, S. (2007). Thrombin causes the Enrichment of Rat Brain Primary Cultures with Ependymal Cells Via Protease-Activated Receptor 1. *Neurochemical Research* 32, 1028–1035. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9267-8>.
- Tsutsumi, S., Ono, H., Ishii, H., and Yasumoto, Y. (2018). Visualization of the periventricular Virchow-Robin spaces with ependymal openings. *Childs Nerv Syst* 34, 1529–1533. <https://doi.org/10.1007/s00381-018-3793-y>.
- Uzawa, A., Mori, M., Masahiro, M., and Kuwabara, S. (2014). Cytokines and chemokines in neuromyelitis optica: pathogenetic and therapeutic implications. *Brain Pathol* 24, 67–73. <https://doi.org/10.1111/bpa.12097>.
- Vaishnav, R.A., Liu, R., Chapman, J., Roberts, A.M., Ye, H., Rebolledo-Mendez, J.D., Tabira, T., Fitzpatrick, A.H., Achiron, A., Running, M.P., et al. (2013). Aquaporin 4 molecular mimicry and implications for neuromyelitis optica. *J. Neuroimmunol.* 260, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.04.015>.
- Varrin-Doyer, M., Spencer, C.M., Schulze-Topphoff, U., Nelson, P.A., Stroud, R.M., C. Cree, B.A., and Zamvil, S.S. (2012). Aquaporin 4-specific T cells in neuromyelitis optica exhibit a Th17 bias and recognize *Clostridium* ABC transporter. *Ann Neurol*. 72, 53–64. <https://doi.org/10.1002/ana.23651>.
- Vedeler, C.A., Myhr, K.M., and Nyland, H. (2001). Fc receptors for immunoglobulin G--a role in the pathogenesis of Guillain-Barré syndrome and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 118, 187–193. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(01\)00344-7](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(01)00344-7).
- Verkman, A.S., Ratelade, J., Rossi, A., Zhang, H., and Tradtrantip, L. (2011). Aquaporin-4: orthogonal array assembly, CNS functions, and role in neuromyelitis optica. *Acta Pharmacol Sin* 32, 702–710. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.27>.
- Verleysdonk, S., Hamprecht, B., Rapp, M., and Wellard, J. (2004). Uptake and metabolism of serotonin by ependymal primary cultures. *Neurochem. Res.* 29, 1739–1747. .

- Verleysdonk, S., Kistner, S., Pfeiffer-Guglielmi, B., Wellard, J., Lupescu, A., Laske, J., Lang, F., Rapp, M., and Hamprecht, B. (2005). Glycogen metabolism in rat ependymal primary cultures: regulation by serotonin. *Brain Res. 1060*, 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.08.045>.
- Vigh-Teichmann, I., and Vigh, B. (1983). The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Arch Histol Jpn 46*, 427–468. .
- Villalón, M., Hinds, T.R., and Verdugo, P. (1989). Stimulus-response coupling in mammalian ciliated cells. Demonstration of two mechanisms of control for cytosolic [Ca²⁺]. *Biophysical Journal 56*, 1255–1258. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(89\)82772-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(89)82772-9).
- Vindedal, G.F., Thoren, A.E., Jensen, V., Klungland, A., Zhang, Y., Holtzman, M.J., Ottersen, O.P., and Nagelhus, E.A. (2016). Removal of aquaporin-4 from glial and ependymal membranes causes brain water accumulation. *Molecular and Cellular Neuroscience 77*, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2016.10.004>.
- Voutsinos, B., Chouaf, L., Mertens, P., Ruiz-Flandes, P., Joubert, Y., Belin, M.F., and Didier-Bazes, M. (1994). Tropism of serotonergic neurons towards glial targets in the rat ependyma. *Neuroscience 59*, 663–672. .
- Wang, J., O'Bara, M.A., Pol, S.U., and Sim, F.J. (2013). CD133/CD140a-based isolation of distinct human multipotent neural progenitor cells and oligodendrocyte progenitor cells. *Stem Cells Dev 22*, 2121–2131. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0003>.
- Weibel, M., Pettmann, B., Artault, J.-C., Sensenbrenner, M., and Labourdette, G. (1986). Primary culture of rat ependymal cells in serum-free defined medium. *Developmental Brain Research 25*, 199–209. .
- Wenzel, J. (1806). *Prodromus eines Werkes über das Hirn des Menschen und der Thiere*, (Tübingen,).
- Whish, S., Dziegielewska, K.M., MÅllgÅÿrd, K., Noor, N.M., Liddelow, S.A., Habgood, M.D., Richardson, S.J., and Saunders, N.R. (2015). The inner CSF-brain barrier: developmentally controlled access to the brain via intercellular junctions. *Frontiers in Neuroscience 9*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00016>.
- Wingerchuk, D.M. (2010). Neuromyelitis optica spectrum disorders. *Continuum (Minneapolis) 16*, 105–121. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000389937.69413.15>.

Bibliographie

- Wingerchuk, D.M., Hogancamp, W.F., O'Brien, P.C., and Weinshenker, B.G. (1999). The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology* 53, 1107–1114. <https://doi.org/10.1212/wnl.53.5.1107>.
- Wingerchuk, D.M., Lennon, V.A., Pittock, S.J., Lucchinetti, C.F., and Weinshenker, B.G. (2006). Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 66, 1485–1489. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000216139.44259.74>.
- Wingerchuk, D.M., Lennon, V.A., Lucchinetti, C.F., Pittock, S.J., and Weinshenker, B.G. (2007). The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol* 6, 805–815. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70216-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70216-8).
- Wingerchuk, D.M., Banwell, B., Bennett, J.L., Cabre, P., Carroll, W., Chitnis, T., de Seze, J., Fujihara, K., Greenberg, B., Jacob, A., et al. (2015). International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* 85, 177–189. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001729>.
- Xu, Z., Xiao, N., Chen, Y., Huang, H., Marshall, C., Gao, J., Cai, Z., Wu, T., Hu, G., and Xiao, M. (2015). Deletion of aquaporin-4 in APP/PS1 mice exacerbates brain A β accumulation and memory deficits. *Mol Neurodegener* 10, 58. <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0056-1>.
- Yamazaki, Y., Hirai, Y., Miyake, K., and Shimada, T. (2014). Targeted gene transfer into ependymal cells through intraventricular injection of AAV1 vector and long-term enzyme replacement via the CSF. *Sci Rep* 4, 5506. <https://doi.org/10.1038/srep05506>.
- Yao, X., Adams, M.S., Jones, P.D., Diederich, C.J., and Verkman, A.S. (2019). Noninvasive, Targeted Creation of Neuromyelitis Optica Pathology in AQP4-IgG Seropositive Rats by Pulsed Focused Ultrasound. *J Neuropathol Exp Neurol* 78, 47–56. <https://doi.org/10.1093/jnen/nly107>.
- Young, C.C., van der Harg, J.M., Lewis, N.J., Brooks, K.J., Buchan, A.M., and Szele, F.G. (2013). Ependymal Ciliary Dysfunction and Reactive Astrocytosis in a Reorganized Subventricular Zone after Stroke. *Cerebral Cortex* 23, 647–659. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs049>.
- Zamvil, S.S., Spencer, C.M., Baranzini, S.E., and Cree, B.A.C. (2018). The Gut Microbiome in Neuromyelitis Optica. *Neurotherapeutics* 15, 92–101. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0594-z>.
- Zéphir, H., Fajardy, I., Outteryck, O., Blanc, F., Roger, N., Fleury, M., Rudolf, G., Marignier, R., Vukusic, S., Confavreux, C., et al. (2009). Is neuromyelitis optica associated with human leukocyte antigen? *Mult. Scler.* 15, 571–579. <https://doi.org/10.1177/1352458508102085>.

Zhang, H., and Verkman, A.S. (2014). Longitudinally extensive NMO spinal cord pathology produced by passive transfer of NMO-IgG in mice lacking complement inhibitor CD59. *J Autoimmun* 53, 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.02.011>.

Zhang, L., and Sanderson, M.J. (2003). Oscillations in ciliary beat frequency and intracellular calcium concentration in rabbit tracheal epithelial cells induced by ATP. *The Journal of Physiology* 546, 733–749. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.028704>.

Zhang, J., Chandrasekaran, G., Li, W., Kim, D.-Y., Jeong, I.Y., Lee, S.-H., Liang, T., Bae, J.Y., Choi, I., Kang, H., et al. (2020). Wnt-PLC-IP3-Connexin-Ca²⁺ axis maintains ependymal motile cilia in zebrafish spinal cord. *Nat Commun* 11, 1860. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15248-2>.

Zhang, L.-J., Zhao, N., Fu, Y., Zhang, D.-Q., Wang, J., Qin, W., Zhang, N., Wood, K., Liu, Y., Yu, C., et al. (2015). Olfactory dysfunction in neuromyelitis optica spectrum disorders. *J Neurol* 262, 1890–1898. <https://doi.org/10.1007/s00415-015-7787-3>.

Zhang, R.L., Chopp, M., Gregg, S.R., Toh, Y., Roberts, C., Letourneau, Y., Buller, B., Jia, L., P Nejad Davarani, S., and Zhang, Z.G. (2009). Patterns and dynamics of subventricular zone neuroblast migration in the ischemic striatum of the adult mouse. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 1240–1250. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.55>.

Zhang, Y., Bao, Y., Qiu, W., Peng, L., Fang, L., Xu, Y., and Yang, H. (2018). Structural and visual functional deficits in a rat model of neuromyelitis optica spectrum disorders related optic neuritis. *Exp Eye Res* 175, 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.06.011>.

Zhang, Z., Zheng, X., Liu, Y., Luan, Y., Wang, L., Zhao, L., Zhang, J., Tian, Y., Lu, H., Chen, X., et al. (2021). Activation of metabotropic glutamate receptor 4 regulates proliferation and neural differentiation in neural stem/progenitor cells of the rat subventricular zone and increases phosphatase and tensin homolog protein expression. *J Neurochem* 156, 465–480. <https://doi.org/10.1111/jnc.14984>.

Zweifel, S., Buquet, J., Caruso, L., Rousseau, D., and Raineteau, O. (2018). “FlashMap” - A Semi-Automatic Tool for Rapid and Accurate Spatial Analysis of Marker Expression in the Subventricular Zone. *Sci Rep* 8, 16086. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33939-1>.

Zywitzka, V., Misios, A., Bunatyan, L., Willnow, T.E., and Rajewsky, N. (2018). Single-Cell Transcriptomics Characterizes Cell Types in the Subventricular Zone and Uncovers Molecular Defects Impairing Adult Neurogenesis. *Cell Rep* 25, 2457-2469.e8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.003>.