



HAL
open science

DLL4 au niveau de la GLIA LIMITANS, un acteur clé de la physiopathologie de la neuro-inflammation

Pierre Mora

► **To cite this version:**

Pierre Mora. DLL4 au niveau de la GLIA LIMITANS, un acteur clé de la physiopathologie de la neuro-inflammation. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2023. Français. NNT : 2023BORD0293 . tel-04448223

HAL Id: tel-04448223

<https://theses.hal.science/tel-04448223>

Submitted on 9 Feb 2024

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.

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Par Pierre MORA

**DLL4 au niveau de la GLIA LIMITANS,
un acteur clé de la physiopathologie de la neuro-inflammation**

Sous la direction de : Candice CHAPOULY

Soutenue le 09 novembre 2023

Membres du jury :

Mme ALI, Carine, Professeure, Université de Caen	Rapportrice
Mme BOULAY, Anne-Cécile, Chargée de recherche, Collège de France	Rapportrice
Mme PANATIER, Aude, Directrice de recherche, Bordeaux Neurocampus	Présidente du jury
Mr TOURDIAS, Thomas, Professeur, Université de Bordeaux	Examineur

Membre invitée :

Mme CHAPOULY, Candice, Chargée de recherche, Inserm U1034	Directrice de thèse
---	---------------------

Résumé

Introduction : Au cours de la neuro-inflammation, les astrocytes, qui font partie intégrante de l'unité neuro-vasculaire avec les vaisseaux de la barrière hémato-encéphalique (BHE), subissent des changements morphologiques et moléculaires appelés « astroglie ». On parle alors d'« astrocytes réactifs » dont le phénotype est complexe avec des effets soit bénéfiques, soit délétères, sur l'intégrité de la BHE. Pour caractériser le transcriptome astrocytaire induit par l'astroglie en contexte inflammatoire et ainsi mieux comprendre les conséquences qui en découlent au niveau du système nerveux central (SNC), le laboratoire a réalisé un séquençage de l'ARN sur des astrocytes humains en culture, quiescents versus réactifs. Ce séquençage a permis d'identifier le gène delta like canonical Notch ligand 4 (DLL4), un ligand de la voie NOTCH, comme étant fortement surexprimé par les astrocytes réactifs *in vitro*. Cette observation a été vérifiée *in vivo* sur des biopsies corticales de lésions actives de patients atteints de sclérose en plaques (SEP).

Objectifs : Notre objectif est d'étudier la contribution de la signalisation DLL4-NOTCH1 aux effets de l'astroglie en condition neuro-inflammatoire.

Méthodes : Dans un premier temps, nous avons développé deux modèles murin d'inhibition génique spécifiquement astrocytaire de DLL4 (souris DLL4ACKO), le premier permettant une inhibition partielle et le second une inhibition totale du DLL4 astrocytaire. Puis dans un second temps, nous avons mis au point un modèle préclinique d'inhibition pharmacologique systémique reposant sur un anticorps monoclonal bloquant dirigé contre DLL4 injecté à des souris sauvages C57BL/6. Le modèle de neuro-inflammation que nous avons utilisé est un modèle murin de SEP appelée encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) qui consiste à immuniser l'animal contre sa propre myéline. La taille des lésions, l'inflammation, la démyélinisation et le handicap clinique ont été mesurés afin d'évaluer la gravité de la pathologie. En parallèle, nous avons utilisé *in vitro* des astrocytes primaires humains incubés avec l'interleukin 1 beta (IL1B) afin de mimer un état inflammatoire et ainsi induire l'astroglie. Dans ce modèle, l'inhibition de DLL4 est obtenue par traitement avec un petit ARN interférent (siRNA) dirigé contre DLL4.

Résultats : *In vivo*, nous avons observé une diminution de la gravité de la pathologie chez les souris DLL4ACKO proportionnelle au degré d'inhibition du DLL4 astrocytaire. D'un point de vue clinique, le handicap moteur est moins important chez les souris mutées que chez les souris contrôles. D'un point de vue anatomo-pathologique, ces mêmes animaux présentent une diminution de l'astroglie, corrélée à une diminution de l'expression astrocytaire du facteur pro-inflammatoire interleukin 6 (IL6), et des facteurs de perméabilisation vasculaire, thymidine phosphorylase (TYMP) et vascular endothelial growth factor A (VEGFA). *In vitro*, nous avons démontré que la signalisation juxtacrine DLL4-NOTCH1 dans les astrocytes réactifs participe au contrôle direct du niveau transcriptionnel d'IL6 et que l'inhibition de cette voie engendre une diminution de la production de TYMP et VEGFA. Enfin, nous avons prouvé que le traitement de souris C57BL/6 avec un anticorps monoclonal dirigé contre DLL4 réduit l'invalidité clinique dans un modèle d'EAE et permet le maintien de l'imperméabilité de la BHE.

Discussion : L'ensemble de ces données suggère que DLL4 induit une partie des effets délétères de l'astroglie durant l'EAE via la promotion de l'inflammation et la perturbation de la structure de la BHE. Ainsi, nous pensons que l'axe DLL4-NOTCH1, dans les astrocytes réactifs en contexte inflammatoire, représente une cible intéressante pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la prise en charge des pathologies neuro-inflammatoires comme la SEP, pour lesquelles les options thérapeutiques font encore cruellement défaut.

Abstract

Introduction: During neuroinflammation, astrocytes, which form an integral part of the neurovascular unit (NVU) with the vessels of the blood-brain barrier (BBB), undergo morphological and molecular changes known as "astrogliosis". They take the name of "reactive astrocytes", and have a complex phenotype with either beneficial or deleterious effects on the integrity of the BBB. To characterize the astrocytic transcriptome induced by astrogliosis in an inflammatory context, and thus gain a better understanding of its consequences for the central nervous system (CNS), the laboratory carried out a RNA sequencing on quiescent versus reactive human astrocytes in culture. This sequencing identified the delta like canonical Notch ligand 4 (DLL4) gene, a ligand of the NOTCH pathway, as being strongly overexpressed by reactive astrocytes *in vitro*. This observation was verified *in vivo* on cortical biopsies of active lesions from multiple sclerosis (MS) patients.

Objectives: Our aim is to study the contribution of DLL4-NOTCH1 signaling to the effects of astrogliosis under neuroinflammatory condition.

Methods: First, we developed two astrocytic-specific DLL4 gene inhibition murine models (DLL4ACKO mice), the first enabling partial inhibition and the second total inhibition of astrocytic DLL4. Then, we developed a preclinical model of systemic pharmacological inhibition based on a blocking monoclonal antibody directed against DLL4 injected into wild-type C57BL/6 mice. The neuroinflammation model we used is a mouse model of MS called experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), in which the animal is immunized against its own myelin. Lesion size, inflammation, demyelination and clinical disability were measured to assess the severity of the pathology. In parallel, we used *in vitro* primary human astrocytes incubated with interleukin 1 beta (IL1B) to mimic an inflammatory state and thus induce astrogliosis. In this model, DLL4 inhibition is achieved by treatment with a small interfering RNA (siRNA) directed against DLL4.

Results: *In vivo*, we observed a reduction in the severity of pathology in DLL4ACKO mice. From a clinical point of view, motor disability was less severe in mutated mice than in control mice. From an anatomical-pathological point of view, these same animals show a reduction in astrogliosis, correlated with a decrease in astrocytic expression of the pro-inflammatory factor interleukin 6 (IL6), and of the vascular permeability factors thymidine phosphorylase (TYMP) and vascular endothelial growth factor A (VEGFA). *In vitro*, we demonstrated that DLL4-NOTCH1 juxtacrine signaling in reactive astrocytes participates in the direct control of IL6 transcriptional levels, and that inhibition of this pathway results in a decrease in TYMP and VEGFA production. Finally, we have demonstrated that treatment of C57BL/6 mice with a monoclonal antibody directed against DLL4 reduces clinical disability in a model of EAE and maintains the impermeability of the BBB.

Discussion: Taken together, these data suggest that DLL4 induces some of the deleterious effects of astrogliosis during EAE by promoting inflammation and disrupting the structure of the BBB. Thus, we believe that the DLL4-NOTCH1 axis, in reactive astrocytes in an inflammatory context, represents an interesting target for the development of new therapeutic strategies for the management of neuroinflammatory pathologies such as MS, for which therapeutic options are still sorely lacking.

Remerciements

À mes rapportrices, Mme Carine Ali, Professeure des Universités à l'Université de Caen, et Mme Anne Cécile Boulay, Chargée de recherche au Collège de France, d'avoir accepté d'être rapportrices de ce manuscrit. Merci pour les échanges et la bonne humeur lors des différents congrès où nous nous sommes croisés.

A mes examinateurs, Mme Aude Panatier, Directrice de recherche au Bordeaux neurocampus, pour les commentaires constructifs et bienveillants lors de mon comité de suivi de mi-thèse et Monsieur Thomas Tourdias, Professeur des Universités à l'Université de Bordeaux et Praticien Hospitalier au CHU de Bordeaux, pour avoir accepté de juger ce travail.

À ma directrice de thèse, Mme Candice Chapouly, Chargée de recherche au sein de l'unité INSERM U1034, pour son encadrement, sa patience et sa disponibilité durant cette thèse. Tu as su me redonner foi dans les moments les plus difficiles et je t'en suis reconnaissant

Au directeur de l'unité Inserm 1034, Mr Thierry Couffinhal, Professeur des Universités à l'Université de Bordeaux et Praticien Hospitalier au CHU de Bordeaux, de m'avoir accueilli dans l'unité.

Table des matières

Résumé.....	2
Abstract	3
Remerciements	4
Table des matières	5
Liste des figures.....	9
Liste des tables	11
Liste des abréviations.....	12
Introduction.....	14
1. La sclérose en plaque	14
1.1. Historique de la SEP.....	14
1.1.1. Les premières observations anatomopathologiques chez l’homme	14
1.1.2. Les modèles animaux	15
1.1.1.1. EAE.....	15
1.1.1.2. L’adoption passive.....	16
1.1.1.3. Le modèle cuprizone	17
1.2. Epidémiologie SEP	17
1.2.1. Facteurs de risque environnementaux.....	18
1.2.1.1. Tabac	18
1.2.1.2. Obésité infantile	18
1.2.1.3. Vitamine D.....	18
1.2.1.4. Epstein Barr Virus	19
1.2.2. Facteurs de risque génétiques	19
1.3. Formes évolutives de la SEP	20
1.4. Éléments diagnostiques de l’atteinte de l’UNV dans la SEP.....	22
2. Organisation de l’unité neuro-vasculaire	23
2.1. Cellules endothéliales.....	24
2.2. Les jonctions étanches ou jonctions serrées.....	25
2.2.1. Claudin.....	25
2.2.2. MARVEL	25
2.2.3. Immunoglobulines.....	26
2.3. Les jonctions adhérentes.....	26
2.4. Péricytes et cellules murales	27

2.5.	Membrane basale.....	27
2.6.	Espace périvasculaire	28
2.7.	Astrocyte et membrane basale astrocytaire	28
2.8.	Microglie.....	29
3.	Rôles de l'UNV dans la physiopathologie de la SEP	29
3.1.	Dysfonction vasculaire	29
3.1.1.	Débit sanguin cérébral	29
3.1.2.	Perméabilisation vasculaire.....	30
3.1.2.1.	Perturbation des jonctions endothéliales	31
3.1.2.2.	Marqueurs d'activation endothéliales	31
3.2.	Voies d'entrée de l'infiltration lymphocytaire dans le SNC.....	32
3.2.1.	Passage au niveau des veinules post-capillaires	32
3.2.1.1.	Passage de l'endothélium	33
3.2.1.2.	Passage de l'espace périvasculaire.....	34
3.2.1.3.	Passage de la glia limitans	35
3.2.2.	Passage au niveau de la barrière arachnoïde.....	35
3.2.3.	Le plexus choroïde.....	37
3.3.	Lymphocytes.....	39
3.3.1.	Généralités	39
3.3.2.	Le cas de la SEP et de l'EAE.....	41
3.3.2.1.	TCD8	41
3.3.2.2.	TCD4	42
3.3.2.3.	Lymphocyte et neurodégénérescence dans la SEP/EAE	43
4.	Astrocytes.....	44
4.1.	Production des astrocytes	44
4.1.1.	Différenciation depuis les cellules souches neurales	44
4.1.1.1.	Différenciation des cellules souches neurales en précurseurs astrocytaires	44
4.1.1.2.	Migration depuis les centres germinaux.....	45
4.1.2.	Différenciation depuis les précurseurs de la zone subventriculaire	45
4.1.3.	Prolifération locale d'astrocytes.....	45
4.2.	Morphologie des astrocytes.....	46
4.2.1.	Hétérogénéité en conditions physiologiques.....	46
4.2.2.	Polarisation des astrocytes.....	46
4.3.	Rôle des astrocytes en conditions physiologiques.....	47
4.3.1.	Métabolisme.....	47
4.3.2.	Régulation du débit sanguin.....	48

4.3.3.	Développement vasculaire et maintenance de l'UNV	51
4.3.3.1.	Développement.....	51
4.3.3.2.	Age adulte	52
4.3.4.	Immunoquiescence du SNC.....	52
4.4.	Réactivité astrocytaire.....	53
4.4.1.	Les astrocytes A1 et A2	53
4.4.2.	L'apport du séquençage en cellule unique.....	54
4.4.3.	Les marqueurs d'astrocytes réactifs.....	54
5.	Astrocyte en conditions neuro-inflammatoires	55
5.1.	Hétérogénéité de la réponse.....	55
5.2.	La cicatrice gliale.....	56
5.3.	Impact de l'activation astrocytaire sur l'intégrité de la BHE et l'infiltrat inflammatoire dans la SEP.....	57
5.3.1.	Astrocyte et cellules endothéliales	57
5.3.1.1.	Vascular endothelial growth factor A (VEGFA)	58
5.3.1.2.	Tymidine phosphorylase (TYMP).....	59
5.3.1.3.	Voie hedgehog.....	60
5.3.2.	Astrocytes et cellules inflammatoires	61
5.3.2.1.	Facteurs solubles.....	61
5.3.2.2.	Production des chimiokines et cytokines et régulation	66
6.	La voie NOTCH.....	67
6.1.	L'architecture de la voie	67
6.1.1.	Récepteurs.....	67
6.1.2.	Ligands.....	68
6.2.	Interaction ligand récepteur.....	68
6.2.1.	Cis-inhibition.....	69
6.2.2.	Voie canonique.....	69
6.2.3.	Voie non canonique.....	70
6.3.	Rôle de la voie Notch dans le développement et l'homéostasie des différents systèmes.....	71
6.3.1.	Système vasculaire	71
6.3.2.	Système hématopoïétique	73
6.3.3.	SNC	73
6.4.	Thérapeutiques anti-NOTCH	76
6.4.1.	Thérapeutiques non ciblées	76
6.4.2.	Thérapeutique ciblée.....	76
6.4.2.1.	DLL3	76

6.4.2.2. DLL4	77
6.4.2.3. NOTCH1	77
6.4.2.4. NOTCH2 et NOTCH 3	77
7. Astrogliose et voie NOTCH	78
7.1. Sclérose latérale amyotrophique	78
7.2. Accident Vasculaire Cérébral.....	80
7.3. Lésion traumatique	81
7.3.1. Moelle épinière	81
7.3.2. Cerveau.....	82
7.4. Amyotrophie spinale	82
7.5. Hypoxie.....	83
7.6. Stress oxydant	83
7.7. Encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE)	84
Objectifs	86
Matériel et méthodes.....	87
1. Souris	87
1.1. Souris transgéniques	87
1.2. Hébergement.....	87
1.3. Induction de l'EAE.....	88
1.4. Injection stéréotaxique	89
2. Immunoprécipitation de la chromatine	89
Résultats.....	91
Discussion.....	153
Références.....	159
Communications et vulgarisation scientifiques	184
Annexes	186
A. Annexe 1 : Mora P, Hollier PL, Guimbal S, et al. Blood-brain barrier genetic disruption leads to protective barrier formation at the Glia Limitans. <i>PLoS Biol.</i> 2020;18(11):e3000946. Published 2020 Nov 30. doi:10.1371/journal.pbio.3000946	186
B. Annexe2 : Mora P, Chapouly C. Astrogliosis in multiple sclerosis and neuro-inflammation: what role for the notch pathway?. <i>Front Immunol.</i> 2023;14:1254586. Published 2023 Oct 23. doi:10.3389/fimmu.2023.1254586	186

Liste des figures

Figure 1 Illustration de lésions scléreuses de moelle épinière par Sir Robert Carswell.....	14
Figure 2 Échelle de scoring des souris atteintes d'EAE induite par le MOG.....	16
Figure 3 Prévalence de la sclérose en plaque pour 100 000 habitants dans le monde en 2020 - source : www.atlasofms.org	17
Figure 4 Facteurs de risque de la SEP	18
Figure 5 Formes évolutives de la SEP définies en 1996	20
Figure 6 A) et B) Coupe axiale en séquence pondérée en T1 après injection de gadolinium montrant une lésion active (cercle jaune) en A et des lésion ancienne en B. C) Coupe axiale en séquence pondérée en T2 indiquant une lésion peu visible (cercle rouge) et D) Coupe axiale pondérée en T2 FLAIR indiquant une lésion bien visible (cercle rouge)	23
Figure 7 Schéma de l'organisation de l'unité neuro-vasculaire	24
Figure 8 Jonctions serrées et jonctions adhérentes entre deux cellules endothéliales.....	26
Figure 9 Schématisation des phénomènes de roulement, d'arrêt /adhésion puis diapédèse trans- et para-cellulaire des lymphocytes.....	33
Figure 10 Schéma des méninges au niveau du crâne	36
Figure 11 Localisation du plexus choroïde au sein des ventricules cérébraux	37
Figure 12 Schéma de l'organisation d'une villosité de plexus choroïde	38
Figure 13 Schématisation des différents types de lymphocytes issus des progéniteurs lymphoïdes communs.....	39
Figure 14 Représentation d'astrocyte protoplasmique en (A) et d'astrocyte fibreux en (B).....	46
Figure 15 Schématisation simplifiée de la navette lactate entre les astrocytes et les neurones	48
Figure 16 Mécanismes de régulation de la vasodilatation et de la vasoconstriction par les astrocytes	50
Figure 17 Schématisation simplifiée de l'astrogliose	53
Figure 18 Astrocytes réactifs formant une cicatrice gliale, séquestrant les cellules immunitaires	56
Figure 19 Récapitulatif des facteurs sécrétés par les astrocytes réactifs au cours de la neuro-inflammation (les facteurs délétères sont en rouge et les facteurs protecteurs en vert).	57
Figure 20 Schématisation des interactions entre les VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 et leurs ligands	59
Figure 21 Schéma simplifié de la voie Hh.....	60
Figure 22 Ligands et récepteurs de la voie NOTCH.....	67
Figure 23 Schématisation de la voie canonique de la voie NOTCH.....	70
Figure 24 Régulation de l'angiogénèse via la voie NOTCH.....	72
Figure 25 Effet de l'activation de la voie NOTCH sur la différenciation des cellules issues des progéniteurs neuraux.....	75
Figure 26 Fonctionnement du système de recombinaison Cre loxP inducible par le tamoxifène	87
Figure 27 Protocole d'induction de l'EAE avec le MOG.....	88
Figure 28 Schéma de l'installation de l'animal dans le cadre stéréotaxique et endroit de l'injection..	89
Figure 29 Protocole d'immunoprécipitation de la chromatine.....	90
Figure 30 Comparaison du nombre de vaisseaux dans la moelle épinière de souris DLLA ^{ACKOC} versus contrôle	155

Figure 31 Effet de l'injection d'un anticorps monoclonal anti-IL6, le siltuximab, sur le développement de l'EAE chez la souris 157

Liste des tables

Tableau 1 Marqueurs d'astrocytes réactifs définis par Escartin et al. utilisés dans la suite du manuscrit	54
Tableau 2 Tableau récapitulatif de l'activité de la voie NOTCH in vivo dans diverses conditions neuro-inflammatoires	79
Tableau 3 Effet de condition de culture pathologique sur l'activation de la voie NOTCH dans des astrocytes primaires	83

Liste des abréviations

ARN	Acide ribonucléique
BCR	B cell receptor
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CD4	Cluster de différenciation 4
CD8	Cluster de différenciation 8
CML	Cellule musculaire lisse
EAE	Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EBV	Epstein Barr virus
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LCS	Liquide cérébro-spinal (ou liquide cérébro-rachidien)
CMH	Complexe major d'histocompatibilité
PAP	Processus astrocytaire péri-synaptique
PvAP	Processus astrocytaire péri-vasculaire
scRNAseq	Séquençage de l'ARN en cellule unique
SEP	Sclérose en plaque
SEP-PP	Sclérose en plaque progressive primaire
SEP-PR	Sclérose en plaque progressive rémittente
SEP-RR	Sclérose en plaque récurrente rémittente
SEP-SP	Sclérose en plaque secondairement progressive
SNC	Système nerveux central
SVZ	Zone sub-ventriculaire
TC	Lymphocyte T cytotoxique
TCR	T cell receptor
TH	Lymphocyte T helper (ou auxiliaire)
UNV	Unité neuro-vasculaire

Introduction

1. La sclérose en plaque

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune inflammatoire touchant le système nerveux central (SNC) qui entraîne des perturbations motrices, sensibles, cognitives, visuelles et sphinctériennes.

C'est une maladie neurologique évolutive touchant l'adulte jeune dont les signes et symptômes sont variés et parfois peu visibles ou non spécifiques.

1.1. Historique de la SEP

1.1.1. Les premières observations anatomopathologiques chez l'homme

Les plus anciennes descriptions évocatrices de la SEP remontent au XIV^{ème} siècle avec Lidwine de Schiedam, sainte patronne des patineurs sur glace, qui présentait une maladie progressant lentement

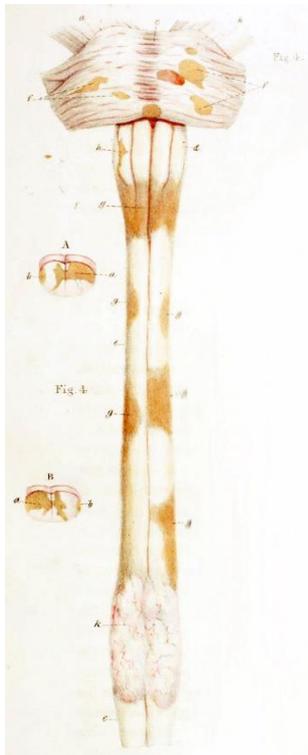


Figure 1 Illustration de lésions scléreuses de moelle épinière par Sir Robert Carswell

avec des périodes de récupération et dont la symptomatologie était composée de trouble de la marche, d'une paralysie du membre supérieur droit, d'une perte de la vue unilatérale, de douleurs faciales lancinantes et de trouble à la déglutition (Medaer 1979).

Dans la première moitié du XIX^{ème} siècle, des atlas d'anatomopathologie, par Jean Cruveilhier (Cruveilhier 1829) et Sir Robert Carswell (Carswell 1838), s'intéressent à la moelle épinière et proposent des illustrations de lésions sclérotiques spinales.

Il faut cependant attendre 1868 pour que Jean-Marie Charcot, grâce à son approche anatomo-clinique, fasse le lien entre ces observations histologiques post-mortem de lésions sclérotiques médullaires et les signes cliniques décrits depuis plusieurs siècles. Il décrit la pathogénèse de la maladie, démyélinisation et prolifération gliale, et propose ainsi les critères diagnostic de la pathologie qu'il nomme la SEP. Ces signes, dysarthrie, nystagmus et tremblement intentionnel, prennent alors le nom de triade de Charcot (Charcot 1869).

1.1.2. Les modèles animaux

1.1.1.1. EAE

Il faut attendre le développement des modèles animaux de SEP pour qu'un début d'explication causale de la SEP soit avancé. Le modèle animal le plus utilisé et le plus connu est celui d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) durant laquelle l'auto-immunité pour des composants du SNC est induite par l'immunisation avec des auto-antigènes dérivés de la protéine basique de la myéline.

Dans les années 1930, Koritschoner et Schweinburg ont provoqué une paralysie chez le lapin après l'injection de broyat de moelles épinières humaines. Les travaux de Stuart et Krikorian ont par la suite confirmé les résultats obtenus chez le lapin en reproduisant cette expérience avec des broyats de cerveaux ovins (Stuart et Krikorian 1928; 1930). Dans ses travaux sur le primate non humain, après injection de broyat de cerveaux de lapins, Rivers associe la clinique (anomalie de la marche et faiblesse musculaire) à une dégradation de la myéline et des changements périvasculaires. Parmi ces changements, ils notent une prolifération gliale et l'infiltration de cellules mononuclées et de polynucléaires éosinophiles (Rivers et Schwentker 1935).

L'ajout ultérieur d'adjuvant de Freund (Freund, Stern, et Pisani 1947; Freund et McDermott 1942) puis de toxine pertussique (Munoz, Bernard, et Mackay 1984) aux broyats de cerveaux a ensuite permis d'en augmenter l'immunogénicité en potentialisant la réponse humorale.

À ce jour, le protocole d'induction de l'EAE est parfaitement harmonisé et les broyats de cerveaux sont remplacés par des fragments de myéline de taille connue appelés myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG). Les fragments les plus utilisés sont composés des acides aminés 35 à 55 (MOG₃₅₋₅₅) (Bernard et al. 1997).

Chez la souris, l'EAE est caractérisée par une paralysie ascendante commençant au niveau de la queue au dixième jour post induction en moyenne et remontant progressivement au membre postérieur puis antérieur. L'évaluation clinique des souris est faite selon une échelle de score allant de 0 à 5, 0 correspondant à l'absence de symptômes et 5 à une paralysie presque totale nécessitant l'euthanasie de l'animal.

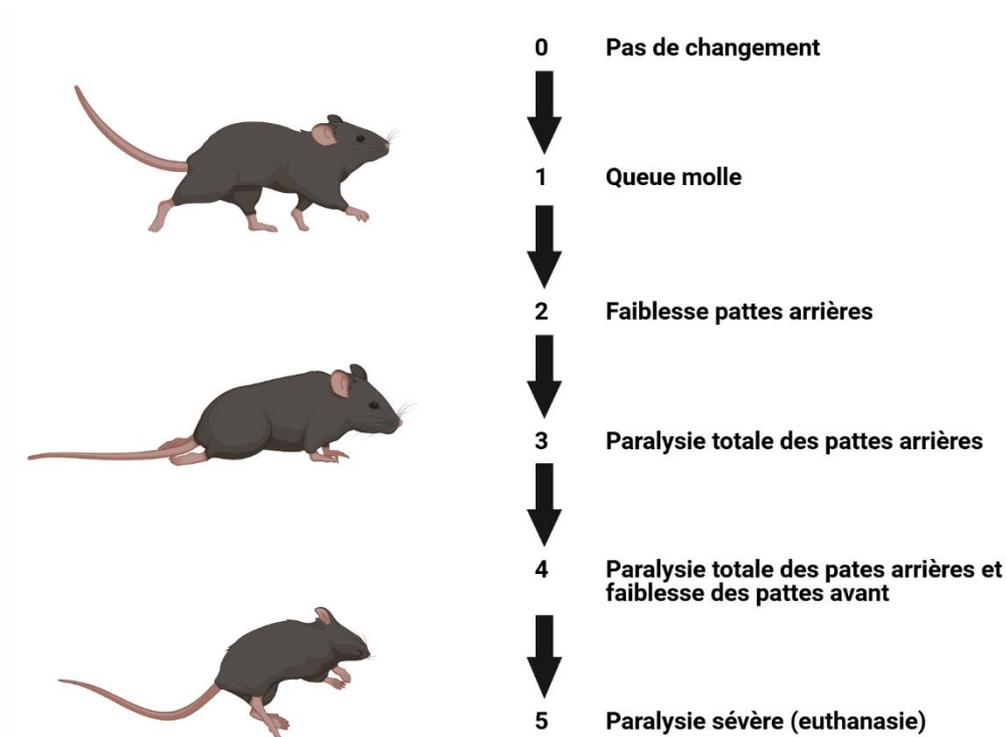


Figure 2 Échelle de scoring des souris atteintes d'EAE induite par le MOG

L'EAE induite par le MOG a permis une compréhension des aspects auto-immuns et neuro-inflammatoire de la SEP. Cependant ce modèle possède des limites : absence de re-myélinisation ; localisation au niveau de la moelle épinière des lésions d'EAE induite par le MOG chez la souris contrairement à la SEP où les lésions apparaissent majoritairement au niveau du cerveau et enfin l'implication majoritaire des cellules CD4+ dans l'EAE qui ne traduit pas l'implication des différents types cellulaires dans la SEP (Lassmann et Bradl 2017).

1.1.1.2. L'adoption passive

Dès les années 60, Patterson a montré que l'injection de lymphocytes issus de ganglions lymphatiques de rats immunisés contre des broyats de cerveaux, les rats donneurs, permet le développement d'une encéphalomyélite allergique chez les rats receveurs (Paterson 1960).

Ce modèle a permis de démontrer comment les lymphocytes T pénètrent dans le parenchyme cérébral (Flügel et al. 2001), la réactivation des lymphocytes au sein du SNC (Mues et al. 2013) ainsi que l'importance de la polarisation des lymphocytes dans la localisation des lésions (Pierson et al. 2012).

1.1.1.3. Le modèle cuprizone

Afin d'étudier les phénomènes de démyélinisation et de re-myélinisation, des modèles de démyélinisation toxique qui permettent de faire abstraction des complications inflammatoires de l'EAE induite par le MOG, peuvent être utilisés.

Le modèle le plus utilisé est le modèle cuprizone qui consiste à nourrir les animaux avec de la cuprizone, un chélateur du cuivre, causant l'apoptose des oligodendrocytes via l'induction d'un stress métabolique et ainsi une démyélinisation réversible (Gudi et al. 2014).

1.2. Epidémiologie SEP

Plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence une augmentation de l'incidence de la SEP de l'ordre de 15% depuis 2013 amenant l'incidence moyenne à l'échelle mondiale en 2020 à 43,95 pour 100 000 personnes (intervalle de confiance à 95% [43,90 ; 44,01]) avec une forte disparité locorégionale, les pays d'Europe et d'Amérique étant plus touchés que les pays d'Asie ou d'Afrique. (Koch-Henriksen et Magyari 2021).

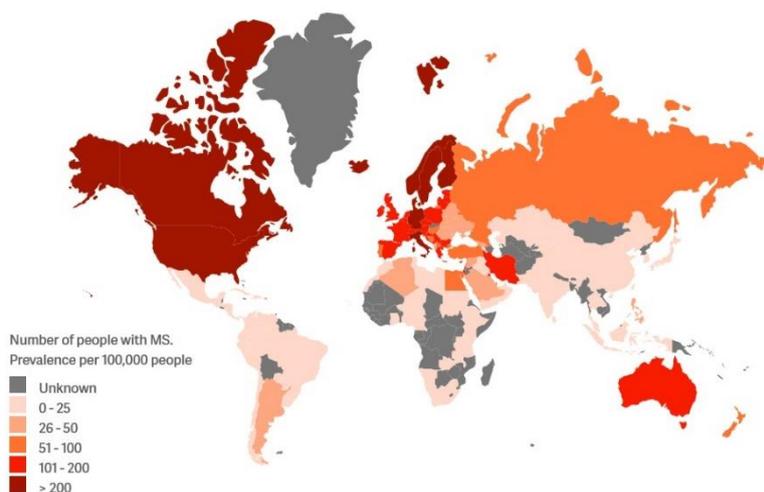


Figure 3 Prévalence de la sclérose en plaque pour 100 000 habitants dans le monde en 2020 - source : www.atlasofms.org

Maladie de l'adulte jeune, la SEP est deux fois plus fréquente chez les femmes que chez les hommes (Boström et Landtblom 2015).

Une des limites majeures des études épidémiologiques est qu'elles reposent sur des déclarations d'incidence et de prévalence par les pays. La fiabilité variable des bases de données à travers le monde

explique donc en partie les différences observées.

Ces différences épidémiologiques géographiques, au-delà de la performance déclarative des différents systèmes de santé nationaux, traduisent l'existence de facteurs génétiques prédisposant et de facteurs de risques environnementaux.

1.2.1. Facteurs de risque environnementaux

1.2.1.1. Tabac

La consommation de tabac est corrélée à une augmentation du risque de SEP (Hawkes 2007; Handel et al. 2011). Une relation dose-réponse a ainsi été mise en évidence, la dose cumulée de tabac étant associée à une augmentation de l'incidence de la SEP (Ghadirian et al. 2001). Une explication proposée

à cette association est l'irritation pulmonaire causée par la fumée du tabac qui activerait le système immunitaire (Hedström et al. 2011)

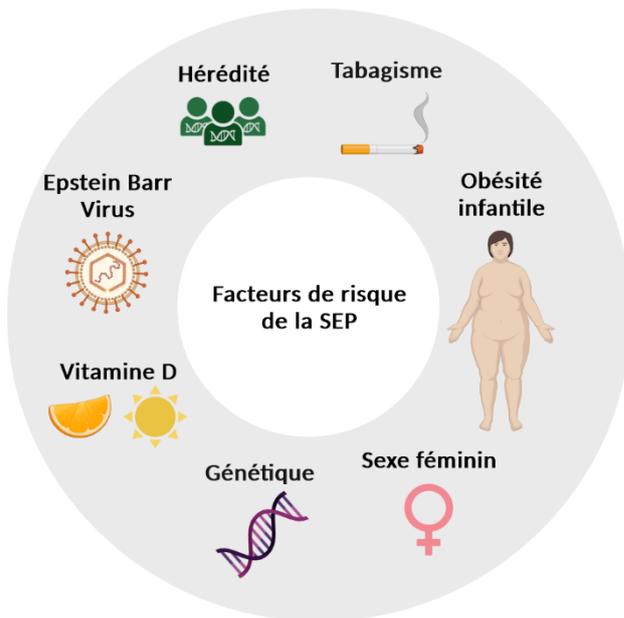


Figure 4 Facteurs de risque de la SEP

1.2.1.2. Obésité infantile

L'obésité provoque une inflammation de bas grade. Une association entre obésité infantile et SEP dans l'enfance a été mise en évidence. Cette association n'est pas retrouvée chez l'adulte, l'indice de masse corporelle au diagnostic n'étant pas indicatif. Cependant, l'association existe entre obésité à l'adolescence et SEP à l'âge

adulte.

1.2.1.3. Vitamine D

La question de l'exposition solaire / vitamine D et SEP a été découverte suite à l'observation d'une différence de prévalence et d'incidence dépendant de la latitude (Koch-Henriksen et Sørensen 2010). L'association entre faible concentration sérique en vitamine D et incidence de la SEP a été démontrée dans de nombreuses études épidémiologiques. Chez les patients atteints de SEP, un taux élevé de vitamine D sérique est également associé à un plus faible taux de rechute.

En 2022, une équipe anglaise a étudié l'impact de six polymorphismes nucléotidiques (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) mis en évidence dans l'étude SUNLIGHT, sur les taux sanguins de vitamine D de patients atteints de SEP et de patients sains. Chez les patients sains et les patients atteints de SEP non supplémentés en vitamine D, le score de risque génétique basé sur les SNPs est corrélé à la concentration sérique en vitamine D. Chez les patients supplémentés, cette association

n'est pas retrouvée, faisant de l'apport en vitamine D un élément important de la prise en charge des malades. (Kuri et al. 2022)

1.2.1.4. Epstein Barr Virus

L'association entre maladie auto-immune et infection virale est connue et étudiée depuis longtemps. Le virus Epstein-Barr (Epstein-Barr virus, EBV) a été identifié depuis longtemps comme associé à la SEP en raison d'une incidence de la maladie augmentée chez les patients préalablement atteints de mononucléose infectieuse, de concentrations sériques élevées en anticorps dirigés contre l'EBV chez les patients atteints de SEP et de la présence d'EBV dans les plaques démyélinisantes de certains malades. Début 2022, une étude de cohorte longitudinale, menée durant 20 ans chez des militaires appartenant au Corps des Marines des États-Unis, a permis de mettre en évidence une relation causale entre le virus et le développement de la maladie (Bjornevik et al. 2022)

1.2.2. Facteurs de risque génétiques

La SEP est en partie héréditaire. En effet, le risque de développer la maladie dans la population générale est de 1 sur 1 000 alors qu'il est de 1 sur 4 chez les jumeaux homozygotes quand l'un est atteint. Des études d'association pangénomique (Genome-Wide Association Study, GWAS) ont mis en évidence que la variabilité dans les régions régulatrices de gènes de l'immunité est en grande partie responsable de l'aspect héréditaire de la SEP.

La base de donnée développée par l'International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, un consortium de membres académiques focalisé sur l'impact de l'hérédité sur l'étiologie, la pathogenèse, l'évolution clinique et la réponse au traitement de la SEP, a mis en évidence une association significative pour 233 variants géniques, parmi lesquels 32 concernent les antigènes des leucocytes humains (HLA de l'anglais human leukocyte antigen), le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH ou MHC de l'anglais major histocompatibility complex) chez l'humain (Parnell et Booth 2017).

Le premier variant génétique identifié concerne le gène *HLA-DRB1* qui code pour la sous-unité beta de HLA-DR, un récepteur de surface du CMH de classe 2 qui permet la présentation des antigènes aux lymphocytes T auxiliaires CD4+ (*développé en page 39 - Généralités*). Le variant 15:01 de ce gène augmente le risque de développer une SEP par trois (Olerup et Hillert 1991).

1.3. Formes évolutives de la SEP

Le diagnostic positif de SEP est posé sur des arguments cliniques et para-cliniques. Afin d'homogénéiser ce diagnostic, les critères de Mc Donald ont été élaborés par l'*International panel on diagnosis of multiple sclerosis* composé de neurologues européens et américains. Ces critères reposent sur une dissémination spatiale et temporelle des lésions (Thompson et al. 2018).

Malgré ces critères diagnostics communs, les différentes présentations cliniques de la SEP sont extrêmement hétérogènes.

Dès 1996, un consensus américano-européen, *The International Advisory Committee on Clinical Trials in Multiple Sclerosis*, a classé les différentes formes évolutives de la SEP en quatre catégories (Lublin et Reingold 1996) :

- La forme récurrente-rémittente (SEP-RR)
- La forme secondairement progressive (SEP-SP)
- La forme progressive primaire (SEP-PP)
- La forme récurrente-progressive (SEP-PR)

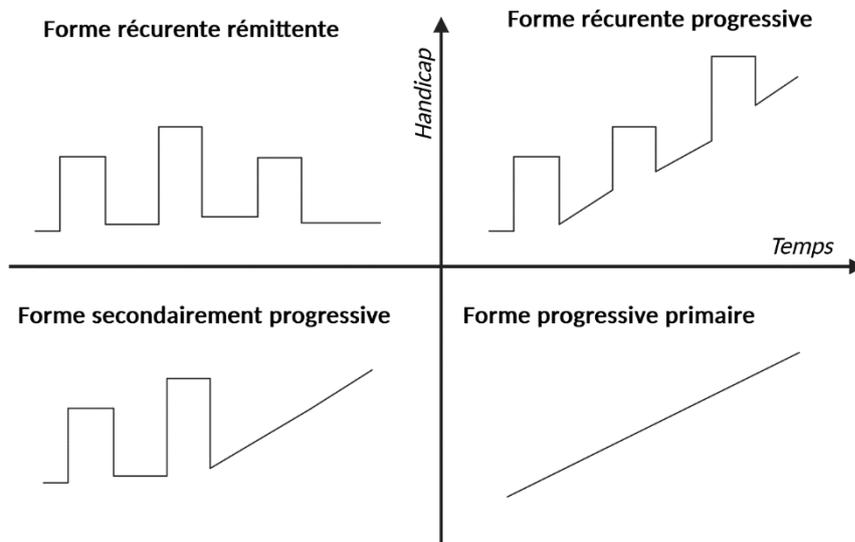


Figure 5 Formes évolutives de la SEP définies en 1996

La SEP-RR se caractérise par une alternance de poussées, ou crises, et de périodes de récupération complète. Les crises se développent de manière graduelle, sur plusieurs jours. C'est la forme la plus fréquente au diagnostic, 85% des

cas. Les patients atteints de SEP-RR peuvent ensuite développer une SEP-SP correspondant à une évolution continue des symptômes. La SEP-PP correspond à une détérioration continue et progressive des fonctions neurologiques, sans périodes de récupération franche mais avec de potentielles phases de plateau ou d'amélioration mineure. Elle concerne 10 à 15 % des patients au diagnostic et touche plus volontiers les hommes. L'âge moyen au diagnostic est également plus élevé (40 ans versus 30 ans

pour les formes RR). La SEP-PR, beaucoup plus rare, correspond à une forme progressive primaire avec des épisodes de poussées aiguës, avec ou sans périodes de récupération (Lublin et Reingold 1996).

En 2013, une actualisation de ces recommandations introduit un nouveau syndrome, le syndrome clinique isolé, et les auteurs proposent deux notions permettant la caractérisation de la maladie : l'activité de la maladie et la progression de la maladie (Lublin et al. 2014).

Le syndrome clinique isolé correspond à la première présentation clinique d'un épisode qui possède les signes caractéristiques d'une maladie démyélinisante sans remplir la totalité des critères de Mac Donald permettant de poser le diagnostic et notamment la notion de dissémination temporelle, *i.e.* une ou plusieurs lésions caractéristiques de la sclérose en plaques dans au moins deux des quatre régions du SNC : périventriculaire, corticale ou juxtacorticale, infratentorielle, ainsi que la moelle épinière (Thompson et al. 2018).

L'évaluation de l'activité peut être clinique (signes cliniques de rechutes) ou se faire grâce à l'imagerie. La progression est déterminée sur des preuves cliniques d'aggravation du handicap.

Ainsi, les nouveaux phénotypes proposés sont les suivants (Lublin et al. 2014) :

Maladie rémittente :

- Syndrome clinique isolé actif
- Syndrome clinique isolé non actif
- SEP-RR active
- SEP-RR non active

Maladie progressive : SEP-PP ou SEP-SP

- Maladie progressive active avec progression
- Maladie progressive active sans progression
- Maladie progressive non active avec progression
- Maladie progressive non active sans progression (maladie stable)

En parallèle de la progression, la notion d'aggravation de la maladie a été définie en 2020. Contrairement à la progression qui correspond à une accumulation de l'invalidité, indépendamment de toutes rechutes, pendant la phase de progression, l'aggravation de la maladie correspond à l'augmentation du handicap qu'elle provienne d'un déficit résiduel de rechute ou d'un handicap progressif pendant la phase d'évolution de la maladie (Lublin et al. 2020).

1.4. Éléments diagnostiques de l'atteinte de l'UNV dans la SEP

C'est dans la deuxième moitié du XX^{ème} siècle, grâce aux progrès de l'imagerie médicale basée sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire, que les lésions observées post-mortem par Charcot deviennent visualisables chez le sujet vivant.

À ce jour, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) constitue un examen clé dans le diagnostic de SEP et permet la visualisation, selon les séquences, de zones de démyélinisation, de lésions axonales et de l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Wattjes et al. 2021).

En effet, sous l'influence d'une onde radio à une fréquence déterminée (fréquence de Larmor), l'aimantation des noyaux d'hydrogène pivote et se retrouve dans le plan transversal. Lors de la relaxation, l'aimantation retourne à sa position d'équilibre selon une dynamique qui permet de définir 2 constantes selon les temps de relaxation transversale et longitudinale, respectivement T2 et T1. La modification des temps d'écho, *i.e.* l'intervalle entre la bascule dans le plan transversal et la mesure du signal, et le temps de relaxation, *i.e.* l'intervalle séparant deux répétitions (impulsion de 90°), permet de maximiser le contraste T1 et T2. Ainsi, en fonction de la pondération utilisée et des propriétés de relaxation longitudinale et transversale des différents tissus, ces derniers peuvent être différenciés et apparaître soit en hyper-signal soit en hypo-signal. D'autres séquences existent, notamment l'inversion récupération, qui, en faisant précéder l'impulsion initiale de 90° d'une impulsion de 180°, permet d'obtenir un contraste différent dans certains tissus. Ainsi, en séquence FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery) par exemple, l'eau libre apparaît hypo-intense.

Chez les patients atteints de SEP, en T2 et en séquence FLAIR, les foyers de démyélinisation apparaissent en hyper-signal sous la forme de lésions rondes ou ovoïdes siégeant dans la substance blanche périventriculaire. En T1, des lésions hypo-denses sont parfois visibles et traduisent l'existence

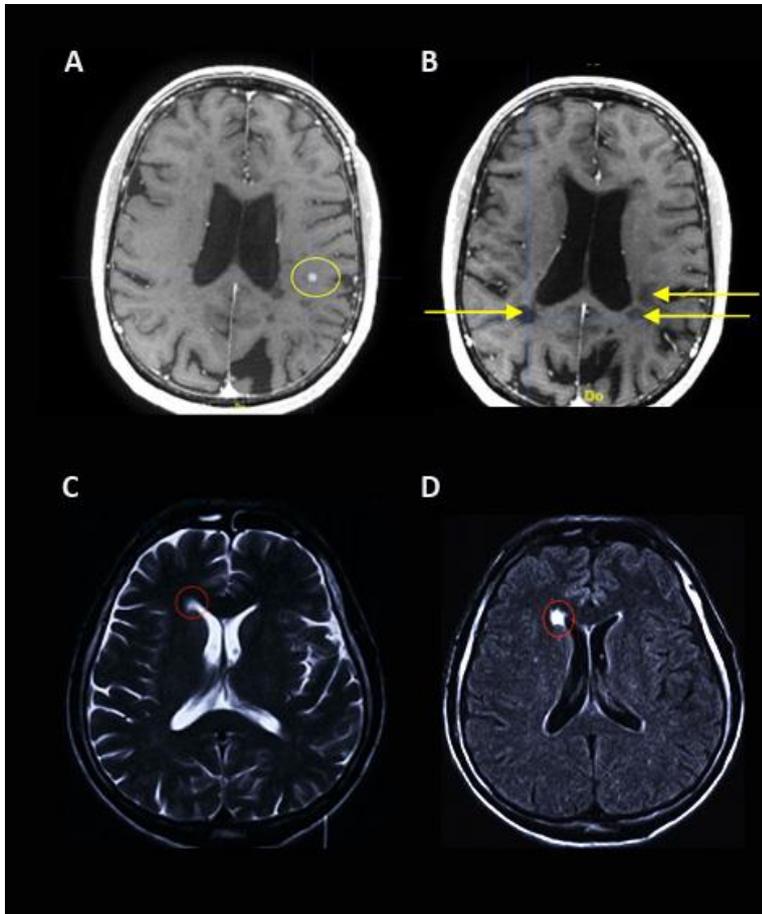


Figure 6 A) et B) Coupe axiale en séquence pondérée en T1 après injection de gadolinium montrant une lésion active (cercle jaune) en A et des lésion ancienne en B. C) Coupe axiale en séquence pondérée en T2 indiquant une lésion peu visible (cercle rouge) et D) Coupe axiale pondérée en T2 FLAIR indiquant une lésion bien visible (cercle rouge)

de lésions axonales. L'injection de chélate de gadolinium (Gd) sur les séquences pondérées en T1 permet la détection de la rupture de la BHE, corrélée à la phase inflammatoire de la lésion, et traduit ainsi une lésion active et récente (Saade et al. 2018).

Le Gd possède cependant des limites dues à son manque de sensibilité et de spécificité. D'autres marqueurs de neuro-inflammation active sont en développement parmi lesquels les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques possédant une meilleure diffusion à travers une BHE altérée ou la Gadofluorine, un complexe amphiphilique de Gd se liant à l'albumine et qui possède ainsi une excellente sensibilité et spécificité (Tourdias et Dousset 2013).

La perturbation de la BHE, et plus largement de l'unité neuro-vasculaire (UNV), est un élément précoce et fondamental dans la pathogénèse de la maladie et participe en partie au diagnostic de SEP.

2. Organisation de l'unité neuro-vasculaire

Le SNC a une consommation énergétique importante mais une capacité de stockage très faible. Cette consommation énergétique massive nécessite un échange permanent entre le sang et le cerveau. Ainsi, alors qu'il représente seulement 2% de la masse du corps humain, le SNC reçoit plus de 20% du débit sanguin afin de satisfaire ses besoins en oxygène et nutriments (Meng et al. 2015; Xing et al.

2017). Cependant, le SNC est aussi un tissu fragile, avec une faible capacité de renouvellement, qui nécessite de ce fait une protection vis-à-vis des microorganismes.

En condition physiologique, le SNC est protégé des éléments endogènes et exogènes présents dans la circulation systémique par une barrière physique qui, chez les vertébrés, est appelée BHE. La BHE, qui représente un avantage évolutif majeur, possède une structure unique lui permettant de répondre aux besoins spécifiques du parenchyme en termes de métabolisme. La structure de la BHE, hautement complexe, fait l'objet de nombreuses études et présente encore aujourd'hui de nombreuses zones d'ombre.

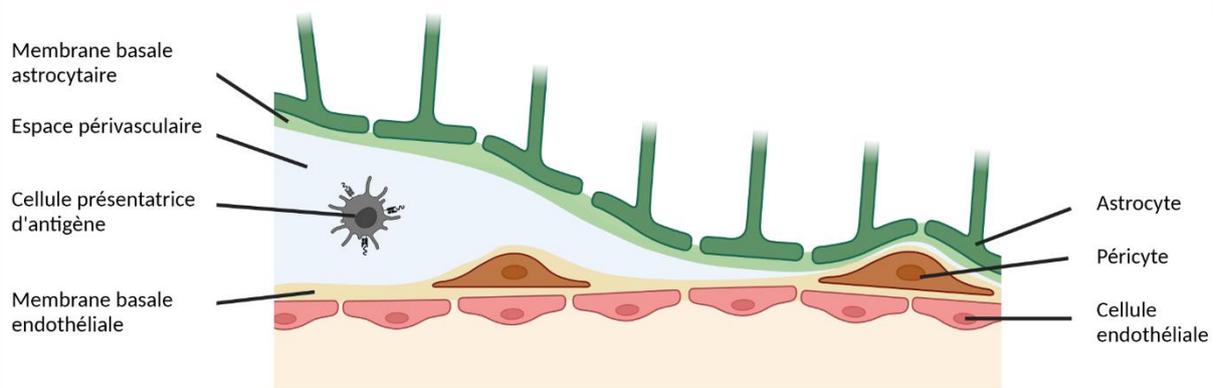


Figure 7 Schéma de l'organisation de l'unité neuro-vasculaire

À l'origine, cette barrière était décrite comme majoritairement de nature endothéliale en association avec les cellules murales, péricytes ou cellules musculaires lisses (CMLs), et la matrice basale. Cependant, cette vision simpliste de la barrière sang cerveau ne comprenant que des cellules endothéliales et une membrane basale est depuis longtemps dépassée. La complexification de la BHE avec la découverte de nouveaux types cellulaires tels que la microglie et les astrocytes au sein de sa structure ont permis l'émergence d'un nouveau concept consensuel, celui d'UNV.

2.1. Cellules endothéliales

Le passage au sein du parenchyme est finement régulé au sein des capillaires cérébraux. Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux sont fortement liées afin d'assurer l'étanchéité des vaisseaux, restreindre le passage paracellulaire et contrôler le passage des éléments cellulaires et protéiques.

La liaison des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (BCECs, de l'anglais *Brain Capillaries Endothelial Cells*) est assurée par la présence de complexes jonctionnels comprenant des jonctions apicales, appelées jonctions serrées, et des jonctions basales, appelées jonctions adhérentes.

2.2. Les jonctions étanches ou jonctions serrées

Les jonctions serrées, également appelées jonctions étanches, des cellules endothéliales restreignent le passage des éléments de faible poids moléculaire tels que les ions et les molécules de taille inférieure à 800 Daltons. Les protéines transmembranaires impliquées dans l'établissement des jonctions serrées sont de trois types : les protéines de la famille claudin (CLDN), les protéines de la famille MARVEL associées aux jonctions serrées et les protéines de type immunoglobulines (Bauer et al. 2014).

2.2.1. Claudin

La famille de protéines CLDN comprend plus de 27 isoformes (Mineta et al. 2011). Elles sont le véritable pilier des jonctions serrées. L'isoforme majoritaire au niveau des BCECs est la claudin 5 (CLDN5). D'autres isoformes sont présents mais jouent un rôle moindre, ou en tout cas moins étudié, sur l'homéostasie de la barrière. En effet, la plupart des études sur les protéines de la famille CLDN sont réalisées *in vitro* et les cellules endothéliales en culture surexpriment CLDN5 par rapport aux autres protéines de jonctions. De façon intéressante, Berndt *et al.* ont récemment montré que les niveaux transcriptionnels de claudin 1 (CLDN1), 11 (CLDN11), 12 (CLDN12), 25 (CLDN25) et 27 (CLDN27) sont également élevés chez l'homme *in vivo* (Berndt et al. 2019).

2.2.2. MARVEL

L'occludin (OCLN) est la première protéine de jonction serrée qui a été décrite. Elle contient un domaine MARVEL conservé (Furuse et al. 1993). D'autres protéines de cette famille ont été identifiées plus récemment, la MARVEL domain containing 2 (MARVELD2) et la MARVEL domain containing 3 (MARVELD3) (Ikenouchi et al. 2005; Steed et al. 2009).

2.2.3. Immunoglobulines

Les protéines de la famille junctional adhesion molecule (JAM) sont des protéines de type immunoglobuline présentes au niveau épithélial. Elles sont également retrouvées au niveau des jonctions capillaires endothéliales cérébrales. À l'inverse des protéines décrites ci-dessus, elles ne possèdent qu'un seul domaine transmembranaire au lieu de quatre. Ces protéines transmembranaires sont reliées au cytosquelette via des protéines cytoplasmiques de la famille tight junction protein (TJP) (Palmeri et al. 2000; Aurrand-Lions et al. 2005; 2001; Martin-Padura et al. 1998).

2.3. Les jonctions adhérentes

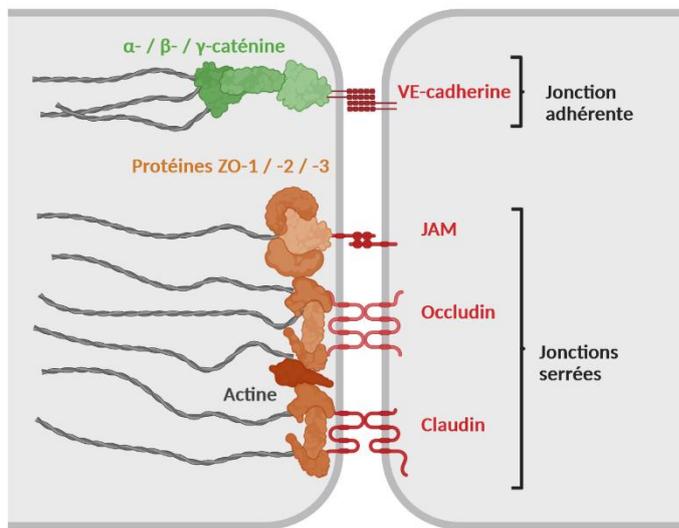


Figure 8 Jonctions serrées et jonctions adhérentes entre deux cellules endothéliales

Les jonctions adhérentes sont formées par les membres de la famille cadherin (CDH). Les BCECs expriment à des niveaux élevés deux protéines de cette famille, cadherin 2 (CDH2) et cadherin 5 (CDH5), cependant la CDH2 n'est pas localisée spécifiquement au niveau des jonctions et son expression est plus diffuse. La CDH5 est liée au niveau cytoplasmique à la catenin beta 1 (CTNNB1) et à la junction plakoglobin (JUP) ce qui permet, dans un second temps, le recrutement de catenin

alpha 1 (CTNNA1). La CTNNA1 est reliée au cytosquelette d'actin via des protéines de liaison de l'actin : actinin alpha 1 (ACTN1), vinculin (VCL), tight junction protein 1 (TJP1) aussi connue sous le nom de zonula occludens 1 (ZO1), afadin (AFDN), actin-related protein 2 et 3 (ARP2 et ARP3), LIM domain and actin binding 1 (LIMA1) et epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 (EPS8) (Lampugnani, Dejana, et Giampietro 2018).

En conditions pathologiques, l'organisation quantitative et qualitative des protéines de jonctions est modifiée et se traduit soit par la destruction des jonctions existantes soit par la création de nouvelles jonctions (OCLN ou autres isoformes de la famille CLDN) (Luissint et al. 2012).

2.4. Péricytes et cellules murales

Les péricytes sont des cellules murales enchassées dans la membrane basale des capillaires des artérioles pré-capillaires et des veinules post-capillaires.

Elles reçoivent des signaux provenant des cellules voisines pour assurer des réponses fonctionnelles en conditions physiologiques et pathologiques, y compris la régulation de la perméabilisation de la BHE et la neuro-inflammation (Sweeney, Ayyadurai, et Zlokovic 2016).

Les péricytes contrôlent l'expression de protéines de jonctions pendant le développement, durant lequel les péricytes sont nécessaires à la formation de la BHE et dont la couverture vasculaire détermine la perméabilisation (Daneman et al. 2010), mais également à l'âge adulte ou en condition pathologique comme la démence durant laquelle une perte péricytaire entraîne des dommages vasculaires à l'origine de troubles cognitifs (Bell et al. 2010).

En conditions neuro-inflammatoires, les péricytes du SNC jouent un rôle dans le recrutement des cellules souches périphériques dans le parenchyme cérébral. En réponse à des médiateurs inflammatoires, les péricytes surexpriment des molécules d'adhésion comme intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) et sécrètent des chimioattractants comme macrophage migration inhibitory factor (MIF) (Stark et al. 2013). L'expression de molécules d'adhésion, ICAM1 mais aussi integrin subunit alpha M (ITGAM) et integrin subunit beta 2 (ITGB2), par les péricytes est responsable d'un phénomène de crawling des cellules inflammatoires sur les péricytes, identique au crawling sur les cellules endothéliales, à la recherche d'un passage, préférentiellement une lacune entre deux péricytes provoquée par des cytokines proinflammatoires (Proebstl et al. 2012).

Les CMLs sont des cellules murales vasculaires contractiles caractérisées par l'expression de protéines contractiles telles que actin alpha 2, smooth muscle (ACTA2) et des isoformes de la famille myosin heavy chain (MYH) et myosin light chain (MYL). Elles sont situées autour de vaisseaux de plus gros diamètre que les péricytes, comme les artérioles. Ces capacités contractiles permettent aux CMLs vasculaires de réguler le débit sanguin et ainsi l'apport d'oxygène et de nutriments au parenchyme cérébral (Hill et al. 2015; Hayes et al. 2022).

2.5. Membrane basale

La membrane basale est un complexe de protéines de matrice extracellulaire retrouvée sous les cellules épithéliales et endothéliales. Elle exerce différents rôles de soutien structurel, d'ancrage cellulaire et de transduction des signaux. La membrane basale est constituée de deux sous-types, néanmoins non identifiables en conditions physiologiques, la membrane basale endothéliale et la

membrane basale parenchymale qui sont séparées par les péricytes (Xu, Nirwane, et Yao 2019; Thomsen, Routhe, et Moos 2017).

Structurellement, la membrane basale est un feuillet protéique de 50 à 100 nm d'épaisseur, constitué majoritairement de 4 protéines : collagen type IV (COL4), laminin (LAM), nidogen (NID) et heparan sulfate proteoglycan 2 (HSPG2). Le COL4 est une protéine trimérique composée de 3 chaînes alpha dont 6 types ont été identifiés (COL4A1-6). C'est la protéine la plus abondante de la membrane basale (Sado et al. 1998). La LAM est une protéine trimérique composée de chaînes alpha, beta et gamma. Les différentes associations de ces chaînes donnent lieu à un grand nombre d'isoformes. Les astrocytes, les cellules endothéliales et les péricytes synthétisent tous de la LAM, mais la nature des isoformes est différente (Hallmann et al. 2020; Yousif, Di Russo, et Sorokin 2013). La NID est une glycoprotéine qui agit en stabilisant le COL et la LAM (Fox et al. 1991). HSPG2, aussi appelée Perlecan, est une protéine de très haut poids moléculaire dont la fonction exacte est peu connue. Elle n'est pas indispensable pour la formation de la membrane basale mais son inactivation génique est létale durant l'embryogénèse (Knox et Whitelock 2006).

Lors du développement ou dans des situations pathologiques, de nouveaux composants matriciels peuvent être produits tel que la fibronectin 1 (FN1) et plusieurs métalloprotéinases.

2.6. Espace périvasculaire

L'espace de Virchow-Robin, décrit pour la première fois au milieu du XIX^{ème} siècle, correspond à un compartiment liquidien situé entre les membranes basales parenchymale et endothéliale. Les espaces périvasculaires contribuent à l'homéostasie du SNC et leur dysfonction contribue à la physiopathologie des maladies neurologiques.

Longtemps controversée, l'existence de ces espaces est aujourd'hui validée par la communauté scientifique internationale, cependant de nombreuses interrogations persistent concernant leur anatomie et leur fonction.

2.7. Astrocyte et membrane basale astrocytaire

Les astrocytes représentent l'un des types cellulaires les plus abondants du SNC, entre 20 et 50% du nombre total de cellules du SNC selon les espèces, et contribuent à maintenir l'homéostasie du parenchyme au cours du développement, en situation physiologique et au cours du vieillissement. À l'origine, les astrocytes étaient uniquement considérés comme une population cellulaire de soutien structurel aux neurones mais, depuis le début des années 2000, de nombreuses études ont démontré un éventail de rôles beaucoup plus diversifiés pour les astrocytes en conditions physiologiques

(fourniture énergétique, synaptogénèse et synthèse de facteurs neurotrophiques) et pathologiques (Hasel et Liddelow 2021).

Les astrocytes étant le focus de ma thèse, une partie beaucoup plus exhaustive leur sera consacrée dans la suite du manuscrit (*en page 44 - Astrocytes*).

2.8. Microglie

Lors du développement embryonnaire et de la période post-natale précoce, des cellules myéloïdes dérivées de la moelle osseuse et du sac de yolk, ou vésicule vitelline, pénètrent dans le parenchyme cérébral et deviennent des cellules résidentes immunocompétentes, appelées microglie (Glezer, Simard, et Rivest 2007).

Les cellules microgliales représentent 5 à 10% des cellules du cerveau. Elles sont en contact avec les neurones et impliquées dans le remodelage et la maturation synaptique. Elles sont également les cellules principales du cerveau à exprimer des acteurs de la voie classique du complément qui est impliquée dans la défense contre les agents pathogènes et dans l'élimination des débris cellulaires. Elles jouent ainsi un rôle dans l'élagage synaptique lors du développement (Qingyun Li et Barres 2018; Borst, Dumas, et Prinz 2021).

3. Rôles de l'UNV dans la physiopathologie de la SEP

L'UNV est une structure complexe finement régulée en condition physiologique permettant de maintenir l'intégrité du SNC. En contexte neuro-inflammatoire, les propriétés de barrière des vaisseaux sont dévoyées. Les aspects auto-immuns et inflammatoires de la SEP font des vaisseaux un élément central pour une meilleure compréhension de cette pathologie.

3.1. Dysfonction vasculaire

La dysfonction vasculaire est un élément important de la physiopathologie de la SEP. Deux éléments majeurs seront détaillés dans le paragraphe suivant : la perturbation du débit sanguin cérébral modifiant l'apport en oxygène aux neurones et la modification de la perméabilisation de la BHE responsable d'une augmentation de l'infiltration des protéines plasmatiques et de l'extravasation des cellules immunitaires dans le parenchyme cérébral.

3.1.1. Débit sanguin cérébral

Plusieurs études ont montré une diminution du débit sanguin cérébral chez des patients atteints de SEP dans certaines zones cérébrales ou dans des situations cliniques particulières. Cette diminution de

débit semble très précoce car elle a également été montrée dans la substance blanche de patients atteints de syndrome clinique isolé, mais pas dans la substance grise (Varga et al. 2009).

Comparé à celui de volontaires sains, le débit sanguin cérébral est réduit dans diverses zones corticales et dans le putamen / thalamus de patients atteints de SEP avec déficit cognitif (Hojjat et al. 2016). Peruzzo *et al.*, en comparant par IRM le débit sanguin chez un même patient dans les lésions corticales à celui dans des zones où la substance grise apparaît normale, montrent une diminution du débit de 46% dans les lésions et proposent ainsi cet examen comme marqueur de gravité de la maladie à un instant donné mais également comme critère d'évolution au cours du temps de la pathologie (Peruzzo et al. 2013).

L'étude du débit sanguin cérébral chez des patients atteints de SEP pose cependant la question des contrôles : une comparaison intra-individuelle, *i.e.* zone lésionnelle versus zone saine chez un même patient, ou inter-individuelle, *i.e.* zone lésionnelle d'un malade versus zone saine d'un sujet sain. Ainsi Law en 2004, en comparant le débit sanguin cérébral par IRM chez des patients atteints de SEP versus des volontaires sains, met en évidence une diminution dans les zones non lésionnelles de patients atteints de SEP versus la même zone chez des volontaires sains (Law et al. 2004).

A l'inverse, une étude publiée en 2018 a montré une augmentation du débit dans certaines zones du cerveau comme le putamen et le cortex occipital de malades comparés à des individus sains (X. Zhang et al. 2018). Cependant, l'hypothèse communément admise à l'heure actuelle est que l'hypo-perfusion entraînée par la baisse du débit sanguin crée une situation d'hypoxie au niveau des lésions (R. Yang et Dunn 2015). Cette hypoxie, confirmée par élévation de l'expression d'hypoxia inducible factor 1 subunit alpha (HIF1A) et par l'utilisation de sondes à hypoxie (T. W. Johnson et al. 2016), semble corrélée quantitativement, spatialement et temporellement à la présence ou au développement d'un déficit cognitif (Davies et al. 2013).

3.1.2. Perméabilisation vasculaire

La déstructuration de l'UNV en contexte neuro-inflammatoire est un élément physiopathologique important avec plusieurs voies de passage possibles qui seront décrites en détail dans la suite du manuscrit (*en page 32 - Voies d'entrée de l'infiltration lymphocytaire dans le SNC*). Dans la SEP, l'augmentation de la perméabilisation vasculaire est un élément très précoce. Le phénomène de perméabilisation vasculaire le plus étudié dans la SEP concerne le passage de l'infiltration inflammatoire au niveau des veinules post-capillaire. Ce phénomène peut être divisé en deux évènements : la perte de la fonction de barrière qui implique une perte et / ou une altération des

jonctions et l'activation de la BHE, qui correspond à la capacité des constituants de l'UNV à exprimer des facteurs influençant le recrutement de cellules inflammatoires (J. I. Alvarez, Cayrol, et Prat 2011).

3.1.2.1. Perturbation des jonctions endothéliales

L'analyse post-mortem de cortex de patients atteints de SEP a permis de mettre en évidence des anomalies de la BHE et notamment des fuites de protéines sériques ainsi que des modifications de la membrane basale dans la substance blanche mais pas dans la substance grise. Ces lésions semblent chroniques et apparaissent y compris en l'absence d'inflammation active (van Horssen et al. 2007; Kwon et Prineas 1994; Claudio, Raine, et Brosnan 1995).

Kirk *et al.* ont analysé post-mortem par immunofluorescence la substance blanche de patients atteints de SEP (plaque active ou inactive et zone saine) et de volontaires sains, à la recherche d'anomalies des protéines de jonctions pouvant expliquer cette augmentation de perméabilisation. Les vaisseaux ont été caractérisés et classés comme normaux ou anormaux selon le marquage TJP1. Le nombre de vaisseaux avec jonctions serrées anormales dans les plaques actives (42,5 %) est significativement plus élevé que dans les zones saines (13 %) ou que chez les volontaires sains (3,9 %) et les anomalies dans les plaques inactives (22,76 %) sont significativement plus importantes chez les patients SEP par rapport aux témoins. Enfin le taux d'anomalies observé n'est pas dépendant de la taille des vaisseaux mais est corrélé au taux d'extravasation de la protéine plasmatique de haut poids moléculaire fibrinogen beta chain (FGB) (Kirk et al. 2003).

Des modèles murins d'EAE ont également mis en avant cette dérégulation des protéines de jonctions. Dans une étude chez la souris menée par Bennett et al., la dérégulation de TJP1 dans la moelle épinière précède l'apparition de signes cliniques et est corrélée à la progression de la maladie (Bennett et al. 2010). Chez le rat, Fabis *et al.* ont mis en évidence une déphosphorylation d'OCLN qui coïncide avec l'augmentation de la perméabilisation de la BHE et le début de l'inflammation, précédant les signes visibles de la maladie (Fabis et al. 2007).

3.1.2.2. Marqueurs d'activation endothéliales

L'augmentation de l'expression d'intégrines, de sélectines et de molécules d'adhésion par les vaisseaux est un marqueur d'activation endothéliale.

Des micro-vaisseaux, isolés post-mortem de plaques de patients atteints de SEP, expriment des niveaux significatifs d'ICAM1, de vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1) et de selectin E (SELE). Dans les zones saines chez ces mêmes patients, l'expression est moindre (Washington et al. 1994).

Les formes solubles de SELE (sSELE), d'ICAM1 (sICAM1) et VCAM1 (sVCAM1) sont des marqueurs d'activation endothéliale (Pigott et al. 1992), mesurables dans le sang et dans le liquide cébrospinal (LCS). Dans la SEP, Dore-Duffy *et al.* ont montré que les taux d'ICAM1 et de SELE dans le sérum et de VCAM1 et de SELE dans le liquide céphalo-rachidien (LCS) sont plus élevés chez des patients atteints de SEP-RR que chez des volontaires sains (Dore-Duffy et al. 1995). Dans des formes de SEP-PP, des taux sanguins plus élevés sont retrouvés pour sVCAM1, sICAM1 et sSELE (McDonnell et al. 1999).

Ces résultats chez l'humain correspondent à ceux dans des modèles murins d'EAE qui ont montré l'importance d'ICAM1 et ICAM2 endothéliaux dans le phénomène de diapédèse (Haghayegh Jahromi et al. 2020).

L'augmentation de la perméabilisation vasculaire et de l'activation endothéliale est responsable d'une infiltration importante de cellules immunitaires, et notamment de lymphocytes, dans le parenchyme cérébral au cours de la SEP et de l'EAE. La composition quantitative et qualitative de cette infiltration lymphocytaire est d'un intérêt majeur pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'œuvre dans cette pathologie.

3.2. Voies d'entrée de l'infiltration lymphocytaire dans le SNC

En conditions pathologiques, les leucocytes mononucléés et les monocytes présents dans la circulation systémique peuvent pénétrer le parenchyme cérébral afin d'assurer des fonctions immunologiques. La diapédèse correspond à la migration des leucocytes à travers la paroi des vaisseaux sanguins lors des phénomènes inflammatoires.

Le modèle d'EAE induite par le MOG, durant lequel les lymphocytes autoréactifs sont activés au niveau des ganglions lymphatiques, a permis d'étudier le passage des lymphocytes de la circulation systémique au parenchyme cérébral selon trois voies possibles (Engelhardt et al. 2016) :

- Passage à travers la BHE endothéliale au niveau des veinules post-capillaires
- Passage à travers la barrière arachnoïde leptoméningéale au niveau des veinules leptoméningéales
- Passage via le plexus choroïde

3.2.1. Passage au niveau des veinules post-capillaires

Au niveau de la BHE, les cellules immunitaires traversent au niveau des veinules post-capillaires alors que les protéines traversent au niveau des capillaires.

Pour pénétrer le parenchyme au niveau des veinules post-capillaires, les cellules doivent passer la barrière endothéliale. Une fois cela fait, les cellules n'ont pas encore rejoint le parenchyme cérébral mais se retrouvent piégées dans l'espace périvasculaire. Les cellules doivent alors traverser une

deuxième barrière, formée par les pieds astrocytaires et la membrane basale parenchymale aussi appelée *glia limitans*.

3.2.1.1. Passage de l'endothélium

Au cours de la neuro-inflammation, les cellules endothéliales de l'UNV deviennent activées, elles participent à la migration des leucocytes de la circulation systémique vers le parenchyme et la fonction de barrière de l'endothélium est perdue.

Les cellules endothéliales activées subissent des modifications, notamment une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, des cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines, combinée à une réduction de l'expression ou une désorganisation des molécules de jonction, ce qui permet le recrutement et le passage de leucocytes circulants à travers l'endothélium de la BHE.

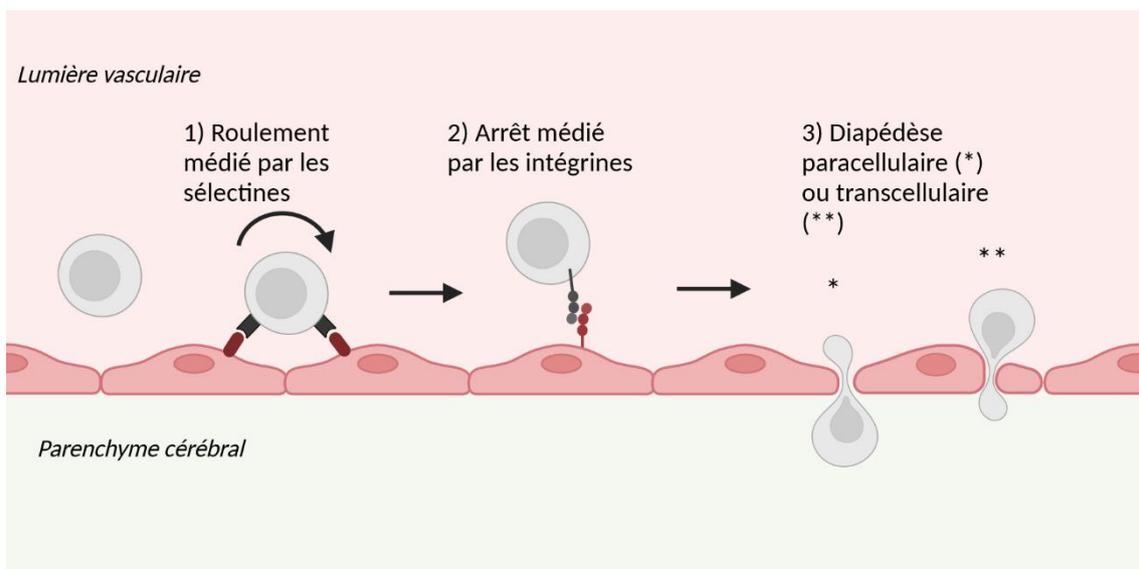


Figure 9 Schématisation des phénomènes de roulement, d'arrêt /adhésion puis diapédèse trans- et para-cellulaire des lymphocytes

L'augmentation de l'expression de protéines de la famille des sélectines, selectin P (SELP) et SELE, sur les cellules endothéliales entraîne une augmentation du roulement des leucocytes par liaison de selectin P ligand (SELPLG) située sur les lymphocytes T (Battistini et al. 2003). Cependant ce mécanisme de roulement n'est pas primordial et de manière intéressante, les sélectines semblent dispensables dans l'induction de l'EAE par exemple (Sathiyandan et al. 2014; Kerfoot et al. 2006).

Pour s'arrêter complètement, les lymphocytes T ont ensuite besoin d'une signalisation dépendante des récepteurs couplés aux protéines G, notamment atypical chemokine receptor 1 (ACKR1). Cette étape d'arrêt est contrôlée par les intégrines integrin subunit alpha L (ITGAL) et integrin subunit alpha

4 (ITGA4) et leurs ligands endothéliaux, respectivement ICAM1 et VCAM1 (Steffen, Butcher, et Engelhardt 1994; Greenwood, Wang, et Calder 1995).

Une fois à l'arrêt, les lymphocytes T vont ensuite ramper à la recherche d'un site favorable à la diapédèse.

Jusqu'au début des années 2000, l'hypothèse communément admise était que les cellules mononucléées traversent la barrière endothéliale par un phénomène de passage paracellulaire appelé « diapédèse paracellulaire », suite à une réorganisation des jonctions serrées selon un modèle parfois appelé « modèle de la fermeture éclair » (Luscinskas et al. 2002; Johnson-Léger et Imhof 2003).

Depuis, de nombreuses études ont mis en évidence l'existence d'un passage transcellulaire appelé « diapédèse transcellulaire », qui épargne les jonctions serrées (Engelhardt et Wolburg 2004). Le passage transcellulaire reste beaucoup moins étudié que le passage paracellulaire, cependant il semblerait qu'en condition neuro-inflammatoire, le passage endothélial des cellules sanguines circulantes soit majoritairement transcellulaire. Cette hypothèse est soutenue par le fait que la surexpression de molécules d'adhésion, notamment ICAM1, retrouvée en condition neuro-inflammatoire, favorise le passage transcellulaire. De plus, la diminution de l'intégrité jonctionnelle au niveau des cellules endothéliales n'est pas corrélée à une augmentation de la diapédèse paracellulaire mais plutôt à une augmentation de la diapédèse transcellulaire (Abadier et al. 2015; Wimmer et al. 2019).

3.2.1.2. Passage de l'espace périvasculaire

Le SNC est parfois comparé à un château fort, muni de deux murailles, l'endothélium et la glia limitans, entre lesquelles sont situées des douves, l'espace périvasculaire (Ineichen et al. 2022; Engelhardt et Coisne 2011).

Cependant, plus qu'un simple lieu de transit, l'espace périvasculaire est un lieu actif dans la protection du parenchyme cérébral, peuplé de cellules présentatrices d'antigènes, les macrophages périvasculaires et les cellules dendritiques, exprimant le CMH de classe II (Greter et al. 2005; Goldmann et al. 2016; Esiri et Gay 1990). En condition physiologique, les lymphocytes peuvent pénétrer dans le parenchyme cérébral afin d'assurer une surveillance immune active. Ainsi, malgré la notion de barrière évoquée dans le paragraphe ci-dessus, il semble que les cellules endothéliales ne restreignent pas de manière absolue le passage des lymphocytes T activés qui sont capables de s'accumuler dans les espaces périvasculaires. Une fois piégés dans ces espaces, les lymphocytes doivent rencontrer à nouveau leurs antigènes afin d'être réactivés et pouvoir franchir la deuxième barrière, la glia limitans (Mundt et al. 2019).

3.2.1.3. Passage de la glia limitans

Le passage des lymphocytes à travers la glia limitans nécessite un recrutement actif par différents types cellulaires et le clivage enzymatique des composants de cette barrière gliale.

Dans l'espace périvasculaire, les macrophages produisent des métallo-protéinases, matrix metallopeptidase 2 (MMP2) et matrix metallopeptidase 9 (MMP9), qui permettent une déstabilisation de la glia limitans et ainsi le passage des leucocytes dans le parenchyme. Parmi les substrats des MMP2 et MMP9, on retrouve le dystroglycan qui permet l'ancrage des pieds astrocytaires à la membrane basale parenchymale via une interaction de haute affinité avec les laminins 1 et 2, le perlecan et l'agrin (Agrawal et al. 2006; J. Song et al. 2015).

Cette barrière astrocytaire est inductible et peut se former en réponse à l'ouverture de la BHE. Lors d'une perte des protéines de jonctions endothéliales, on observe une infiltration et une accumulation des cellules circulantes et des protéines plasmatiques dans l'espace périvasculaire ce qui, en réaction, provoque la formation de jonctions serrées astrocytaires composées de CLDN1 et de claudin 4 (CLDN4), habituellement exprimées par des épithéliums étanches comme l'épithélium digestif ou rénal. Ainsi, la glia limitans exprime des jonctions serrées induites par un état pathologique et l'extravasation d'éléments figurés du sang dans l'espace périvasculaire ; cela lui confère des propriétés de barrière permettant une prise de relais, en réponse à la perte d'intégrité de la BHE, pour protéger le parenchyme cérébral en en restreignant l'accès (Mora et al. 2020).

D'autres protéines de jonction sont également produites par les astrocytes, en particulier F11 receptor (F11R), aussi appelé junctional adhesion molecule A (JAMA). Le rôle de F11R est double : sous forme dimérique, il permet la formation et la stabilisation des jonctions serrées de type CLDN et OCLN via des liaisons entre astrocytes voisins, et sous forme monomérique, il possède une fonction de récepteur de surface pour la liaison avec les lymphocytes T et les monocytes dans l'espace périvasculaire puis le parenchyme cérébral (Amatruda et al. 2022).

3.2.2. Passage au niveau de la barrière arachnoïde

Les méninges sont des membranes fibreuses constituées majoritairement de fibroblastes et de collagène qui enveloppent la totalité du SNC. On distingue : la pachyméninge ou dure mère et les leptoméninges ou méninges molles composées de l'arachnoïde et de la pie-mère. L'espace entre la dure mère et l'arachnoïde prend le nom d'espace sous-dural, celui entre l'arachnoïde et la pie-mère, d'espace sous-arachnoïdien. L'espace sous-arachnoïdien est rempli de LCS et est continu avec l'espace péri-vasculaire du parenchyme cérébral (Derk et al. 2021).

Les vaisseaux leptoméningés possèdent des propriétés de barrière. Des analyses par microscopie électronique ont mis en évidence l'expression de jonctions serrées (Nabeshima et al. 1975) évitant ainsi la diffusion libre de molécules dans le LCS.

La dure mère est composée de 2 couches épithéliales, la couche la plus externe est appelée couche périostale et est attachée au crâne. Les vaisseaux sanguins, lymphatiques et les nerfs sont situés entre ces deux couches (Weller et al. 2018). Les capillaires contenus dans la dure mère, à l'inverse des vaisseaux leptoméningés, sont fenêtrés et ainsi perméables. La barrière arachnoïde contrôle donc le passage entre les vaisseaux de la dure mère et le LCS contenu dans l'espace sous-arachnoïdien.

L'expression de CLDN11 et CLDN5 a été mise en évidence dans la fraction membranaire d'un homogénéisat de leptoméninges (Uchida et al. 2022). De manière intéressante, Uchida *et al.* ont également mis en évidence une diminution de l'expression de CLDN11 au niveau de la barrière arachnoïde dans un modèle EAE et chez des patients atteints de SEP soutenant l'idée d'une altération de la fonction de barrière de la barrière arachnoïde (Uchida et al. 2019).

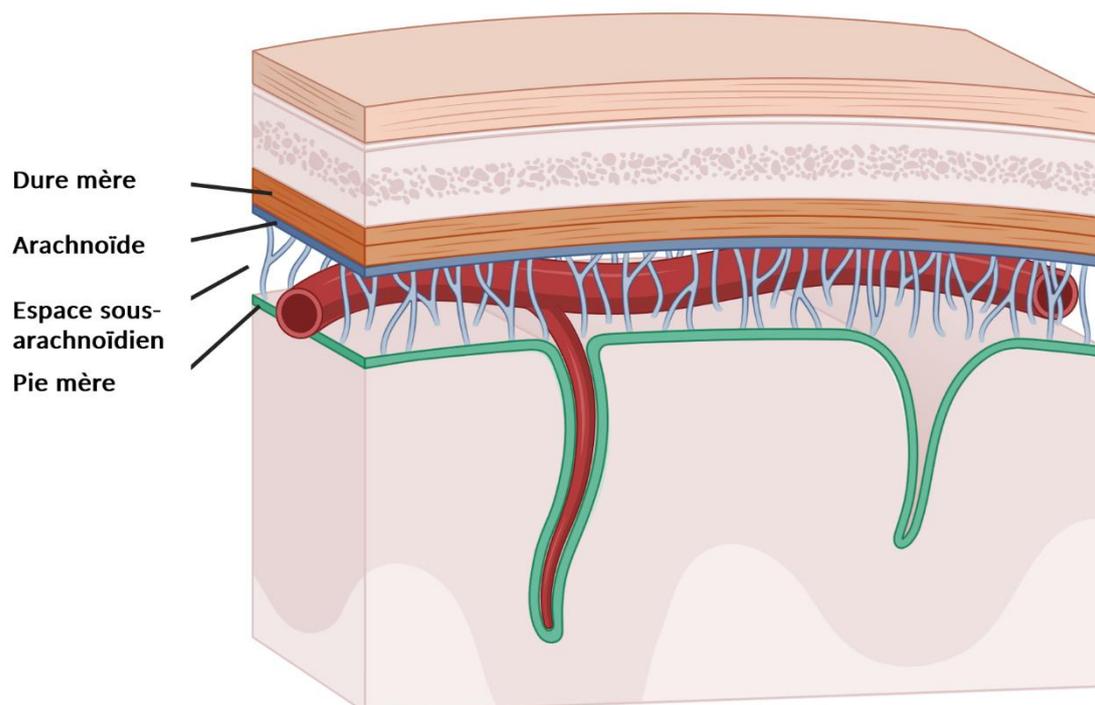


Figure 10 Schéma des méninges au niveau du crâne

3.2.3. Le plexus choroïde

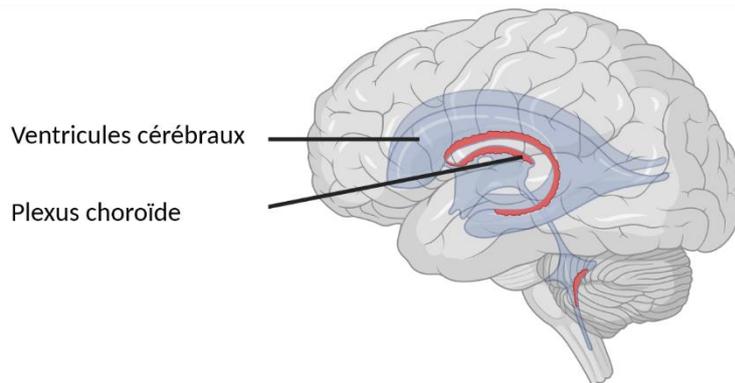


Figure 11 Localisation du plexus choroïde au sein des ventricules cérébraux

Les plexus choroïdes sont des structures villositaires situées au niveau de la paroi des ventricules cérébraux, responsables de la sécrétion de la majorité du LCS. Ils sont composés d'une barrière épithéliale recouvrant des vaisseaux fenêtrés. L'espace entre ces deux couches cellulaires,

dénommé stroma, est peuplé de cellules myéloïdes présentatrices d'antigène (Rodríguez-Lorenzo et al. 2020).

Les cellules endothéliales des vaisseaux fenêtrés expriment moins de protéines de jonctions mais des niveaux d'ICAM1, de SELP et de SELE plus élevés facilitant ainsi le passage des cellules immunitaires du sang vers le stroma (Kivisäkk et al. 2003). Les cellules épithéliales du plexus choroïde en revanche sont hautement polarisées et possèdent de nombreuses jonctions serrées composées d'OCLN et de protéines de la famille CLDN (Liddelow et al. 2012; Tietz et Engelhardt 2015; Wolburg et al. 2001; Kratzer et al. 2012). La liste des isoformes de la famille CLDN présents au niveau des cellules épithéliales est variable selon les auteurs et des analyses récentes ont montré que le manque de sélectivité des méthodes utilisées a pu aboutir à des données erronées par le passé. Ainsi, en 2019, Castro Dias *et al.* ont montré que claudin 3 (CLDN3) n'était pas exprimé au niveau des cellules épithéliales et que son KO n'avait pas d'impact sur la perméabilisation des barrières cérébrales (Castro Dias et al. 2019).

Plus récemment, des preuves que le plexus choroïde peut être une porte d'entrée dans le SNC ont été

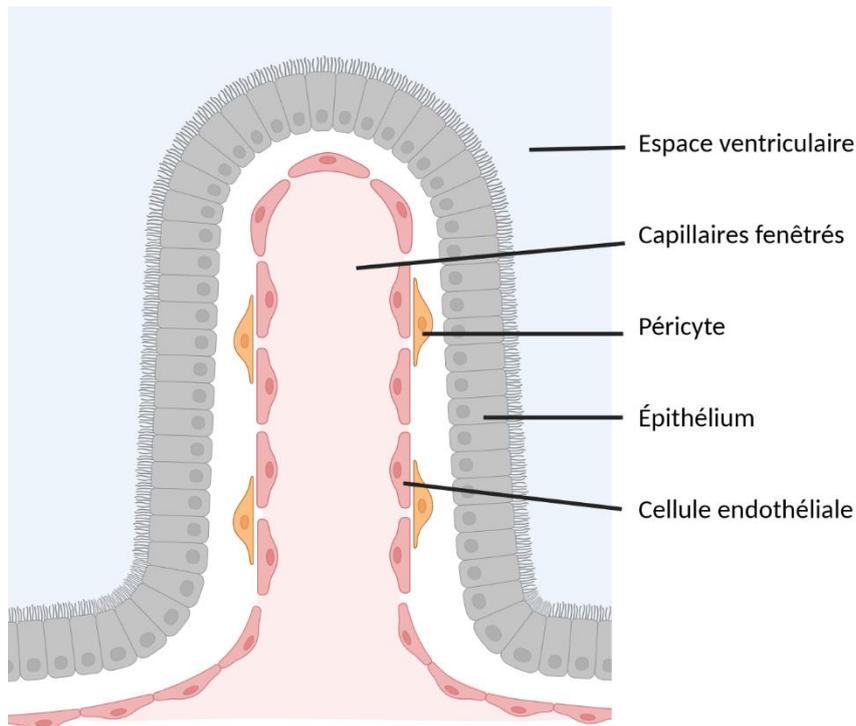


Figure 12 Schéma de l'organisation d'une villosité de plexus choroïde

publiées. Dans un modèle d'EAE, Reboldi *et al.* ont montré que les lymphocytes TH17 auto-réactifs pénètrent dans le parenchyme cérébral au tout début de la maladie, en l'absence d'inflammation, via la liaison du C-C motif chemokine receptor 6 (CCR6) lymphocytaire à son ligand C-C motif chemokine ligand 20 (CCL20) exprimé par le plexus choroïde. Ce mode

d'entrée est défini par les auteurs comme une première vague d'infiltration, par opposition à une deuxième vague d'infiltration, s'effectuant de manière indépendante à CCR6 et prenant place au niveau des veinules post-capillaires durant la phase active de la maladie (Reboldi *et al.* 2009).

Chez l'humain, plusieurs études se sont intéressées au plexus choroïde comme marqueur d'activité radiologique de la SEP. Dès 2020, Kim *et al.* ont mis en évidence que le plexus choroïde apparaît plus intense à l'IRM (séquence T1 gadolinium) chez des patients atteints de SEP que chez des volontaires sains (H. Kim *et al.* 2020). L'année suivante Ricigliano *et al.* ont confirmé ces changements au niveau du plexus choroïde à l'imagerie et démontré que son volume est augmenté de 35% par rapport aux volontaires sains, cette augmentation étant corrélée au taux annuel de rechutes des patients (Ricigliano *et al.* 2021). Fleischer *et al.* ont confirmé la corrélation entre la neuro-inflammation et l'augmentation de volume du plexus choroïde à l'IRM, ainsi qu'avec le degré d'activité de la maladie (Fleischer *et al.* 2021). Enfin en 2023, Bergsland *et al.* ont étudié les propriétés du plexus choroïde en plus de sa taille en utilisant une carte pseudo-T2 et démontré que l'intensité en pseudo-T2 est associée à une progression de la maladie (Bergsland *et al.* 2023).

3.3. Lymphocytes

3.3.1. Généralités

Les lymphocytes peuvent être divisés en trois grandes populations sur la base de différences fonctionnelles et phénotypiques : les lymphocytes B (cellules B), les lymphocytes T (cellules T) et les cellules tueuses naturelles (NK).

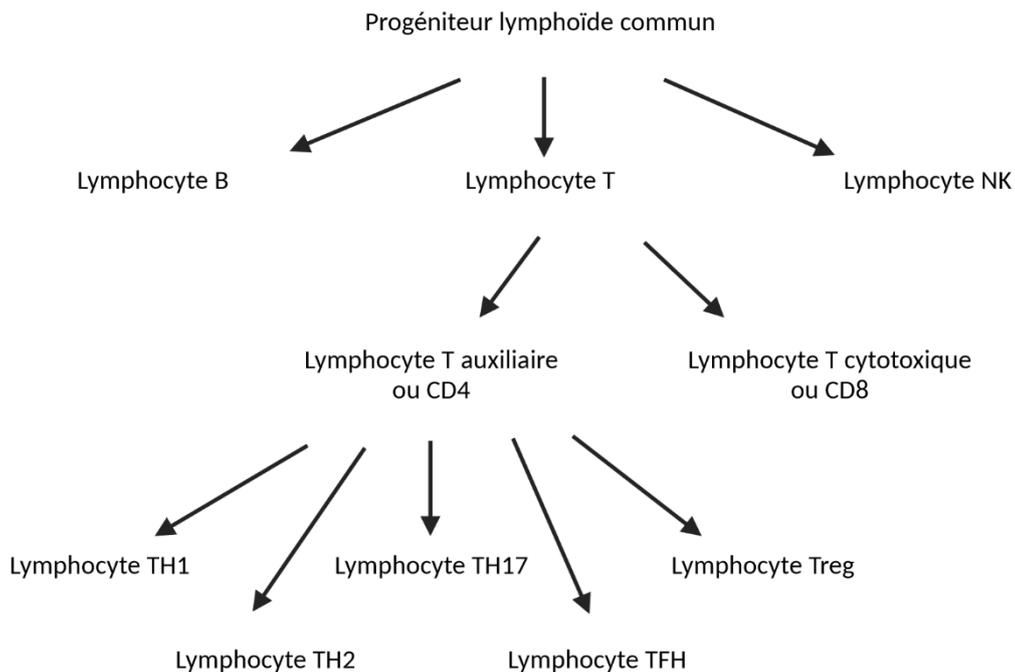


Figure 13 Schématisation des différents types de lymphocytes issus des progéniteurs lymphoïdes communs

Le lymphocyte B (cellule B) tire sa désignation de son site de maturation, la moelle osseuse, *bone marrow* en anglais. Les cellules B matures expriment à leur surface le récepteur des cellules B (BCR de l'anglais *B cell receptor*), une immunoglobuline, ou anticorps, qui a la capacité de se lier à un antigène. Chaque cellule B exprime un anticorps de surface spécifique et unique. La liaison va provoquer l'activation et la différenciation en cellules effectrices appelées plasmocytes qui n'expriment plus d'immunoglobulines de surface mais sécrètent des anticorps.

Les lymphocytes T (cellules T) deviennent matures dans le thymus d'où ils tirent leur nom. Ils expriment un récepteur unique de liaison à l'antigène, appelé récepteur de cellule T (TCR de l'anglais *T cell receptor*). Cependant, les récepteurs des cellules T ne reconnaissent que des morceaux d'antigènes liés à des protéines membranaires appelées molécules du CMH dont il existe deux versions : les molécules du CMH de classe I, qui sont exprimées par la plupart des cellules nucléées, et les molécules du CMH de classe II, qui sont exprimées par les cellules présentatrices d'antigènes. Les lymphocytes T

se divisent en deux grands types de cellules : les cellules T helper ou auxiliaires (TH) et les cellules cytotoxiques (TC), qui se distinguent par l'expression membranaire respective des glycoprotéines cluster of differentiation 4 ou 8 (CD4 et CD8). Les cellules TH CD4+ reconnaissent l'antigène en complexe avec le CMH de classe II, tandis que les cellules TC CD8+ reconnaissent l'antigène en complexe avec le CMH de classe I.

Les cellules T CD8 naïves parcourent les surfaces des cellules présentatrices d'antigènes à l'aide de leurs récepteurs de cellules T. Si elles se lient à un antigène, les cellules T CD8 s'activent, prolifèrent et se différencient en une cellule effectrice appelée lymphocyte TC qui a une fonction vitale de surveillance des cellules de l'organisme et d'élimination de toutes les cellules qui présentent un antigène étranger complexé avec un CMH de classe I.

Les cellules T CD4 naïves parcourent également les surfaces des cellules présentatrices d'antigènes à l'aide de leurs récepteurs de cellules T. Quand elles reconnaissent un CMH, les cellules T CD4 naïves s'activent, prolifèrent et se différencient en l'un des sous-types de cellules T effectrices : cellules TH de type 1 (TH1), cellules TH de type 2 (TH2), cellules TH de type 17 (TH17), cellules T folliculaires (TFH) et cellules T régulatrices (Treg). Les lymphocytes TH1 régulent la réponse immunitaire aux pathogènes intracellulaires et les lymphocytes TH2 aux pathogènes extracellulaires. Découverts plus récemment, les lymphocytes TH17 jouent un rôle dans l'immunité à médiation cellulaire et les lymphocytes TFH dans l'immunité humorale. Enfin les lymphocytes Treg ont la capacité, soit d'inhiber une réponse immunitaire en apparaissant au cours de la maturation dans le thymus à partir de cellules auto-réactives (TREG naturel), soit d'être induites sur le site d'une réponse immunitaire de manière dépendante de l'antigène (TREG induit). Chacun de ces sous-types de cellules T CD4 produit un ensemble différent de cytokines qui participent à l'activation des cellules B, des cellules TC, des macrophages et de diverses autres cellules qui participent à la réponse immunitaire.

Les lymphocytes NK font partie de l'immunité innée et tuent les cellules anormales. À l'inverse des lymphocytes B et T, ils ne reconnaissent pas d'antigènes mais détectent une absence ou une diminution de l'expression du CMH de classe I, physiologiquement exprimé par la grande majorité des cellules mais dont l'expression est diminuée dans les cellules tumorales ou les cellules infectées par un virus.

3.3.2. Le cas de la SEP et de l'EAE

3.3.2.1. TCD8

Historiquement, les études des cellules inflammatoires infiltrées dans le SNC en contexte de SEP se sont orientées sur l'analyse des lymphocytes T CD4+ auto-réactifs et ce pour deux raisons principales. Premièrement, comme expliqué dans la partie sur les facteurs de risques génétiques (*en page 19 - Facteurs de risque génétiques*), le premier variant génétique identifié concerne le CMH de classe II qui présente les antigènes aux lymphocytes TH CD4+. Deuxièmement, les lymphocytes TH CD4+ jouent un rôle critique dans la pathogénèse de l'EAE, le modèle animal le plus utilisé pour étudier la SEP.

Cependant depuis le début des années 2000, de nombreuses études se sont intéressées au rôle des lymphocytes TH CD8+. Des études histo-pathologiques de tissus nerveux de patients atteints de SEP ont montré que les lymphocytes TH CD8 sont en réalité majoritaires que ce soit dans la SEP-RR ou dans la SEP progressive (Booss et al. 1983; Babbe et al. 2000; Machado-Santos et al. 2018). En conditions physiologiques ainsi que dans les lésions non actives, les lymphocytes T CD8+ sont retrouvés en faible nombre dans le parenchyme cérébral et sont restreints à l'espace périvasculaire. À l'inverse, dans les lésions actives, on retrouve au niveau des plaques des cellules CD8+ en grand nombre ainsi que des cellules CD4+ et CD20+ (Machado-Santos et al. 2018).

Les analyses clonales de populations lymphocytaires laissent penser que les lymphocytes TH CD8+ rencontrent l'antigène, sont stimulés et prolifèrent *in situ* au niveau du SNC. L'analyse des régions variables du T cell receptor beta locus (TRB) de lymphocytes T isolés de lésions de SEP a permis de mettre en évidence la présence de peu de clones différents à l'intérieur de ces populations soutenant l'hypothèse d'une prolifération clonale à l'intérieur du SNC (Babbe et al. 2000).

Cette théorie de l'expansion clonale *in situ* ne fait cependant toujours pas consensus auprès de la communauté internationale. En effet des études sur le taux de cellules CD8+ réactives envers la myéline dans le sang de patients atteints de SEP ont montré des résultats opposés. Berthelot *et al.* ne retrouvent pas de différences de fréquences concernant les lymphocytes TH CD8+ réactifs pour des protéines de la myéline, myelin basic protein (MBP), proteolipid protein 1 (PLP1) et MOG) entre les patients atteints de SEP et les volontaires sains soutenant ainsi l'hypothèse d'une prolifération clonale au niveau du SNC des patients (Berthelot et al. 2008). À l'inverse, Zang et al, après avoir identifié 4 résidus peptidiques de MBP susceptibles d'interagir avec le HLA-A2 et le HLA-A24, ont comparé les lymphocytes TH CD8+ réactifs envers ces peptides chez des patients atteints de SEP versus des volontaires sains. La quantité de lymphocyte TH CD8+ réactifs envers ces résidus de myéline est beaucoup plus importante chez les patients atteints de SEP. Les lignées cellulaires isolées expriment

majoritairement interféron gamma (IFNG) et facteur de nécrose tumorale (TNF), deux cytokines caractéristiques d'un phénotype TH1 (Zang et al. 2004).

Chez la souris, Huseby *et al.* ont montré que l'injection intraveineuse de lymphocytes TH CD8+ réactifs pour la myéline induit une auto-immunité envers le SNC. Les symptômes cliniques chez les animaux sont principalement associés à une atteinte des motoneurones supérieurs, notamment l'ataxie, les réflexes spasmodiques, la perte de coordination des mouvements, la rotation et l'inclinaison de la tête. Quelques souris ont développé une perte de fonction motrice des membres postérieurs tout en conservant des sensations sensorielles. Il est important de noter que dans ce modèle, l'évolution clinique de la maladie est distincte de l'EAE classique dont le symptôme principal est une paralysie flasque ascendante (Huseby et al. 2001).

Plus généralement, les lymphocytes T CD8+ sont considérés comme délétères dans la SEP puisqu'ils sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFNG, le TNF, et l'interleukin 17 alpha (IL17A) (Ifergan et al. 2011). Ils sont également responsables de la production de molécules effectrices telles que le granzyme B (GZMB) (Kebir et al. 2007) et la perforine (PRF1) (Frisullo et al. 2011) et possèdent une toxicité directe pour les oligodendrocytes (Saxena et al. 2008) et les neurones (Zhao et al. 2018).

3.3.2.2. TCD4

La balance entre les différents sous-types de lymphocytes T auxiliaires est perturbée dans la SEP. On retrouve principalement des lymphocytes T CD4 pro-inflammatoires produisant IL17A (lymphocyte TH17), IFNG et TNF (lymphocyte TH1) et GM-CSF (THGM).

Les lymphocytes TH1 et TH17 jouent des rôles multiples dans la physiopathologie de la SEP notamment pour réguler l'activation et la maturation de la microglie (Á. C. Murphy et al. 2010) et des monocytes périphériques invasifs ainsi que l'activation des cellules gliales du SNC notamment les astrocytes (Prajeeth et al. 2017).

Les lymphocytes TH17, via la production d'IL17A, provoquent l'ouverture de la BHE et entretiennent l'inflammation du SNC. Kebir *et al.* ont montré que les cellules endothéliales de l'UNV expriment des récepteurs pour IL17A et que le traitement *in vitro* de cellules endothéliales avec de l'IL17A provoque une augmentation de la perméabilisation, mesurée par le passage d'albumine fluorescente, corrélée à une baisse de l'expression de protéines de jonction OCLDN et TJP1. De plus, le traitement par IL17A permet également une augmentation de la migration trans-endothéliale de lymphocytes T CD4+ en culture, via une augmentation de la production de CCL2, d'interleukin 6 (IL6) et CCL8 (Kebir et al. 2007). Huppert et al., ont ensuite démontré que le traitement par IL17A de cellules endothéliales bEND.3

provoque une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS de l'anglais *reactive oxygen species*) via xanthine dehydrogenase (XDH) et NADPH oxydase (NOX). Ces espèces réactives de l'oxygène sont responsables de la dégradation de protéines de jonctions serrées ainsi que de l'augmentation de la phosphorylation de MLC qui, en contrôlant l'activité contractile des cellules endothéliales, provoquent la perméabilisation des vaisseaux (Huppert et al. 2010).

3.3.2.3. Lymphocyte et neurodégénérescence dans la SEP/EAE

Le lien entre inflammation et démyélinisation n'est toujours pas compris de manière complète. En effet, historiquement l'inflammation est considérée comme le processus le plus précoce dans la SEP, provoquant la démyélinisation des axones puis conduisant à la mort neuronale (Babinski 1885). Cette théorie n'explique pas, en revanche, les différences observées en termes de nature de la réponse inflammatoire et d'efficacité des traitements (Lassmann 2018). Certaines pathologies comme les lymphomes à cellules B, la tuberculose méningée ou la méningo-encéphalite sont responsables d'un infiltrat inflammatoire similaire à celui retrouvé dans la SEP sans qu'une démyélinisation ne soit retrouvée. La démyélinisation ne semble ainsi pas être une conséquence non spécifique de la neuro-inflammation (Fischer et al. 2013). En effet, selon la localisation des lésions, un infiltrat inflammatoire massif n'est pas systématique. Dans les lésions corticales humaines de SEP, le nombre de cellules CD3+ n'est pas systématiquement augmenté et la distribution lymphocytaire n'est pas modifiée (Bø et al. 2003; Peterson et al. 2001). Il est ainsi peu probable que la démyélinisation et les lésions axonales soient induites par un contact direct entre les cellules cibles et les lymphocytes. En revanche, une accumulation de lymphocyte est retrouvée dans les espaces péri-vasculaires au voisinage des lésions. Une explication probable serait la production de facteurs solubles par les lymphocytes de l'espace péri-vasculaire qui diffuseraient dans le cortex et induiraient une démyélinisation, soit directement, soit indirectement par l'activation de la microglie.

Dans la SEP, la perte de fonction de barrière des vaisseaux sanguins de la BHE et l'activation endothéliale permettent un infiltrat lymphocytaire massif dans les espaces perivasculaires. Les thérapeutiques à l'œuvre à ce jour ciblent principalement les cellules immunitaires de cet infiltrat. Cependant, comprendre l'origine des facteurs favorisant la destruction des protéines de jonctions endothéliales, l'activation endothéliale et le recrutement des cellules immunitaires, notamment des lymphocytes, est d'un intérêt considérable pour le développement de nouvelles thérapeutiques synergiques avec les immunosuppresseurs et permettrait d'intervenir plus en amont. Parmi les cellules impliquées dans les phénomènes évoqués précédemment, on retrouve les astrocytes qui représentent actuellement un sujet d'étude en pleine expansion.

4. Astrocytes

Les cellules gliales sont les cellules non neuronales du SN, elles n'ont pas d'activité électrique mais participent à l'homéostasie du parenchyme.

Différents types cellulaires constituent cette catégorie de cellules : les astrocytes, la microglie, les oligodendrocytes, les cellules épendymales, les cellules de Schwann et les cellules satellites gliales.

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus nombreuses du SNC et représentent 30% du nombre total de cellules d'un cerveau humain.

4.1. Production des astrocytes

La production d'astrocytes se fait selon deux mécanismes principaux : la différenciation de cellules souches ou de cellules progénitrices et la prolifération d'astrocytes matures (Molofsky et Deneen 2015; Clavreul, Dumas, et Loulier 2022). Elle commence au stade embryonnaire et se poursuit durant la période post-natale. Pour donner un exemple concret, chez le rat, les cellules non-neuronales représentent seulement 6% du nombre total des cellules du cerveau à la naissance mais 50% à l'âge adulte (Bandeira, Lent, et Herculano-Houzel 2009).

4.1.1. Différenciation depuis les cellules souches neurales

Les cellules neuro-épithéliales qui forment la paroi du tube neural correspondent au système nerveux primitif de l'embryon. Reliées par des complexes jonctionnels, elles forment un épithélium pseudo-stratifié appelé neuro-épithélium. Ce sont ces cellules souches neurales (NSCs de l'anglais *Neural Stem Cells*) qui génèrent des cellules progénitrices intermédiaires appelées cellules radiales gliales (RGCs de l'anglais *Radial Glial Cells*) qui se différencient à leur tour en neurones dans un premier temps puis, une fois la quantité de neurones nécessaire produite, en cellules macrogliales, *i.e.* les oligodendrocytes et les astrocytes (Götz et Huttner 2005).

Cette différenciation est séparée en plusieurs étapes : la différenciation en précurseurs astrocytaires, la migration depuis les centres germinaux puis l'acquisition de marqueurs d'astrocytes matures.

4.1.1.1. Différenciation des cellules souches neurales en précurseurs astrocytaires

Chez la souris, ce switch gliogénique a lieu autours de E12,5 dans la moelle épinière et autour de E16 – 18 dans le cortex (Deneen et al. 2006).

Les modifications moléculaires à l'origine du switch entre neurogénèse et gliogénèse sont encore mal connues cependant certains gènes comme *NOTCH* (M. K. Taylor, Yeager, et Morrison 2007), bone morphogenetic protein (*BMP*) (Mabie et al. 1997), LIF interleukin 6 family cytokine aussi connu sous le nom leukemia inhibitory factor (*LIF*) (Pitman et al. 2004) et ciliary neurotrophic factor (*CNTF*) (Johe et al. 1996) sont associés à une différenciation astrocytaire. Plus récemment, epidermal growth factor receptor (*EGFR*) a été identifié comme facteur clé dans la différenciation des cellules souches neurales en astrocytes.

4.1.1.2. Migration depuis les centres germinaux

Durant le développement, ces précurseurs astrocytaires vont migrer le long des prolongements des cellules progénitrices radiales gliales pour coloniser les différentes zones du SNC (Jacobsen et Miller 2003) et former les astrocytes fibreux et protoplasmiques respectivement dans la substance blanche et la substance grise.

4.1.2. Différenciation depuis les précurseurs de la zone subventriculaire

En post natal, on observe une perte des cellules progénitrices radiales gliales. Les astrocytes produits par différenciation sont alors issus d'autres progéniteurs, les progéniteurs de la zone subventriculaire (SVZ). La production d'astrocytes issus des cellules progénitrices de la zone subventriculaire a lieu jusqu'à P14 (Levison et Goldman 1993).

L'importance des progéniteurs de la SVZ dans la production d'astrocytes ainsi que les périodes temporelles au sein desquelles cette production intervient (voire son existence même) sont toujours soumises à débat au sein de la communauté scientifique. A l'heure actuelle, il semble admis que cette production est réelle, même si son importance par rapport à la production par d'autres sources est certainement à tempérer, cette production par d'autres sources intervenant dès la fin de l'embryogénèse et se poursuivant en post-natal (Clavreul, Dumas, et Loulier 2022; Ge et al. 2012; Stogsdill et al. 2017; Clavreul et al. 2019; Figueres-Oñate et al. 2019).

4.1.3. Prolifération locale d'astrocytes

La prolifération locale d'astrocytes matures commence dès le stade embryonnaire vers E18 et se poursuit en postnatal. Durant les premières semaines postnatales, la quantité d'astrocytes augmente fortement : 19% des astrocytes corticaux prolifèrent à P3. Cette prolifération diminue rapidement pour atteindre 1,5% d'astrocytes qui prolifèrent à P14. Les auteurs considèrent que la prolifération astrocytaire prend place majoritairement avant P10 et est complète à la 3ème semaine (Ge et al. 2012; Burns et al. 2009; Bandeira, Lent, et Herculano-Houzel 2009).

4.2. Morphologie des astrocytes

4.2.1. Hétérogénéité en conditions physiologiques

En conditions physiologiques, l'hétérogénéité morphologique des astrocytes est décrite depuis longtemps. Historiquement, on différencie les astrocytes fibreux de la substance blanche et les astrocytes protoplasmiques de la substance grise (Miller et Raff 1984; Peters, Palay, et Webster 1976; Sofroniew et Vinters 2010).

Les astrocytes protoplasmiques, situés au sein de la substance grise se caractérisent par des prolongements courts et très nombreux qui leur permettent de rentrer en contact avec d'autres astrocytes ainsi que d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales ou les neurones. Dans la substance blanche, les astrocytes sont dits fibreux ou fibrillaires et possèdent un corps cellulaire plus petit. Leurs prolongements sont plus longs et moins nombreux (Tabata 2015).

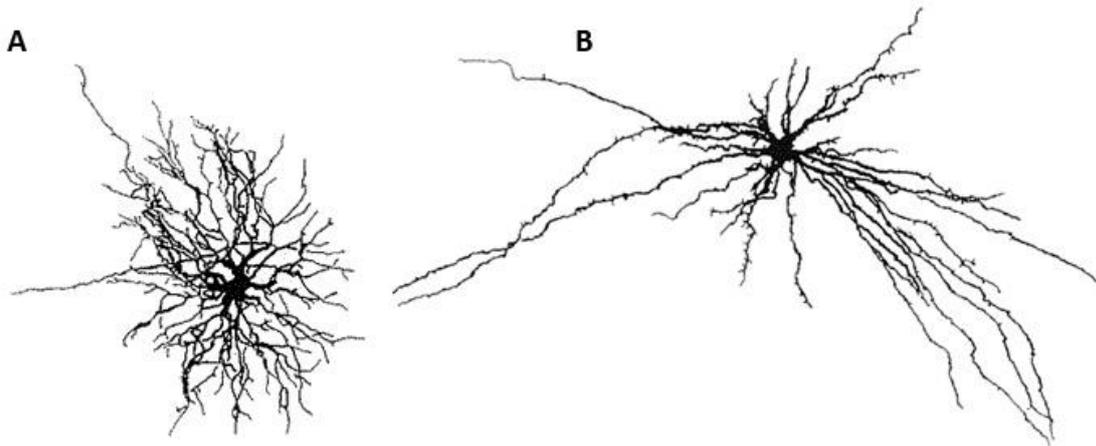


Figure 14 Représentation d'astrocyte protoplasmique en (A) et d'astrocyte fibreux en (B)

Cette différence morphologique basée sur la localisation anatomique des astrocytes n'est en réalité pas uniquement due à des différences basées sur l'origine de ces cellules ou sur des facteurs intrinsèques, mais également à des stimuli environnementaux ou facteurs extrinsèques. En effet, quand on greffe des astrocytes exogènes, ceux-ci acquièrent une morphologie protoplasmique ou fibreuse selon la zone dans laquelle ils sont greffés (X. Han et al. 2013).

4.2.2. Polarisation des astrocytes

Les astrocytes sont des cellules complexes et volumineuses, hautement ramifiées et polarisées, qui possèdent des prolongements au contact des vaisseaux sanguins et des synapses neuronales, appelés respectivement « processus » astrocytaires périvasculaires (PvAPs de l'anglais *perivascular astrocytic*

processes) et « processus » astrocytaires périssynaptiques (PAPs de l'anglais *perisynaptic astrocytic processes*) (Mazaré, Oudart, et Cohen-Salmon 2021).

Les PvAPs forment une couche continue autour des vaisseaux (Mathiisen et al. 2010). La surface de vaisseaux couverte par un PvAPs varie grandement en fonction du type de vaisseaux et de son diamètre. Ainsi la taille des PvAPs et leur taux de couverture des vaisseaux diminuent en même temps que diminue le diamètre des vaisseaux et les pieds astrocytaires sont plus larges autour des artères qu' autour des veines (M. X. Wang et al. 2021).

Comme le travail global de ma thèse se concentre sur l'interaction entre les astrocytes et les cellules endothéliales de la BHE, dans la suite de ce manuscrit, je traiterai essentiellement du dialogue entre ces deux types cellulaires au détriment des interactions astrocytes / neurones.

4.3. Rôle des astrocytes en conditions physiologiques

4.3.1. Métabolisme

Les astrocytes sont une source importante de nutriments pour les neurones. En effet, dans les astrocytes, le glutamate stimule la glycolyse aérobie. Le glucose est apporté aux astrocytes depuis le sang via le transporteur solute carrier family 2 member 1 (SLC2A1) aussi appelé GLUT1. Au niveau astrocytaire, le glucose est alors transformé en lactate et mis à disposition des neurones comme source énergétique via les protéines de la famille solute carrier family 16 (SLC16) aussi appelées monocarboxylate transporters (MCT) (Aubert et al. 2005).

Ce mécanisme moléculaire, conceptualisé par Pellerin, est appelé la navette lactate. Le lactate n'est cependant probablement pas la seule source énergétique des neurones. *In vitro*, il a été démontré que les neurones peuvent capter directement le glucose afin de s'en servir comme source énergétique (Pellerin et Magistretti 1994). *In vivo*, Patel et al ont démontré que cette capture directe du glucose par les neurones est une source énergétique plus importante que la navette lactate (A. B. Patel et al. 2014). La communauté scientifique internationale n'est cependant pas parvenue à un consensus sur le sujet.

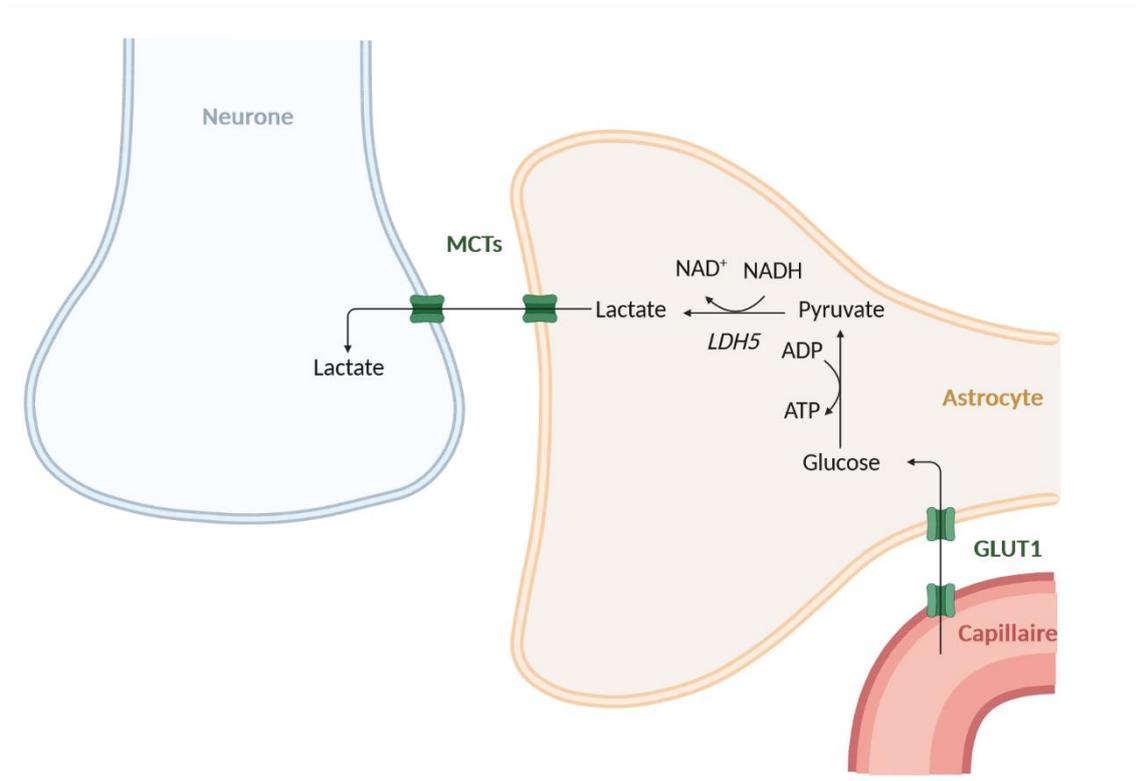


Figure 15 Schématisation simplifiée de la navette lactate entre les astrocytes et les neurones

4.3.2. Régulation du débit sanguin

Au-delà de leur fonction de fourniture énergétique, les astrocytes ont également un rôle dans l'augmentation du débit sanguin afin de pallier la demande énergétique des neurones. En effet, le débit sanguin cérébral est régulé en fonction de la demande énergétique. Le couplage neuro-vasculaire désigne le mécanisme par lequel l'apport en oxygène et en nutriments est ajusté à l'activité neuronale via la régulation du flux sanguin. Ce procédé est en parti régulé par les pieds astrocytaires.

En 2003, Zonta *et al.* sont les premiers à mettre en évidence un effet direct des astrocytes sur la dilatation artériolaire. Sur des préparations de coupes de cerveau de rat, ils démontrent que le glutamate libéré par les neurones, en se fixant sur les sous-types 1 et 5 des récepteurs astrocytaires de type glutamate ionotropic receptor AMPA (GRIA), provoque une augmentation du calcium dans les pieds astrocytaires (Zonta, Angulo, et al. 2003).

Plusieurs mécanismes conjoints font le lien entre cette augmentation de calcium au niveau des pieds astrocytaires et le tonus vasculaire, principalement la voie de métabolisation de l'acide arachidonique et l'augmentation de la sécrétion de potassium (K^+). Zonta *et al.* dans la suite de leurs travaux, identifient les produits de la cyclooxygénase, et notamment la prostaglandin E2 (PGE2), comme

intervenant dans la dilatation artériolaire, leur sécrétion étant sous la dépendance des variations de concentration en calcium (Zonta, Sebelin, et al. 2003).

En 2004 cependant, Mulligan *et al.* publient un article dans lequel ils montrent un effet opposé, *i.e.* une vasoconstriction en réponse à une augmentation du taux de calcium au niveau des pieds astrocytaires, via la voie de la phospholipase A2 / acide arachidonique et la production d'acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque (20-HETE) (Mulligan et MacVicar 2004).

En parallèle de la production de facteurs vasodilatateurs, les astrocytes contrôlent également le taux de K⁺ extracellulaire. L'augmentation du calcium astrocytaire conduit à une ouverture des canaux potassiques dépendant du calcium (canaux BK) qui provoque la libération de K⁺ dans l'espace extracellulaire. Ce K⁺, via potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 1 (KCNJ1), provoque une hyperpolarisation de la membrane des CMLs et ainsi une diminution de l'entrée de calcium, aboutissant à une vasodilatation artériolaire (Filosa et al. 2006).

Les astrocytes, en réponse à un stimulus sont donc capables d'exercer des effets vasoconstricteurs et des effets vasodilatateurs via l'augmentation de K⁺ et la voie de l'acide arachidonique. Plusieurs mécanismes viennent réguler ces effets parmi lesquels la production de monoxyde d'azote (NO) et le taux d'oxygène (O₂). Une explication à la différence entre les travaux de Zonta et ceux de Mulligan sur l'acide arachidonique pourrait ainsi être le NO. En effet le NO module l'activité des enzymes métabolisant l'acide arachidonique (l'époxygénase qui produit les epoxyeicosatriénoic acids (EETs), la cyclooxygénase qui produit la PGE2 et la ω-hydroxylase qui produit le 20-HETE). Zonta, dans son protocole, utilisait du L-NAME, un inhibiteur de la production du NO, ce qui expliquerait l'effet vasodilatateur observé. Le NO produit par les neurones agirait alors comme régulateur de la balance vasodilatation / vasoconstriction en orientant la transformation de l'acide arachidonique en PGE2 ou en 20-HETE.

Le taux d'O₂ est également important car il module la synthèse du NO et la métabolisation de l'acide arachidonique avec des affinités variables pour les différentes enzymes. Ainsi, en cas de réduction de la pression en O₂, la synthèse du NO par les neurones est réduite en premier, suivie de la synthèse de 20-HETE par les astrocytes alors que la synthèse d'EET et de PGE2 est peu modifiée.

Il faut également noter que la plupart des travaux décrits ci-dessus ont été réalisés sur des coupes de cerveaux au sein desquelles le tonus vasculaire est perturbé c'est-à-dire réduit voire nul.

Blanco et al., en 2008, ont mis en évidence que le tonus vasculaire basal impacte la réponse de l'endothélium aux stimulus astrocytaires. Afin de reproduire le tonus vasculaire, les coupes de cerveaux ont été traitées par l'U-46619, un agoniste du récepteur au thromboxane A2 receptor (TBXA2R), afin de provoquer une pré-contraction des artères pour induire des conditions expérimentales plus proches d'un état physiologique. Les facteurs vasodilatateurs évoqués ci-dessus ont ensuite été testés. En utilisant des niveaux de pré-contraction différents, l'équipe a ainsi mis en

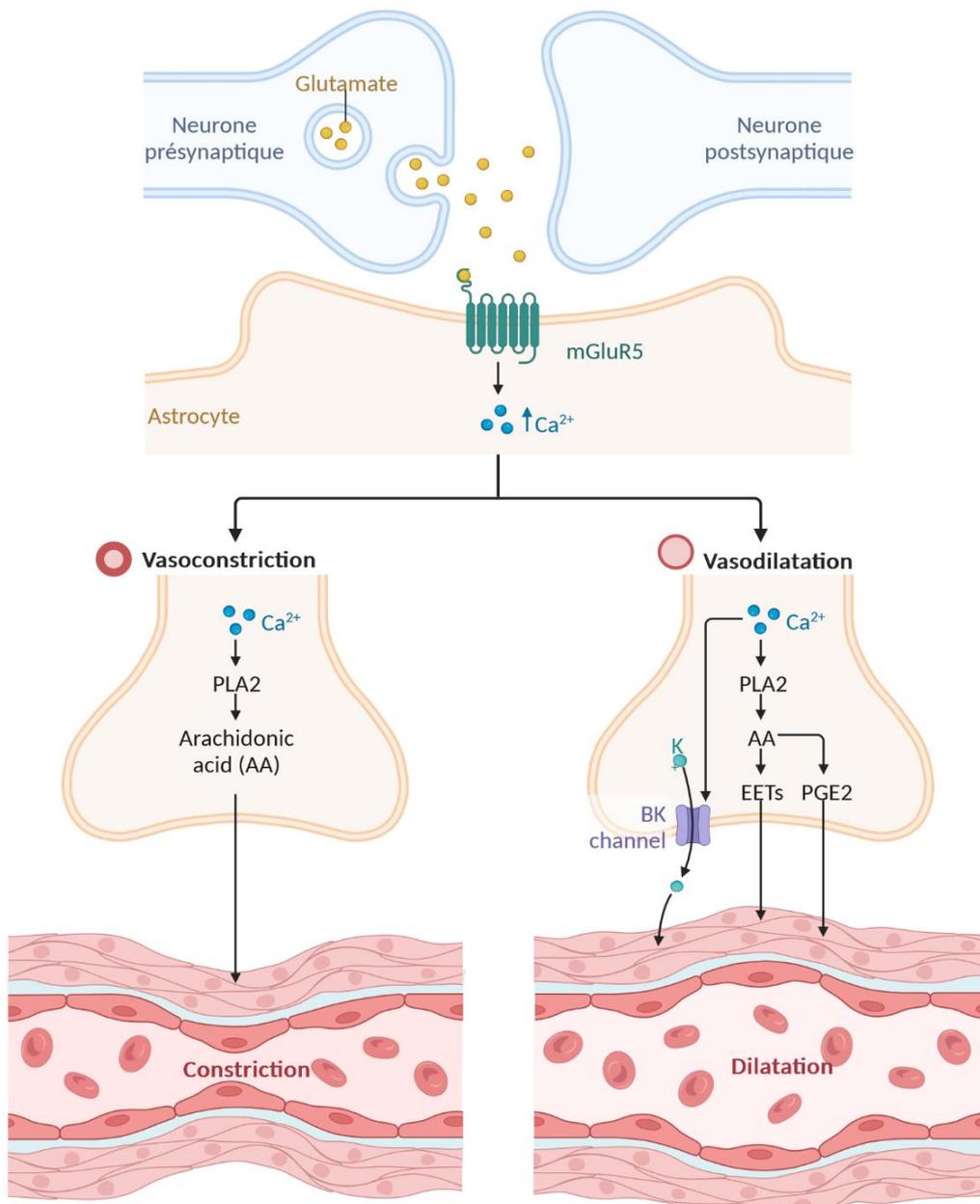


Figure 16 Mécanismes de régulation de la vasodilatation et de la vasoconstriction par les astrocytes

évidence que la polarité et l'amplitude de la réponse artériolaire aux stimulus astrocytaires dépendent du tonus musculaire (Blanco, Stern, et Filosa 2008).

Ainsi, en cas de vasodilatation basale, les stimulus astrocytaires provoquent une vasoconstriction et en cas de vasoconstriction basale, une vasodilatation.

La plupart des mécanismes cités ci-dessus ont été conceptualisés *in vitro*, en conditions non physiologiques. Si la plupart des auteurs s'accordent sur l'impact du flux calcique astrocytaire sur la régulation du flux sanguin cérébral à la suite d'un stimulus, sa pertinence *in vivo* par rapport à d'autres mécanismes reste encore à démontrer et varie très certainement selon l'âge et le type de vaisseau considéré par exemple.

4.3.3. Développement vasculaire et maintenance de l'UNV

L'angiogenèse et la formation de la BHE sont influencées par les cellules radiales gliales durant le développement et par les astrocytes différenciés à l'âge adulte.

4.3.3.1. Développement

Durant le développement, la production de l'isoforme 8 de la sous-unité bêta de l'intégrine, integrin subunit beta 8 (ITGB8), par le neuro-épithélium joue un rôle sur l'homéostasie de la BHE. Une délétion de cette ITG au sein du neuro-épithélium, sous contrôle du promoteur de la Nestin provoque, à la naissance, des hémorragies cérébrales bilatérales chez les souris corrélées à une anomalie de la morphologie vasculaire et au regroupement anormal des cellules endothéliales (Proctor et al. 2005).

La régulation de la morphogénèse vasculaire par le neuro-épithélium et les progéniteurs neuronaux passe en partie par la sécrétion du transforming growth factor beta 1 (TGFB1) par les cellules radiales gliales qui, en se liant au transforming growth factor beta receptor 2 (TGFB2) sur les cellules endothéliales, stimule la production vasculaire de TGFB1. En effet, l'injection intra-ventriculaire de shRNA anti-TGFB1 à des souris *in utero* augmente les lacunes vasculaires et réduit la densité vasculaire et la production de laminin (Siqueira et al. 2018).

Les cellules radiales gliales sont également connues pour stabiliser les néo vaisseaux en inhibant la voie WNT dans les cellules endothéliales. Ainsi, le blocage de la division des cellules radiales gliales via l'induction du knockdown conditionnel d'origin recognition complex subunit 3 (ORC3) sous contrôle du promoteur de la nestin (NES)itg, provoque une baisse de la population de cellules radiales gliales avec pour conséquence une diminution chez les animaux de la densité vasculaire de 83% à P0 associée à une stimulation de la voie WNT endothéliale. Cet effet de WNT sur les vaisseaux passe par la production de MMP2 (S. Ma et al. 2013).

4.3.3.2. Age adulte

L'effet des astrocytes matures sur l'homéostasie de la BHE en conditions physiologiques est moins connu et moins étudié.

Chez des souris adultes, l'inhibition de la production de laminin par les astrocytes matures via l'injection d'un adénovirus glial fibrillary acidic protein (GFAP)-Cre chez des souris laminin gamma1 flox/flox, provoque une augmentation de l'extravasation d'immunoglobuline G (IgG) et la fuite de bleu Evans, 7 jours après l'injection. Cette perméabilisation vasculaire est corrélée à une perturbation de l'UNV et notamment de la maturation et de la différenciation des péricytes via un effet dépendant de l'intégrin subunit alpha 2 (ITGA2) (Yao et al. 2014).

A l'inverse, les cellules endothéliales régulent les fonctions des astrocytes matures, notamment la glycolyse. En effet, la production de NO par les cellules endothéliales provoque, via les voies de mechanistic target of rapamycin kinase (MTOR, aussi abrégé mTOR) et mitogen-activated protein kinase (MAPK), la stabilisation et la translocation au noyau de HIF1A qui agit comme facteur de transcription pour des gènes codant pour des enzymes glycolytiques. *In vitro*, l'incubation des astrocytes avec du NO induit une augmentation de la production et de la sécrétion de lactate par les astrocytes (Brix et al. 2012).

In vitro, l'équipe de Robinson a également montré que la co-culture de cellules endothéliales de BHE murine avec des astrocytes provoque une augmentation de la production de SLC1A2 par les astrocytes et ainsi une augmentation de la recapture par ces cellules du glutamate. En utilisant un shRNA anti *recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa j region (RBPJ)*, également appelé *CBF-1/suppressor of hairless/Lag1 (CSL)* la même équipe a mis en évidence l'implication de la voie NOTCH dans cette fonction (Lee et al. 2017).

4.3.4. Immunoquiescence du SNC

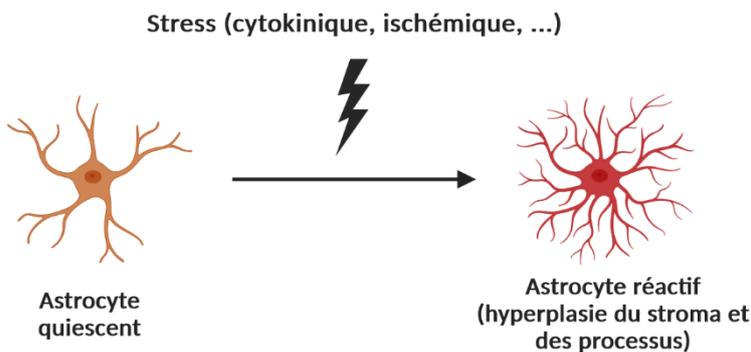
En conditions physiologiques, les astrocytes sont également impliqués dans la quiescence immunitaire.

Chez des souris knockdown pour gap junction protein alpha 1 (GJA1), aussi appelé connexin 43 (CX43) au niveau astrocytaire (promoteur aldehyde dehydrogenase 1 family member L1 (ALDH1L1)), une augmentation de l'infiltration leucocytaire est observée au niveau du parenchyme dès la 6^{ème} semaine de vie sans que cela ne soit corrélé à une augmentation de la perméabilisation vasculaire ou de l'astrogliose. Il semblerait que ce mécanisme soit plutôt lié à une augmentation de l'activation endothéliale et du chimiotactisme, *i.e.* le mouvement des cellules en fonction de certains facteurs dans leur environnement. En effet, chez les souris knockdown pour la GJA1, on observe une augmentation

de l'expression de molécules d'adhésion au niveau vasculaire (SELP, SELE, VCAM1 et ICAM1) et de la production de chimiokines (C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10), C-X-C motif ligand 12 (CXCL12) et C-C motif chemokine ligand 5 (CCL5)) au niveau cortical (Boulay et al. 2015).

4.4. Réactivité astrocytaire

Les astrocytes sont des cellules quiescentes qui subissent de profondes modifications morphologiques



et fonctionnelles à la faveur d'un stress. La nature de ce stress est variée : ischémique, cytokinique, traumatique ou infectieux par exemple.

Figure 17 Schématisation simplifiée de l'astrogliose

De nombreuses dénominations existent pour décrire ces phénomènes, les plus communes et celles utilisées dans la suite de

ce manuscrit seront « astrogliose » pour décrire l'ensemble des modifications observées et « astrocytes réactifs » pour décrire les astrocytes ayant subi ces modifications.

De l'extrême variabilité des modifications observées au cours de l'astrogliose est né le désir de classification des astrocytes réactifs.

4.4.1. Les astrocytes A1 et A2

Ainsi, en 2017 l'équipe de Ben Barres a proposé une classification des astrocytes en astrocyte A1 versus A2 à l'image des macrophages M1 et M2 (Liddelow et al. 2017).

Les astrocytes A1 sont induits par la sécrétion microgliale d'interleukin 1 beta (IL1B), de TNF et de complément C1q (C1Q). Ils subissent des pertes de fonction qui entraînent une incapacité à promouvoir la survie neuronale et consécutivement la synaptogénèse, provoquant la mort neuronale (Yun et al. 2018; Clarke et al. 2018). À l'inverse, les astrocytes A2, induits par l'ischémie, sont perçus comme protecteurs via la production de facteurs neurotrophiques. En co-culture avec des astrocytes A2, les neurones produisent moins de facteurs pro apoptotiques (caspase 3 (CASP3), caspase 9 (CASP9), calpain (CAPN) et BCL2 associated X, apoptosis regulator (BAX)) et plus de facteurs antiapoptotiques (BCL2 apoptosis regulator (BCL2)) (Chang et al. 2023).

Plus récemment, cette vision manichéenne des astrocytes réactifs a été remise en cause et l'astrogliose est désormais envisagée comme un continuum spatial et temporel affectant les différentes populations astrocytaires du SNC.

4.4.2. L'apport du séquençage en cellule unique

Le séquençage de l'acide ribonucléique (ARN) en cellule unique (scRNAseq) a permis de confirmer l'hétérogénéité de réponse des astrocytes à un stress (Sadick et al. 2022; Hasel et al. 2021). Des analyses de transcriptomique spatiale ont mis en évidence différents clusters d'astrocytes en fonction des zones du SNC (substances blanches versus substances grises, différentes couches corticales, etc.). Les hypothèses avancées pour expliquer la présence de ces différents clusters est l'existence de sous-type d'astrocytes possédant des fonctions différentes selon leurs localisations anatomiques (Hasel et al. 2021).

4.4.3. Les marqueurs d'astrocytes réactifs

Même si les études évoquées plus haut n'ont pas permis d'aboutir à une classification commune, les analyses transcriptomiques réalisées dans différentes conditions de stress ont permis la définition d'une signature génomique des astrocytes réactifs permettant une quantification de l'astrogliose au sein d'un tissu.

Un groupe d'experts, issus de la communauté internationale et travaillant sur les astrocytes, a proposé un consensus sur les marqueurs d'astrocytes réactifs formellement identifiés dans la littérature parmi lesquels on retrouve des protéines du cytosquelette, des protéines du métabolisme, des protéines chaperonnes, des protéines sécrétées, des facteurs de transcription et des transporteurs ou canaux ioniques (Escartin et al. 2021).

Tableau 1 Marqueurs d'astrocytes réactifs définis par Escartin et al. utilisés dans la suite du manuscrit

Marqueur	Fonction	Type de changement	Conditions	Commentaire
Cytosquelette				
GFAP	Filament intermédiaire	Augmentation ARNm et protéine	Largement répandue	Libéré par les astrocytes lésés. produit de clivage trouvé dans le dans le liquide céphalo-rachidien et le plasma (biomarqueur de neurotraumatisme).
VIM	Filament intermédiaire	Augmentation ARNm et protéine	Largement répandue	Également exprimée par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses

vasculaires et les astrocytes immatures.

Protéines chaperonnes

LCN2	Protéine de transport du fer	Augmentation ARNm et protéine	SEP et autres
-------------	------------------------------	-------------------------------	---------------

Facteurs de transcription

STAT3	Facteurs de transcription	Phosphorylation, translocation nucléaire	Largement répandue	Également exprimée dans les neurones et d'autres types de cellules
--------------	---------------------------	--	--------------------	--

Transporteurs

SLC1A3 (a.k.a. EAAT1) & SLC1A2 (a.k.a. EAAT2)	Transporteurs du glutamate	Diminution ARNm et protéine	Non déterminée
--	----------------------------	-----------------------------	----------------

5. Astrocyte en conditions neuro-inflammatoires

5.1. Hétérogénéité de la réponse

Un scRNAseq effectué sur des souris C57BL6/N induites par l'EAE a mis en évidence 7 sous-groupes différents d'astrocytes réactifs. Parmi ces sous-groupes, celui ayant le plus augmenté entre l'induction et le pic de la maladie se caractérise par une transcription accrue de gènes liés à la neuro-toxicité et à la neuro-inflammation (Wheeler et al. 2020).

A l'inverse, il existe des clusters avec des effets bénéfiques sur la physiopathologie de l'EAE. Les astrocytes exprimant lysosomal associated membrane protein 1 (LAMP1) limitent le développement de l'EAE en induisant l'apoptose des lymphocytes T via une augmentation de l'adressage de TNF superfamily member 10 (TNFSF10), aussi appelé TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL), à la membrane. Cette population d'astrocytes LAMP1+ TRAIL+ est diminuée de 37% chez les souris après induction de l'EAE et de 84% chez des patients atteints de SEP (Sanmarco et al. 2021).

Les analyses par séquençage en cellule unique permettent une analyse des différentes sous-populations d'un type cellulaire au sein d'un tissu mais ne permettent pas d'évaluer la répartition spatiale de ces clusters.

Par contre, une analyse par cytométrie et imagerie de masse à 13 marqueurs, a mis en évidence 5 sous-types d'astrocytes dans une lésion démyélinisante de patient atteint de SEP. Chaque cluster est

séquestré dans une zone définie : le centre de la lésion, la bordure de la lésion, ou la substance blanche non atteinte. Dans une lésion tardive, les auteurs ne mettent en évidence que deux sous-types d'astrocyte, localisés au centre de la lésion et au niveau de la bordure de la lésion (Park et al. 2019).

5.2. La cicatrice gliale

Après une lésion, le tissu nerveux nécrotique est séparé du tissu sain par une cicatrice gliale composée notamment d'astrocytes prolifératifs (Mathewson et Berry 1985). Depuis les premières observations de la cicatrice gliale au début du 20^{ème} siècle (Ramón y Cajal et May 1928), les connaissances quantitatives et qualitatives sur sa composition mais également sur les interactions des astrocytes qui composent cette cicatrice avec les autres types cellulaires de l'UNV ont fortement évolué.

En 2013, le laboratoire de MV Sofroniew a mis en évidence l'hétérogénéité phénotypique des astrocytes constituant cette cicatrice dans un modèle aigu de traumatisme médullaire. Au contact immédiat de la lésion, la prolifération est importante et les astrocytes vont s'orienter parallèlement à la lésion via une signalisation dépendant de signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) (Wanner et al. 2013). Cette cicatrice permet notamment de protéger les neurones viables en ségréguant les cellules inflammatoires au niveau de la zone lésionnelle.

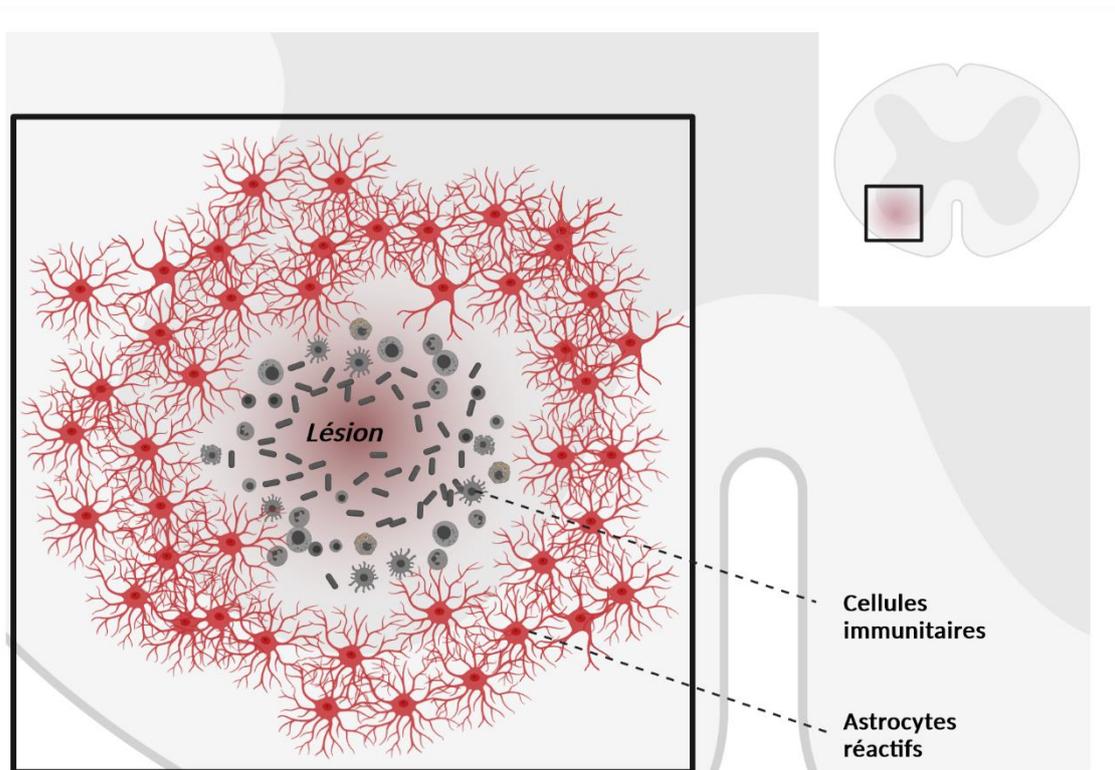


Figure 18 Astrocytes réactifs formant une cicatrice gliale, séquestrant les cellules immunitaires

Dans des modèles de neuro-inflammation chronique, l'observation de clusters de cellules inflammatoires est ancienne (Adams, Poston, et Buk 1989). En 2009, la même équipe a mis en évidence, dans un modèle murin d'EAE, une organisation des astrocytes similaire à celle retrouvée suite à un traumatisme médullaire. En effet, les astrocytes réactifs, dans les zones de lésion inflammatoire induites par l'EAE, forment également une cicatrice qui empêche l'infiltration des cellules inflammatoires à l'ensemble du parenchyme (Sofroniew 2009).

Dans une étude plus récente, l'équipe de GR John a démontré l'expression par les astrocytes réactifs, de protéines de jonctions serrées habituellement retrouvées dans les épithéliums étanches comme l'épithélium digestif ou rénal par exemple. Les principales protéines de jonctions identifiées sont la CLDN1 et la CLDN4. Dans un modèle d'astroglie *in vitro*, le knockdown de ces protéines de jonction conduit à une désorganisation des réseaux d'astrocytes réactifs et à un défaut de ségrégation de lymphocytes T CD4+ en co-culture. *In vivo*, l'induction de l'EAE dans un modèle murin de souris déficiente pour la CLDN4 astrocytaire est associée à une pathologie moins sévère et à une moindre infiltration inflammatoire du parenchyme (Horng et al. 2017).

Des travaux ultérieurs dans l'EAE ont également montré que F11R, outre une fonction de jonction serrée, joue également un rôle dans la communication astrocytes – lymphocytes T et favorise le passage de ces derniers depuis l'espace périvasculaire dans le parenchyme (Amatruda et al. 2022).

5.3. Impact de l'activation astrocytaire sur l'intégrité de la BHE et l'infiltrat inflammatoire dans la SEP

En condition de SEP, plusieurs études démontrent des effets à la fois bénéfiques et délétères de l'astroglie sur l'homéostasie de la BHE via la sécrétion de facteurs par les astrocytes réactifs.

5.3.1. Astrocyte et cellules endothéliales

Chez les patients atteints de SEP ainsi que dans différents modèles de neuro-inflammation chez la souris, les astrocytes réactifs ont été identifiés comme sécrétant des facteurs bénéfiques ou délétères pour l'intégrité de la BHE en régulant notamment l'expression des protéines de

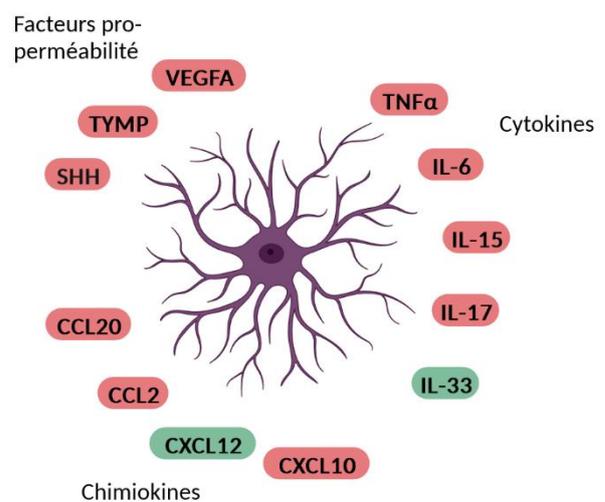


Figure 19 Récapitulatif des facteurs sécrétés par les astrocytes réactifs au cours de la neuro-inflammation (les facteurs délétères sont en rouge et les facteurs protecteurs en vert).

jonctions endothéliales ainsi que les marqueurs d'activation endothéliaux.

5.3.1.1. Vascular endothelial growth factor A (VEGFA)

La famille des facteurs de croissance vascular endothelial growth factor (VEGF) contient 6 membres: VEGFA, VEGFB, CEGFC, VEGFD, VEGFE et placental growth factor (PGF). Ils se fixent sur des récepteurs tyrosine kinase dont il existe trois formes : fms related receptor tyrosine kinase 1 (FLT1) également appelé VEGFR1, kinase insert domain receptor (KDR) aussi appelé VEGFR2 et fms related receptor tyrosine kinase 4 (FLT4) aussi appelé VEGFR3. VEGFA est le ligand le plus connu et le plus étudié, il interagit majoritairement avec VEGFR2 et de manière plus anecdotique avec VEGFR1. L'axe VEGFA-VEGFR2 est très étudié dans l'angiogénèse durant le développement et dans l'homéostasie vasculaire (Apte, Chen, et Ferrara 2019).

Les premières mentions de l'expression de VEGF par des cellules gliales datent du début des années 90 dans les gliomes humains (J. A. Alvarez et al. 1992), dans le processus d'angiogénèse de la rétine chez le rat ou chez le chat (Stone et al. 1995) ou *in vitro* dans des cultures d'astrocytes de rat soumis à des conditions hypoxiques (Ijichi, Sakuma, et Tofilon 1995). En 1999, le laboratoire de MJ Merrill met en évidence que l'exposition chronique de cerveaux de rats sains à du VEGFA, délivré par pompe ou par vecteur viral, provoque une augmentation de la perméabilisation vasculaire, mesurée par radiographie après administration intraveineuse (M. A. Proescholdt et al. 1999). Toujours chez le rat, les auteurs rapportent une expression de VEGFA dès J6 post induction de l'EAE ainsi qu'une augmentation de cette production dans le temps. L'expression de VEGFA dans le SNC des animaux est corrélée à l'infiltrat parenchymal de cellules CD45+ (Martin A. Proescholdt et al. 2002). En 2002, le même laboratoire met en évidence une surexpression astrocytaire dans des zones corticales lésionnelles de patients atteints de SEP. L'équipe de GR John et AT Argaw a ensuite démontré que l'expression astrocytaire de VEGFA est en partie régulée par IL1B. IL1B induit la production de HIF1A via nuclear factor-kappa B (NFkB). HIF1A permet ensuite la formation d'un complexe hétérodimérique HIF1A / aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) qui transloque au noyau et active la transcription de gènes cibles notamment *VEGFA* (Argaw et al. 2006). *In vitro*, l'ajout de VEGFA à des cellules endothéliales cérébrales humaines (BMVECs) provoque une diminution de l'expression des protéines de jonctions CLDN5 et OCLN. *In vivo*, l'administration stéréotaxique intra corticale de VEGFA à des souris sauvages induit une augmentation de la perméabilisation et une diminution de l'expression de la CLDN5 et de l'OCLN (Argaw et al. 2009). En créant un modèle murin de knockdown astrocytaire de VEGFA (VEGFA ACKO) sous promoteur GFAP, les auteurs ont ensuite montré que les signes cliniques de l'EAE chez ces souris sont extrêmement réduits, faisant de l'axe IL1B/VEGFA/CLDN5 une cible thérapeutique intéressante. De plus en aval de VEGFA, les auteurs ont montré que la

diminution de l'expression de la CLDN5 endothéliale par le VEGFA astrocytaire passe par l'activation du VEGFR2 endothélial qui active l'endothelial nitric oxide synthase (eNOS) via la phospholipase C gamma 1 (PLCG1). L'utilisation d'un inhibiteur d'eNOS, la cavtratin, chez des souris atteintes d'EAE permet également une réduction des signes cliniques de la pathologie, similaire à la réduction observée chez les souris VEGFA^{ACKO} (Argaw et al. 2012).

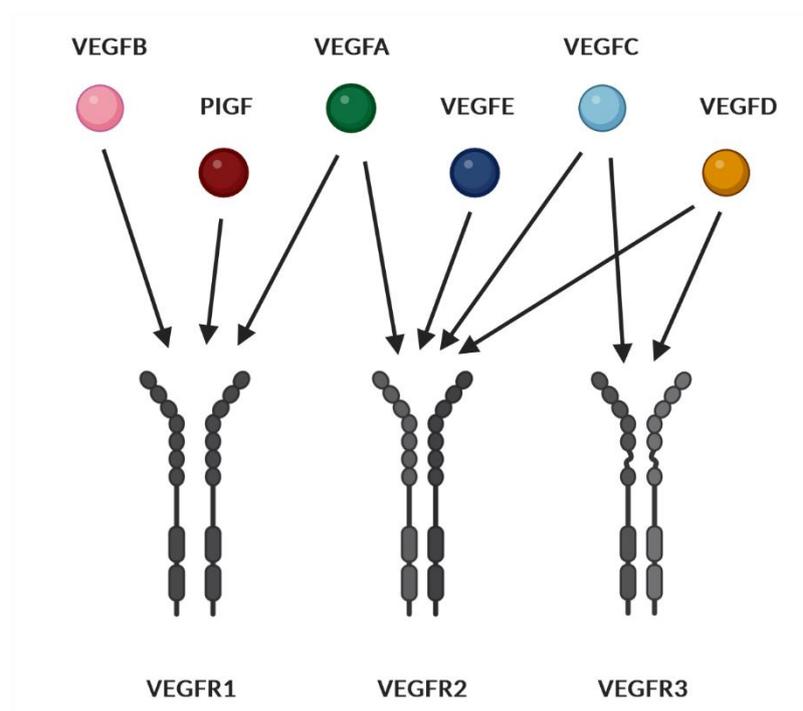


Figure 20 Schématisation des interactions entre les VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 et leurs ligands

Malgré les travaux du laboratoire de GR John sur l'importance de VEGFA dans l'ouverture de la BHE en condition neuro-inflammatoire, le blocage de VEGFA ne permet pas une abrogation complète des signes cliniques de l'EAE suggérant que d'autres voies sont impliquées dans l'ouverture de la BHE.

5.3.1.2. Tymidine phosphorylase (TYMP)

En réalisant un screening sur des astrocytes humains en culture stimulés par IL1B, Chapouly *et al.* ont identifié la tymidine phosphorylase (TYMP), aussi connue sous le nom d'endothelial cell growth factor-1 (ECGF1), comme un facteur pro- perméabilisation (Chapouly et al. 2015). L'implication de TYMP dans l'angiogenèse tumorale a précédemment été démontrée dans certains cancers de la sphère digestive (Saeki et al. 1997; Maeda et al. 1996; Igarashi et al. 1998; Takao et al. 1998), dans le cancer du sein (Engels et al. 1997) et dans le cancer du poumon (Koukourakis et al. 1997). L'effet endothélial de TYMP est dû à la protéine mature mais également à l'un de ses produits de dégradation, le 2-deoxy-D-ribose (DDR). En effet, TYMP catalyse la transformation de la thymidine en thymine et en 2-deoxy-D-ribose-1-phosphate, ultérieurement déphosphorylé pour donner le DDR (Sengupta et al. 2003).

Chapouly *et al.* ont démontré que le DDR a les mêmes effets que le VEGFA sur la diminution de l'expression des protéines de jonctions CLDN5 et OCLN à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les auteurs ont

également mis en évidence que les effets du VEGFA et du DDR sont synergiques. Cependant, malgré ces effets similaires, le séquençage de cellules endothéliales incubées avec du VEGFA et du DDR a montré que les gènes modulés par ces deux facteurs sont différents et sur les 80 gènes modulés par VEGFA et 41 modulés par DDR, seuls 9 sont communs (Chapouly et al. 2015).

5.3.1.3. Voie hedgehog

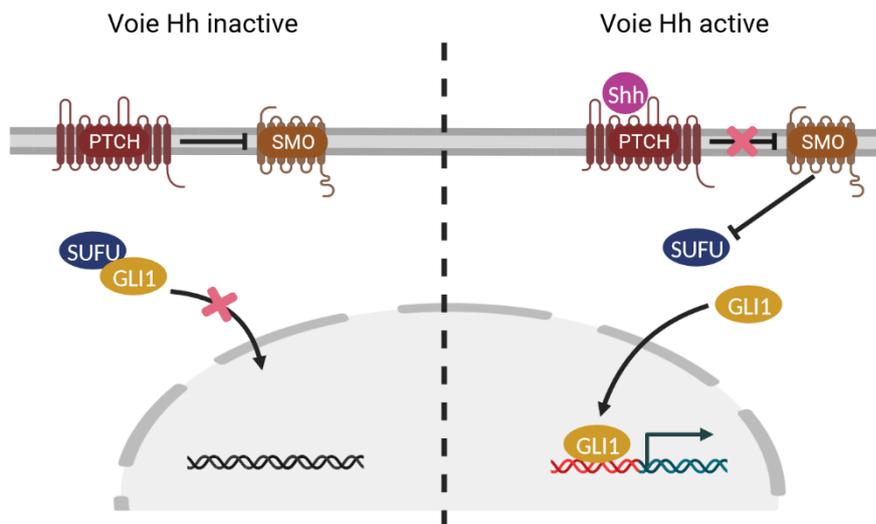


Figure 21 Schéma simplifié de la voie Hh

Chez les mammifères, il existe 3 ligands de la voie hedgehog : sonic (SHH), indian (IHH) et desert (DHH) hedgehog. Ils sont synthétisés sous forme de précurseurs qui subissent des modifications post-traductionnelles : clivage, modification du cholestérol en C-terminal

et palmitoylation en N-terminal. Les protéines hedgehog initient leur signalisation en se liant au récepteur patched 1 (PTCH1) ce qui entraîne une levée d'inhibition de smoothened, frizzled class receptor (SMO). SMO provoque ensuite la dissociation des protéines de la famille GLI family zinc finger (GLI) de leurs inhibiteurs dont SUFU negative regulator of hedgehog signaling (SUFU). Les protéines de la famille GLI agissent ensuite comme effecteur transcriptionnel de la voie (Beachy et al. 2010).

Le rôle critique de la signalisation hedgehog dans la neuro-inflammation a été mis en évidence pour la première fois en 2011 par l'équipe d'A. Prat ; cette étude a révélé qu'en condition de SEP ou d'EAE, le morphogène SHH est exprimé par les astrocytes réactifs et participe au maintien de l'homéostasie de la BHE (J. I. Alvarez et al. 2011). Cependant, à la suite de cette découverte, notre groupe a constaté que, si SHH est exprimé par les astrocytes activés, DHH est quant à lui physiologiquement exprimé par les cellules endothéliales chez l'adulte, notamment au niveau de la BHE (Hollier et al. 2021). Nous avons démontré que le DHH endothélial est régulé négativement au cours de l'EAE et que le knockdown endothélial de DHH est suffisant pour induire la perméabilisation de la BHE en inhibant l'expression de jonctions serrées. Parallèlement, notre équipe a publié une étude qui démontre que l'expression ectopique de SHH par les astrocytes activés en condition d'EAE induit une rupture de la BHE en agissant comme antagoniste compétitif de DHH au niveau endothélial. En effet, dans un contexte de neuro-

inflammation chronique, les deux ligands entrent en compétition au niveau de leur liaison au récepteur PTCH1 sur les cellules endothéliales : ainsi, la sécrétion massive de SHH par les astrocytes contribue au déplacement de DHH de son récepteur au niveau de la BHE avec pour conséquence une rupture de l'UNV. Cette étude a permis de réconcilier un certain nombre de données bibliographiques incohérentes concernant le rôle de la signalisation hedgehog dans la biologie de l'UNV. En effet, pendant longtemps, l'absence d'inhibiteurs spécifiques de chaque ligand hedgehog ou de souris knockdown spécifique d'un ligand dans un type cellulaire donné a contribué à des conclusions erronées. L'utilisation d'anticorps qui ne discriminent pas les trois ligands hedgehog ainsi que l'utilisation d'inhibiteurs de SMO et de modèles murins knockdown pour SMO en sont la cause majeure (Hollier et al. 2021).

5.3.2. Astrocytes et cellules inflammatoires

Au sein de l'UNV, les astrocytes sont très impliqués dans la communication avec les cellules immunitaires. Outre des contacts directs des astrocytes avec les cellules immunitaires piégées dans l'espace périvasculaire ou infiltrées dans le parenchyme cérébral, la localisation anatomique des pieds astrocytaires de la glia limitans au contact des vaisseaux de la BHE rend possible une communication juxtacrine et paracrine avec les cellules immunitaires via la sécrétion de facteurs solubles.

5.3.2.1. Facteurs solubles

5.3.2.1.1. Cytokines

Le TNF est surexprimé dans les lésions actives, aiguës et chroniques, de cerveaux de patients atteints de SEP (Selmaj et al. 1991). Cependant cette cytokine a été identifiée comme ayant à la fois des rôles bénéfiques et délétères dans l'EAE. Cela peut s'expliquer par le fait que le TNF existe sous deux formes : une forme soluble (solTNF) et une forme membranaire (memTNF). Ainsi, chez des souris atteintes d'EAE, en utilisant des inhibiteurs du TNF dirigés contre les différentes formes, Brambilla *et al.* ont démontré que le solTNF, en se fixant sur TNFR1, est responsable d'actions pro-apoptotiques et pro-inflammatoires et que le memTNF, en se fixant sur le récepteur TNFR2, possède des actions anti-inflammatoires et remyélinisantes (Brambilla et al. 2011). Plus récemment, Plumb *et al.* ont mis en évidence, chez des patients atteints de SEP, une augmentation de l'expression d'ADAM metallopeptidase domain 17 (ADAM17), dans les astrocytes réactifs au sein des lésions actives de la substance blanche. ADAM17 est une enzyme provoquant la coupure de TNF sous forme soluble suggérant un rôle neurotoxique du TNF astrocytaire (Plumb et al. 2006). Cependant, il faut noter que les astrocytes expriment TNFR1 mais aussi TNFR2 et que le rôle anti-inflammatoire et pro-myélinisant associé à l'activation du TNFR2 astrocytaire a été mis en évidence dans un modèle cuprizone, donc un

modèle de démyélinisation toxique et non auto-immun, sous la dépendance de CXCL2 (J. R. Patel et al. 2012).

L'IL6 est surexprimée notamment par les astrocytes activés dans les cerveaux de patients atteints de SEP au niveau de lésions actives aiguës et chroniques (Maimone, Guazzi, et Annunziata 1997; Schönrock, Gawlowski, et Brück 2000). Si plusieurs équipes se sont intéressées à l'IL6 en contexte neuro-inflammatoire, son rôle exact n'est toujours pas connu dans la physiopathologie de la SEP. Certaines études suggèrent un rôle bénéfique de l'IL6 astrocytaire, notamment parce que, dans des cerveaux humains les astrocytes IL6+ sont majoritairement situés proche des oligodendrocytes sains (Schönrock, Gawlowski, et Brück 2000). À l'inverse, plusieurs études chez la souris suggèrent un rôle délétère de l'IL6. En effet, dans un modèle murin présentant un knockdown total pour l'IL6, les souris déficientes sont complètement résistantes à l'induction de l'EAE (Okuda et al. 1998). Dans un modèle de souris inductibles knockdown pour l'IL6 spécifiquement dans les astrocytes, le délai d'apparition des signes cliniques de l'EAE est allongé chez les femelles qui présentent également une diminution des zones de démyélinisation et une diminution de l'infiltration cellulaire dans le parenchyme. Cependant, ces différences de score clinique entre les femelles déficientes en IL6 astrocytaire et les femelles du groupe contrôle restent minimales en comparaison des effets cliniques obtenus avec le knockdown total de l'IL6. Cela peut s'expliquer par le fait que le knockdown astrocytaire est compensé par la production de l'IL6 par d'autres types cellulaires notamment les lymphocytes B. Chez les mâles à l'inverse, aucune différence n'est observée, tant cliniquement qu'histologiquement (Erta et al. 2016).

D'autres interleukines sont également produites par les astrocytes mais leurs rôles sont moins connus.

L'interleukine 33 (IL33) est surexprimée dans le SNC des patients atteints de SEP, à la fois dans les lésions corticales (plaques) et dans les régions saines du cerveau et de la moelle épinière, par rapport aux volontaires sains (Christophi et al. 2012). Dans un modèle animal d'EAE, Chen *et al.* ont démontré qu'IL33 est libérée par les astrocytes activés et les neurones mourants au cours de la progression de la maladie ce qui prévient l'exacerbation de l'EAE. Après administration d'un anticorps bloquant dirigé contre l'IL33 dans les ventricules cérébraux, les auteurs ont observé une augmentation des scores cliniques, une démyélinisation accrue et une infiltration plus importante de cellules CD3+ dans le SNC (Chen et al. 2015). En 2019, la même équipe a répété l'expérience dans un modèle de souris avec knockdown total d'IL33. Les auteurs ont confirmé les données obtenues avec l'anticorps et ont montré une exacerbation du handicap et de la démyélinisation de la moelle épinière, corrélée à une diminution des cellules T régulatrices dans la rate et les ganglions lymphatiques et une diminution des populations de cellules TH2 dans le SNC des souris knockdown IL33 induites par l'EAE (Xiao et al. 2018). Cependant, ces données sont critiquables car l'effet observé sur la physiopathologie de l'EAE est lié à l'inhibition

totale de l'IL33 chez la souris via l'utilisation d'un anticorps bloquant ou par un knockdown total de l'IL33. Ainsi, l'effet spécifique de l'IL33 astrocytaire ne peut être identifié avec certitude dans ces modèles. En outre, les scores cliniques en phase de plateau chez les animaux témoins sont anormalement bas pour les modèles d'EAE.

L'interleukine 15 (IL15) est peu exprimée à l'état basal par les astrocytes. Cependant, l'équipe de Saikali a mis en évidence une surexpression astrocytaire de cette cytokine dans les lésions corticales et leur pourtour chez des patients atteints de SEP. Dans ses travaux, cette équipe démontre que les lymphocytes T CD8+ sont situés dans les zones où l'IL-15 est surexprimée suggérant un rôle de l'IL-15 astrocytaire dans la promotion des fonctions cytotoxiques des lymphocytes T CD8 (Saikali et al. 2010). Il n'y a que très peu d'études d'autres groupes sur le rôle de l'IL-15 astrocytaire dans l'EAE ou dans la SEP à notre connaissance.

L'IL17A est produite en grande quantité par les lymphocytes T après induction de l'EAE. Les astrocytes expriment le récepteur à l'IL17A de manière constitutive et le sur-expriment en condition neuro-inflammatoire (Das Sarma et al. 2009). *In vitro*, le traitement de cultures d'astrocytes avec un cocktail d'IL17A et de TNF provoque la translocation nucléaire de NFkB et la production d'interleukines (IL6 et IL8) et de chimiokines (CXCL1, CXCL2 et CCL20) (Elain et al. 2014). Le récepteur à l'IL17A est un complexe hétérodimérique composé de protéines de la famille SEFIR : interleukin 17 receptor A (IL17RA) et interleukin 17 receptor C (IL17RC) (Toy et al. 2006). Act1 adaptor protein (ACT1) est une protéine cytoplasmique qui appartient également à la famille des protéines SEFIR. Après stimulation par l'IL17A, ACT1 est recruté au niveau du récepteur à l'IL17A via une interaction dépendante du domaine SEFIR. ACT1 provoque à son tour le recrutement de kinases de la famille TNF receptor associated factor (TRAF) telles que TRAF6 qui active la voie du NFkB (Gu, Wu, et Li 2013). *In vivo*, en utilisant un knockdown d'ACT1 sous contrôle du promoteur de la Nestin (souris *NesCreAct1fl/-*) pour induire une inhibition d'ACT1 spécifiquement dans les précurseurs neuronaux, Kang *et al.* ont mis en évidence, chez les souris déficientes, un délai de l'apparition des signes cliniques après induction de l'EAE et une diminution de l'incapacité physique à l'acmé. Une moindre infiltration de cellules inflammatoires dans la moelle épinière des souris déficientes en ACT1 dans les précurseurs neuronaux a également été observée, associée à une démyélinisation moins importante (Kang et al. 2010).

5.3.2.1.2. Chimiokines

Le C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2) est la chimiokine la plus étudiée dans la SEP et l'EAE. Dans l'EAE, les cellules du SNC qui produisent majoritairement le CCL2 sont les astrocytes et les cellules endothéliales (Shrestha, Ge, et Pachter 2014). Dans les astrocytes, sa production est sous la dépendance de nuclear factor kappa B (NFkB) qui, suite à une stimulation avec le TNF, est recruté au

niveau du promoteur du CCL2 et agit comme facteur de transcription (Giraud et al. 2010). En utilisant un knockdown astrocytaire du CCL2, Kim *et al.* ont montré que le CCL2 astrocytaire était délétère dans l'EAE et responsable de l'infiltration de macrophages et de lymphocytes T dans le parenchyme (R. Y. Kim et al. 2014). Paul et al., en comparant des souris knockdown pour CCL2 au niveau astrocytaire (ACKO) ou au niveau endothélial (ECKO) et induites par l'EAE et en analysant la physiopathologie de la maladie à J9 et à J16 post-induction, ont déterminé de manière plus fine l'action de cette chimiokine sur la perturbation des protéines jonctionnelles et la perméabilisation de la BHE. À J9 post induction, *i.e.* avant l'apparition des premiers symptômes de la maladie, l'expression de la CLDN5 est diminuée dans les souris contrôles et les souris ECKO mais préservée dans les souris ACKO soulignant l'effet précoce du CCL2 astrocytaire sur la déstabilisation des protéines jonctionnelles. Le CCL2 astrocytaire est également responsable du passage des leucocytes dans le parenchyme, un agrégat périvasculaire de cellules inflammatoires étant retrouvé à J16 chez les souris ACKO contrairement aux souris ECKO et contrôles. Le CCL2 endothélial, en revanche, semble participer uniquement au passage transendothélial des cellules immunitaires (Paul et al. 2014).

Le C-C motif chemokine ligand 2 (CCL20), initialement appelé macrophage inflammatory protein (MIP)-3a, est le ligand du récepteur CC-chemokine receptor (CCR) 6. Ce récepteur est situé sur les lymphocytes T mémoires (Maki et al. 2002), les lymphocytes B matures (Krzysiek et al. 2000) et les cellules dendritiques (Varona et al. 1998). Les astrocytes ont été identifiés comme source principale du CCL20 dans le contexte de l'EAE. L'équipe d'Ambrosini a ainsi mis en évidence que cette production est sous la dépendance d'IL1B et de TNF *in vivo* (Ambrosini et al. 2003). Meares *et al.* ont également mis en avant le rôle de l'IL6 et de l'IL17A sur l'activation transcriptionnelle du gène codant pour le CCL20 via la phosphorylation de STAT3 et NFkB dans les astrocytes (Meares et al. 2012). Enfin, Ambrosini *et al.* ont mis en évidence le rôle chémoattractant du CCL20 astrocytaire sur les lymphocytes TH1 et TH2 *in vitro* en utilisant du milieu conditionné d'astrocytes stimulés par IL1B / TNF (Ambrosini et al. 2003). À ce jour, aucune souris transgénique pour le CCL20 n'a été développée, rendant difficile une transposition de ces résultats *in vivo*. Cependant le knockdown du récepteur du CCL20 existe ; Reboldi et al., dans ce modèle murin, après induction de l'EAE, ont décrit une résistance des souris knockout au développement de la paralysie. En effet des lymphocytes TH1 et TH17 réactifs contre la myéline sont retrouvés chez ces animaux au niveau de la rate mais pas du SNC. Cela s'explique par le fait que les lymphocytes TH17 sont piégés entre les cellules endothéliales et les cellules épithéliales du plexus choroïde exprimant le CCL20, soulignant l'importance du CCL20 pour le passage des lymphocytes TH17 à travers le plexus choroïde (Reboldi et al. 2009).

Le CXC motif chemokine ligand 10 (CXCL10) aussi appelé IP-10 est une cytokine de la famille CXC dont les effets pro-inflammatoires sur l'infiltration tissulaire ont initialement été mis en évidence dans l'hépatite C. Le CXC motif chemokine ligand 9 (CXCL9), ou monokine induced by gamma interferon (MIG), est une chimiokine de la même famille dont les effets ont été décrits dans des modèles tumoraux. Ces deux protéines possèdent un récepteur commun, le CXCR3. Simpson et al., dans une analyse post mortem de cerveaux de patients atteints de SEP, décrivent une expression astrocytaire et macrophagique du CXCL10 et CXCL9 en bordure de lésion démyélinisante active. Le CXCR3 est quant à lui exprimé par les lymphocytes dans la lésion. En parallèle les auteurs montrent également une expression d'IFNG, connue pour provoquer une augmentation de l'expression du CXCL10 et CXCL9, dans les infiltrats périvasculaires. L'expression du CXCL10 et CXCL9 n'est cependant pas retrouvée dans les lésions chroniques non actives. Au vu de ces résultats, les auteurs proposent la séquence d'activation suivante : l'expression d'IFNG par les lymphocytes périvasculaires induit l'expression du CXCL10 et CXCL9 par les astrocytes qui à leur tour provoquent le recrutement de lymphocytes exprimant le récepteur CXCR3 au niveau de la lésion (Simpson et al. 2000). En dehors de leur rôle sur le recrutement lymphocytaire, les chimiokines CXCL10 et CXCL9 joueraient également un rôle dans la communication astrocyte – astrocyte et astrocyte – microglie. En effet, comme l'équipe de Simpson, Tanuma *et al.* ont mis en évidence une expression astrocytaire et microgliale du CXCR3 dans des lésions actives de SEP. Les auteurs font l'hypothèse que la communication entre une chimiokine (CXCL9/10) et son récepteur CXCR3 conduit au recrutement des astrocytes et de la microglie au sein des lésions (Tanuma et al. 2006). Dans un modèle murin de knockdown astrocytaire pour CXCL10, soumis au protocole d'EAE, Mills Ko *et al.* ont confirmé le rôle délétère du CXCL10 astrocytaire sur l'évolution aiguë de la maladie via une amélioration du score clinique et une diminution de la démyélinisation chez les souris CXCL10 ACKO, sans effet sur la perte axonale chronique. Concernant l'infiltrat lymphocytaire, aucune modification n'est observée dans le parenchyme mais deux différences majeures sont mises en avant par les auteurs : une diminution du ratio TH1 / TH17 et une diminution de l'accumulation de lymphocyte T CD4+ dans les espaces périvasculaires (Mills Ko et al. 2014).

Le CXC motif chemokine ligand 12 (CXCL12), aussi appelé stromal cell-derived factor 1, est un inhibiteur connu de l'entrée des lymphocytes dans le SNC, surexprimé par les astrocytes chez les patients atteints de SEP. Meiron et al., en injectant un anticorps neutralisant anti CXCL12 à des souris atteintes d'EAE, ont mis en évidence un effet anti-inflammatoire du CXCL12. En effet, en plus de l'effet attractant sur les lymphocytes T, le CXCL12 impacte également leur polarisation. Le traitement des souris par le CXCL12 permet un switch des lymphocytes TH1 pro-inflammatoires vers des lymphocytes T régulateurs anti-inflammatoires produisant de l'IL10 (Meiron et al. 2008). De plus, dans un modèle cuprizone, Patel *et al.* ont mis en évidence que le CXCL12 astrocytaire en se fixant sur son récepteur CXCR4 au niveau

des oligodendrocytes, promeut la prolifération, la migration et la différenciation des oligodendrocytes (J. R. Patel et al. 2012).

5.3.2.2. Production des chimiokines et cytokines et régulation

La production de très nombreuses molécules par les astrocytes en conditions neuro-inflammatoires est sous la dépendance de NFκB. L'activation de la voie canonique, ou voie classique, du NFκB aboutit à l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (telles que le TNF, l'IL1B et l'IL6), des facteurs de croissance (tels que colony stimulating factor 2 (CSF2) également appelé Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)), des chimiokines (IL8, le ligand 1 de la chimiokine CXC (CXCL1), le ligand 3 de la chimiokine CC (CCL3), CXCL2, CCL2 et CCL5), des enzymes de la famille matrix metallopeptidase (MMP) comme MMP9, des protéines pro-prolifératives (comme la cycline D1 et MYC), des protéines anti-apoptotiques (comme BCL XL, BCL 2 et FLIP (également connu sous le nom de CFLAR)), des enzymes pro-inflammatoires (comme la prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) également appelé COX2 et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS ; également appelée NOS2)), des facteurs angiogéniques (tels que le VEGFA), des molécules d'adhésion (telles que VCAM1, ICAM1 et SELE) et des inhibiteurs de la signalisation NFκB (tels que NFκB inhibitor alpha (NFκBIA) et TNF alpha induced protein 3 (TNFAIP3), également appelée A20).

Afin de mieux caractériser les effets du NFκB astrocytaire, l'équipe de Brambilla a créé un modèle murin transgénique d'inactivation de NFκB au niveau astrocytaire en surexprimant, sous le promoteur GFAP, dn-IκBα, un super répresseur de NFκB. En soumettant ces souris à l'EAE, les auteurs ont ainsi mis en évidence que l'inhibition du NFκB astrocytaire, permet une amélioration du score clinique des souris, une diminution de l'infiltration leucocytaire et une diminution de l'astrogliose. Ces améliorations cliniques et histologiques sont corrélées à une diminution de l'expression de molécules pro-inflammatoires 17 jours après l'induction de l'EAE (cytokines (TNF, IFNG, IL1B), de chimiokines (CCL2, CCL5, CXCL9, CXCL10)) et de leurs récepteurs (CXCR2 et CCR2) (Brambilla et al. 2009).

Les astrocytes ont un impact important sur l'homéostasie de la barrière et leur dysfonction peut être majeure dans la physiopathologie de maladies neurologiques. En fonction du microenvironnement, les astrocytes peuvent adopter différents phénotypes, soit bénéfiques, soit délétères. De manière intéressante ces différents clusters semblent suivre une répartition spatiale.

La recherche de nouvelles voies de signalisation permettant de réguler ces fonctions astrocytaires, en diminuant les phénotypes délétères ou en augmentant les phénotypes bénéfiques, pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante en contexte neuro-inflammatoire.

6. La voie NOTCH

Le gène *NOTCH* a été décrit pour la première fois dans les années 1910 lors de travaux chez la drosophile et a par la suite été retrouvé chez la plupart des vertébrés, traduisant l'ancienneté et la conservation de cette voie de signalisation (Mohr 1919)

Une haplo-insuffisance du gène *NOTCH* chez la drosophile provoque un défaut anatomique au niveau des ailes à types d'encoches ou « *notches* » en anglais ce qui explique le nom donné à la voie. Une

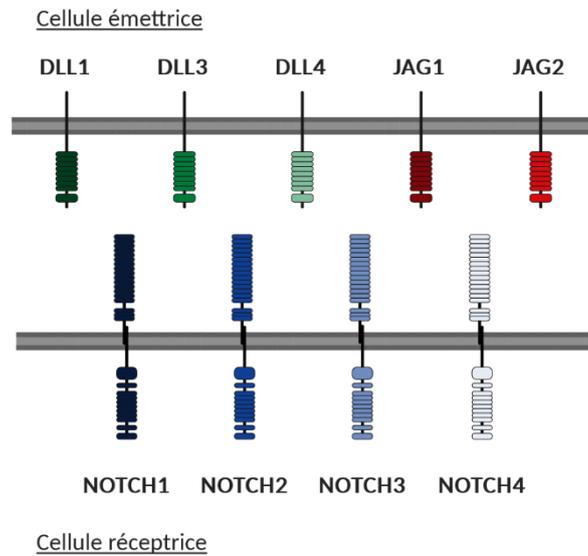


Figure 22 Ligands et récepteurs de la voie NOTCH

déplétion totale est quant à elle létale.

6.1. L'architecture de la voie

Les deux acteurs principaux de la voie NOTCH sont les récepteurs NOTCH et leurs ligands, de la famille Delta/Serrate/Lag-2 (DSL).

À la différence de nombreuses voies cellulaires, la voie NOTCH ne possède pas d'intermédiaire entre son récepteur membranaire et l'effecteur nucléaire. En effet, la partie intracellulaire du récepteur est transloquée au noyau après plusieurs clivages enzymatiques successifs (Kopan et Ilagan 2009).

6.1.1. Récepteurs

La voie NOTCH est hautement conservée au sein des métazoaires mais le nombre de gènes homologues varie selon les espèces, ainsi la drosophile possède un seul gène *Notch* alors que les mammifères ont 4 gènes *NOTCH* paralogues, numérotés de 1 à 4 et situés chez l'homme sur les chromosomes 9, 1, 19 et 6 respectivement (Hori, Sen, et Artavanis-Tsakonas 2013; Larsson et al. 1994; Linheng Li et al. 1998).

Les récepteurs sont constitués d'une partie extracellulaire, d'une partie transmembranaire et d'une partie intracellulaire. La partie extracellulaire contient un nombre variable de répétition en tandem de domaine EGF like. La partie intracellulaire contient une séquence appelée RAM (RBPJ association module) responsable de la liaison avec RBPJ (Borggreffe et Oswald 2009), un facteur de transcription ubiquitaire qui provoque le recrutement d'autres facteurs de transcription (Dreval, Lake, et Fan 2019). En ce qui concerne les cellules dérivées des progéniteurs neuronaux, la plupart des études sur la voie NOTCH ont été réalisées au cours du développement ou dans des conditions pathologiques, et seules quelques rares études se sont concentrées sur la voie NOTCH dans des conditions physiologiques chez l'adulte. NOTCH1 est le plus étudié dans le SNC, étant exprimé par les neurones pyramidaux et jouant un rôle dans les processus de mémoire et de plasticité synaptique (Alberi et al. 2013; Ables et al. 2011). Cependant, des récepteurs NOTCH ont également été identifiés chez l'adulte au niveau de la BHE, dans les cellules endothéliales pour NOTCH1 (Limbourg et al. 2005) et NOTCH4 (P. A. Murphy et al. 2008), et dans les cellules murales (péricytes et CMLs) pour NOTCH3 (H. Liu, Kennard, et Lilly 2009).

6.1.2. Ligands

De la même manière que pour les récepteurs, le nombre de gènes homologues varie pour les ligands. Chez la drosophile, deux ligands de Notch (N) ont été identifiés, Delta (DI) et Serrate (Ser) (Klueg et Muskavitch 1999), alors qu'à ce jour, cinq ligands ont été identifiés chez l'homme : delta like canonical notch ligand 1 (DLL1), delta like canonical notch ligand 3 (DLL3), delta like canonical notch ligand 4 (DLL4), jagged canonical notch ligand 1 (JAG1), and jagged canonical notch ligand 2 (JAG2). Ils possèdent tous une structure transmembranaire similaire à celle des récepteurs (Kopan et Ilagan 2009).

6.2. Interaction ligand récepteur

Chez la drosophile, l'activité des ligands DI et Ser est régulée par fringe (fng), une glycosyltransferase. En effet, son expression dans la même cellule que le récepteur provoque une glycosylation de la séquence EGF répétée sur le domaine extracellulaire du récepteur et favorise ainsi la liaison de Delta tout en inhibant celle de Ser. De manière similaire chez l'homme, les homologues de fringe, LFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase (LFNG) également appelé lunatic fringe, MFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase (MFNG) également appelé manic fringe et RFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase (RFNG) également appelé radical fringe modulent l'interaction des ligands aux récepteurs : LFNG et MFNG favorisent la liaison de DLL1 et inhibent celle de JAG1 alors que RFNG favorise la liaison de DLL4 et JAG1 (Kakuda et Haltiwanger 2017; P. Taylor et al. 2014).

Malgré les différences de liaisons attribuables à la glycosylation du récepteur NOTCH, les ligands possèdent des affinités intrinsèques différentes pour les récepteurs : DLL1 possède une affinité plus importante pour NOTCH2 et DLL4 pour NOTCH1 (Tverikhina et al. 2018; Andrawes et al. 2013).

6.2.1. Cis-inhibition

Quand ils sont exprimés sur la même cellule que le récepteur, les ligands de Notch peuvent inhiber ces mêmes récepteurs. Ce phénomène est appelé cis-inhibition par opposition au phénomène de trans-activation, *i.e.* l'activation d'un récepteur sur une cellule A par un ligand sur une cellule B (*décrit en page 68 - Interaction ligand récepteur*) (del Álamo, Rouault, et Schweisguth 2011). Les seules fonctions connues de DLL3 à ce jour sont, par exemple, via une cis-inhibition de NOTCH1 (Ladi et al. 2005).

De la même manière que pour la trans-activation, la cis-inhibition est modulée par glycosylation de NOTCH. Mfng et Lfng favorisent la cis-inhibition de NOTCH par les ligands DLL et restreignent la cis-inhibition par les ligands JAG (LeBon et al. 2014).

6.2.2. Voie canonique

La liaison du ligand à un récepteur initie son endocytose ce qui provoque un changement de conformation du récepteur dégageant un site de clivage enzymatique appelé S2, cible des deux isoformes de l'enzyme ADAM, ADAM metallopeptidase domain 10 (ADAM10) et ADAM metallopeptidase domain 17 (ADAM17) (Stephenson et Avis 2012). Un deuxième clivage enzymatique par une gamma-secretase en intracellulaire au niveau du site S3 qui correspond à un complexe protéique contenant la presenilin 1 (PSEN1) et la presenilin 2 (PSEN2) (Y.-M. Li et al. 2000), l'aph-1 homolog A, gamma-secretase subunit (APH1A) et l'aph-1 homolog B, gamma-secretase subunit (APH1B), la presenilin enhancer, gamma-secretase subunit (PSENEN) et la nicastrin (NCSTN) (Bai et al. 2015; Kimberly et al. 2003), va provoquer la translocation de la partie intracellulaire du récepteur (NICD) au noyau.

Les gènes cibles de la voie canonique de NOTCH sont : *Hes family BHLH transcription factor (HES)* et *Hes related family bhlh transcription factor with YRPW (HEY)* (Bray 2006).

L'augmentation quantitative du NICD par clivage et de HES et HEY au niveau transcriptionnel est un signal d'activation de la voie NOTCH.

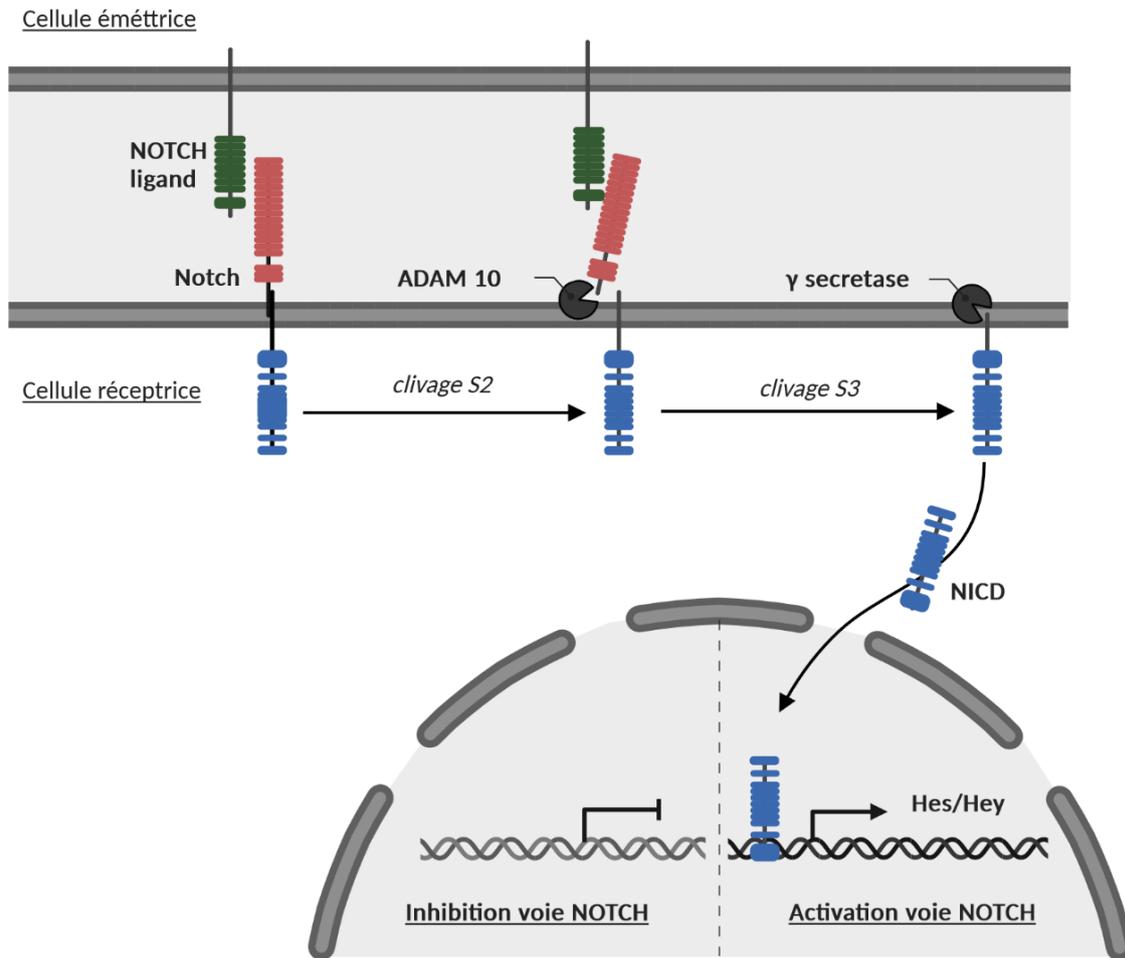


Figure 23 Schématisation de la voie canonique de la voie NOTCH

6.2.3. Voie non canonique

Il existe également une voie NOTCH non canonique représentée par plusieurs mécanismes.

Les récepteurs NOTCH matures sont recyclés après endocytose (Conner 2016). Ils peuvent alors être re-adressés à la membrane, détruits dans les lysosomes ou activés dans les endosomes, indépendamment d'un ligand. En effet, les endosomes contiennent des enzymes ADAM et des gamma-secretases (Steinbuck, Arakcheeva, et Winandy 2018).

NICD peut également interagir indépendamment du CSL, via une interaction directe avec d'autres protéines, tel que NFKB (L. L. Song et al. 2008).

6.3. Role de la voie Notch dans le développement et l'homéostasie des différents systèmes

Très étudiée dans le développement, la voie NOTCH reste exprimée à bas bruit chez l'adulte mais peut être réactivée à la faveur d'un stress ou d'un traumatisme, comme l'ischémie ou le cancer par exemple (Siebel et Lendahl 2017).

6.3.1. Système vasculaire

La circulation sanguine prend naissance dans le cœur, passe par des artères de gros calibre puis des artères de calibre inférieur, les artérioles, et enfin les capillaires qui forment un vaste réseau complexe au sein duquel se déroulent les échanges gazeux et métaboliques entre le sang et les tissus. Le sang repart ensuite via les veinules et les veines vers le cœur. Pour augmenter le transport du sang et indirectement celui des nutriments et de l'oxygène dans les tissus en croissance, les artères et les veines se dilatent grâce à des processus de croissance et de remodelage circonférentiels. Les capillaires eux, se développent et se ramifient en réseau plus complexe.

Durant le développement, afin de former de nouveaux vaisseaux, certaines cellules endothéliales des capillaires vont entrer en germination (« *sprouting* »). Ces cellules sont appelées *tip cells*. Pour obtenir un réseau capillaire fonctionnel et maintenir une perfusion tissulaire efficace, toutes les cellules endothéliales ne peuvent pas entrer en germination en même temps, ce phénomène doit donc être finement régulé. La voie NOTCH joue un rôle majeur dans la régulation de ce phénomène. DLL4 est exprimée dans les *tip cells* et l'activation de NOTCH1 dans les cellules adjacentes, dénommées *stalk cells*, empêche leur entrée en germination (Hellström et al. 2007; Suchting et al. 2007).

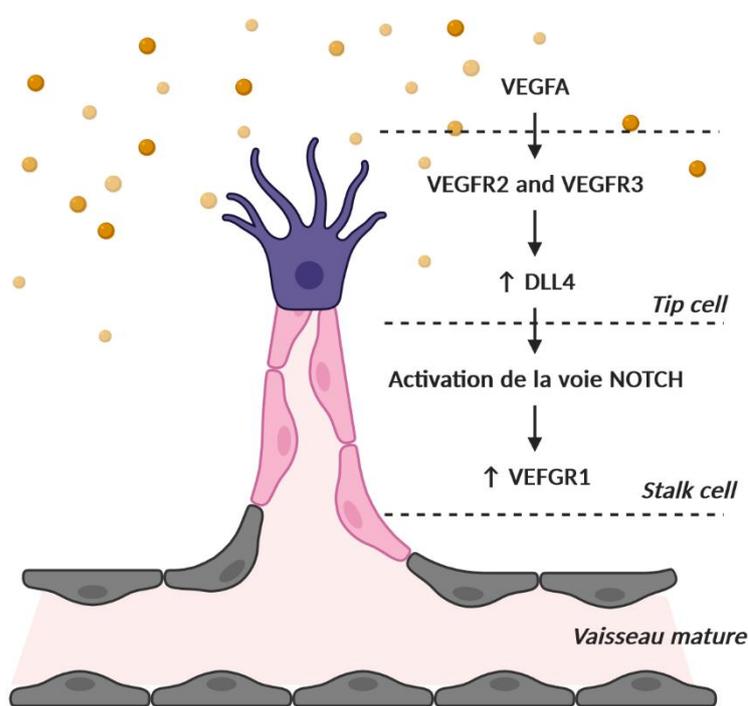


Figure 24 Régulation de l'angiogénèse via la voie NOTCH

La voie NOTCH est également impliquée dans la maturation des nouveaux vaisseaux. Dans un modèle murin transgénique d'inhibition de la voie NOTCH dans les péricytes (*Rbpj Δ PC*, i.e. un KO inducible de RBPJ dans les péricytes), Nadeem *et al.* ont mis en évidence une augmentation du nombre de malformations artério-veineuses à cause d'une absence de remodelage des vaisseaux liée à une baisse de

la couverture péricytaire associée à une diminution de la survie des péricytes (Nadeem *et al.* 2020).

L'expression des ligands et des récepteurs de la voie NOTCH en conditions pathologiques est augmentée. Lindler *et al.* ont montré qu'en condition physiologique, les cellules endothéliales et les CMLs expriment uniquement et à bas bruit NOTCH1, JAG1 et JAG2. En utilisant un modèle murin soumis à un protocole de blessure vasculaire au niveau artériel à l'aide d'un cathéter de dénudation, les auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'expression de JAG1 et JAG2 et de NOTCH 1 et 4 dans les cellules endothéliales et les CMLs (Lindner *et al.* 2001).

Yang *et al.* se sont intéressés à la transcytose au niveau des vaisseaux de la rétine et ont mis en évidence que DLL4, dans les artères rétiniennes, est impliqué dans la maintenance de l'homéostasie de la barrière vasculaire rétinienne en limitant la transcytose indépendamment des protéines de jonction. En effet, une inhibition génique de DLL4 dans les cellules endothéliales ou systémique via l'administration d'un anticorps monoclonal bloquant dirigé contre DLL4 provoque une augmentation de la perméabilisation vasculaire au dextrans de poids moléculaire 4 000 et 10 000 daltons et au bleu Evans. Ainsi, l'augmentation de la transcytose et de la perméabilisation vasculaire retrouvée en condition d'hypertension serait due à une diminution de l'expression de DLL4 au niveau des cellules endothéliales (J. M. Yang *et al.* 2020).

6.3.2. Système hématopoïétique

Au cours du développement, la spécification des tissus s'accompagne d'une perte progressive du potentiel des cellules souches. On retrouve cependant des réservoirs importants de cellules souches dans les tissus qui se renouvellent continuellement à l'âge adulte comme les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les CSH somatiques proviennent des cellules embryonnaires et sont maintenues tout au long de la vie.

NOTCH est considérée comme une voie essentielle dans la maintenance et la régulation des cellules souches. Cependant son rôle varie selon les organes.

Chez les mammifères, NOTCH1 est indispensable pour la génération des CSH chez l'embryon mais inutile pour leur maintenance chez l'individu adulte. En effet, des CSH dépourvues de domaine RBPJ ou surexprimant le dominant négatif de mastermind like transcriptional coactivator 1 (MAML1), un inhibiteur de NOTCH, greffées à des souris irradiées permettent une reconstitution médullaire quantitativement et qualitativement normale (Maillard et al. 2008). Les mêmes résultats sont également observés après une délétion de JAG1 et de NOTCH1 (Mancini et al. 2005).

Des modèles expérimentaux de sur-stimulation ou d'inhibition de la voie NOTCH présentent un phénotype dans lequel les modifications majoritaires concernent les populations lymphocytaires.

L'inhibition constitutive de NOTCH1 chez des souris à P3 provoque un retard de croissance et un déficit de développement du thymus (diminution de la taille du thymus et du nombre de thymocytes). La greffe de cellules souches délétées pour NOTCH1 à des souris irradiées provoque une absence de population de la lignée T chez les animaux et une accumulation de lymphocytes B immatures dans le thymus suggérant que la signalisation via NOTCH1 dans les progéniteurs lymphoïdes agit comme un signal positif de différenciation en lymphocytes T via RBPJ et qu'en son absence une différenciation par défaut en lymphocytes B s'opère (Radtke et al. 1999; Wilson, MacDonald, et Radtke 2001; H. Han et al. 2002). À l'inverse, chez des souris greffées avec des cellules sur-exprimant une forme active de NOTCH1, un blocage précoce de la lignée B et une hyperplasie de la lignée T sont observés, confirmant l'importance de l'activité de NOTCH pour le destin B versus T dans la lignée lymphoïde (Pui et al. 1999). Chez l'homme, des mutations activatrices de NOTCH sont retrouvées dans les leucémies aiguës lymphoïdes de type T (Weng et al. 2004).

6.3.3. SNC

Comme développé précédemment (*en page 44 - Production des astrocytes*), chez les vertébrés, les cellules souches neurales, issues du neuro-épithélium, sont produites au stade embryonnaire et

donnent lieu à deux types de cellules : les neurones et les cellules gliales. La voie NOTCH est essentielle à plusieurs niveaux lors du développement du SNC et participe notamment activement à la destinée des cellules souches neurales (Louvi et Artavanis-Tsakonas 2006).

L'expression des protéines de la voie NOTCH n'implique pas forcément une augmentation de l'activation de la voie. De nombreuses études se sont donc intéressées à la surexpression de la voie soit par l'expression de gènes cibles de la voie NOTCH, soit en surexprimant NICD, forme active du récepteur NOTCH. Ainsi, l'utilisation d'un plasmide exprimant *HES1* ou *HES5*, *HESR1* ou *HESR2* et d'un rétrovirus exprimant *HES1* inhibe la différenciation des précurseurs neuronaux (Ishibashi et al. 1994; Sakamoto et al. 2003; Ohtsuka et al. 2001). De la même manière, après administration à E9,5 ou à E14,5 d'un rétrovirus exprimant NICD à des souris, les cellules infectées dans le cerveau acquièrent les caractéristiques morphologiques et l'expression des marqueurs de la glie radiale et deviennent des astrocytes à la naissance (Gaiano, Nye, et Fishell 2000; Chambers et al. 2001). Au niveau de la rétine, la surexpression d'une forme active de NOTCH chez le xénope ou la drosophile provoque une absence de différenciation en progéniteurs neuronaux intermédiaires (Dorsky, Rapaport, et Harris 1995; Fortini et al. 1993).

A l'inverse, la délétion génique de RBPJ chez des souris au stade embryonnaire augmente cette différenciation (Gao et al. 2009). De même, chez la souris, ChaC Glutathione Specific Gamma-Glutamylcyclotransferase 1 (CHAC1), plus connu sous le nom de Blocks Notch Protein (BOTCH), un

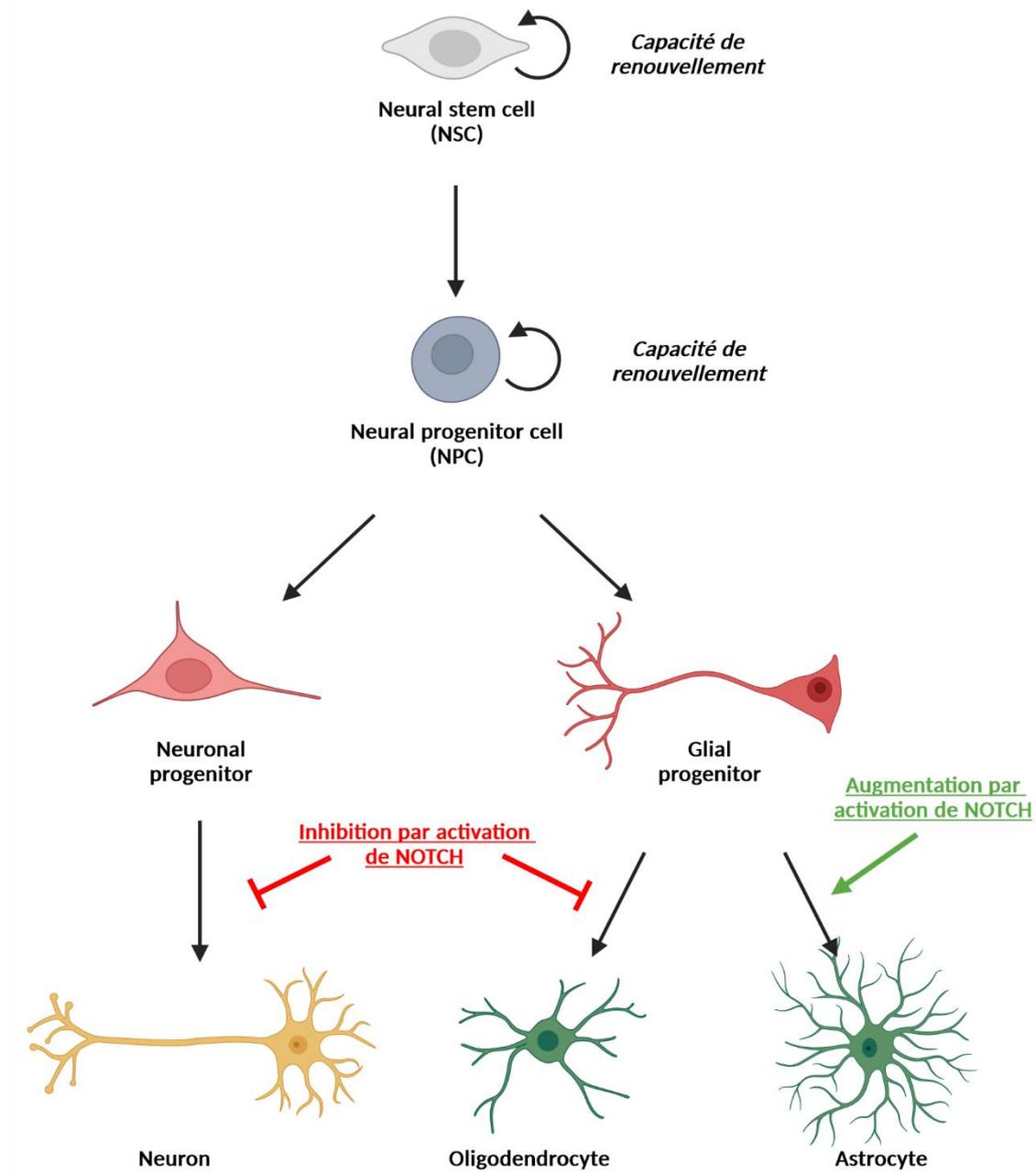


Figure 25 Effet de l'activation de la voie NOTCH sur la différenciation des cellules issues des progéniteurs neuraux

inhibiteur endogène de la voie NOTCH, en diminuant l'adressage à la membrane d'une forme mature de NOTCH1, promeut la neurogénèse au détriment des cellules gliales (Chi et al. 2012).

Une fois engagés dans la gliogénèse, les progéniteurs gliaux peuvent donner naissance à des astrocytes ou à des précurseurs d'oligodendrocytes (OPCs) qui donneront ensuite des oligodendrocytes.

La différenciation des progéniteurs gliaux est également sous la dépendance de la voie NOTCH et l'activation de celle-ci, via une transfection avec NICD, inhibe la différenciation en oligodendrocytes (S. Wang et al. 1998).

6.4. Thérapeutiques anti-NOTCH

Les thérapeutiques anti-NOTCH peuvent être séparées en deux catégories : les thérapeutiques non ciblées et les thérapeutiques ciblées. Dans la suite du manuscrit, les thérapeutiques présentées seront celles ayant dépassé le stade du développement préclinique, *i.e.* utilisées en essais clinique chez l'homme.

6.4.1. Thérapeutiques non ciblées

Parmi les thérapeutiques non ciblées, les seules ayant passé le stade du développement préclinique sont les inhibiteurs de gamma-secretase (GSI, de l'anglais *gamma-secretase inhibitor*). Initialement développés dans la maladie d'Alzheimer, (la gamma-secretase étant impliquée dans le clivage du peptide beta amyloïde), ces inhibiteurs ont été repositionnés dans des indications oncologiques notamment la leucémie aigüe myéloïde, le mélanome, les cancers gynécologiques et le cancer colorectal. Si certaines des molécules développées ont montré une activité anti-tumorale, c'est au prix d'une toxicité non négligeable, digestive et infectieuse, ayant conduit à l'arrêt de leur développement (Zhou et al. 2022).

6.4.2. Thérapeutique ciblée

Afin d'éviter les effets indésirables dus à une inhibition totale de la voie NOTCH, indépendamment du ligand et du récepteur impliqué, des anticorps monoclonaux plus spécifiques ont été développés.

6.4.2.1. DLL3

Le rovalpituzumab tesirine, un anticorps monoclonal anti-DLL3 conjugué à une toxine, a été développé dans les cancers du poumon à petites cellules. Même si cette molécule a permis d'obtenir des réponses cliniques encourageantes chez les patients en phase 1 avec des effets indésirables contrôlables, elle n'a pas réussi à remplir les critères d'efficacité d'essais de phases plus avancées. L'avenir du ciblage de DLL3 dans le cancer du poumon à petites cellules dépendra donc d'un meilleur ciblage des patients et du positionnement de cette nouvelle molécule au sein des lignes thérapeutiques déjà existantes (Hann et al. 2021; M. L. Johnson et al. 2021; Blackhall et al. 2021).

6.4.2.2. DLL4

Plusieurs anticorps monoclonaux ciblant DLL4 ont été développés chez l'homme, comme l'enoticumab et le demcizumab (les plus avancés en développement préclinique), notamment parce que DLL4 a la capacité de potentialiser les effets des thérapeutiques ciblant VEGFA. Malheureusement, l'efficacité modeste de ces anticorps dans les tumeurs solides est associée à une toxicité cardiaque (Coleman et al. 2020; D. C. Smith et al. 2014; Chiorean et al. 2015).

De façon intéressante, le navicixizumab, un anticorps monoclonal bi-spécifique ciblant à la fois DLL4 et VEGFA, a quant à lui montré un profil de sécurité satisfaisant et des signes d'activités anti-tumorales en phase I chez des patients atteints de tumeurs solides, justifiant la poursuite de son développement (Jimeno et al. 2019).

6.4.2.3. NOTCH1

Le brontictuzumab est un anticorps monoclonal ciblant NOTCH1 et inhibant l'activation de la voie. Dans un essai de phase 1 chez des patients atteints de tumeurs solides réfractaires, cet anticorps a montré des signes d'activité anti-tumorale associés à un bon profil de tolérance, à l'exception de diarrhées (Ferrarotto et al. 2018).

6.4.2.4. NOTCH2 et NOTCH 3

Le tarextumab cible à la fois NOTCH2 et NOTCH3 et, malgré une activité anti-tumorale *in vitro*, cet anticorps n'a pas montré de bénéfice clinique *in vivo* (Hu et al. 2019; D. C. Smith et al. 2019).

D'autre part, le PF-06650808, un anticorps monoclonal anti-NOTCH3 conjugué à une toxine, a montré un profil de sécurité acceptable en phase précoce dans le cancer du sein (Rosen et al. 2020).

Malgré une activité de recherche et développement soutenue concernant la voie NOTCH, notamment en oncologie, les effets indésirables nombreux et le manque d'efficacité n'ont pas permis d'aboutir à des molécules utilisables en pratique à ce jour.

*La traduction des résultats obtenus *in vivo* à des thérapeutiques utilisables chez l'homme ne pourra donc se faire qu'au prix d'une exploration des marqueurs d'activité afin de cibler les patients et ainsi d'améliorer l'efficacité clinique des molécules ciblant la voie NOTCH. Il faudra également développer les recherches sur la posologie et les soins de support qui permettront de limiter la toxicité de ces molécules.*

7. Astrogliose et voie NOTCH

La voie NOTCH, très active au cours du développement dans la mise en place du réseau vasculaire et dans le déterminisme des cellules souches, voit son activité diminuer drastiquement chez l'adulte et est retrouvée, au niveau du SNC, principalement dans le cytoplasme des neurones. Cependant, en condition pathologique, et plus particulièrement dans les maladies neuro-inflammatoires, la voie NOTCH est stimulée de façon anormale et participe aux mécanismes physiopathologiques de la neuro-inflammation notamment dans les astrocytes réactifs, notre focus ici.

7.1. Sclérose latérale amyotrophique

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative touchant les neurones moteurs du cerveau et de la moelle épinière. De nombreuses équipes ont étudié la voie NOTCH dans des modèles animaux expérimentaux de SLA avec des résultats parfois contradictoires.

Dans un modèle murin de SLA, SOD1-G93A (mSOD), Wang *et al.* ont mis en évidence une augmentation de l'activation de la voie NOTCH dans les moelles épinières des souris. Le traitement des souris par le lithium et l'acide valproïque, deux médicaments neuro-protecteurs utilisés de façon synergique chez les patients souffrant de SLA, provoque une inhibition de l'activation de la voie NOTCH. Cependant, dans cette étude, l'activation de la voie NOTCH est mesurée sur moelle totale et n'est pas étudiée dans un type cellulaire particulier. Les analyses *in vitro* ont, quant à elles, été réalisées uniquement sur une lignée cellulaire hybride de motoneurone/médulloblastome (S.-Y. Wang *et al.* 2015).

Deux équipes ont par la suite essayé de cartographier l'expression des ligands et des gènes cibles de la voie NOTCH dans la moelle épinière. Ma *et al.* ont mis en évidence une modification de l'activation de la voie NOTCH chez les souris mSOD après l'apparition de la pathologie. En effet chez ces souris, la maladie se manifeste entre le 90ème et le 120ème jour de vie. Les auteurs ont mis en évidence qu'avant cette période, au jour 60 par exemple, la voie NOTCH est activée dans les motoneurons (co-localisation de NICD et de RNA binding fox-1 homolog 3 (RBF3) également appelé NEUN) à la fois chez les souris mSOD et chez les souris contrôles. Chez des souris mSOD âgées de 117 jours, l'activation de la voie est diminuée dans les motoneurons mais augmentée dans les astrocytes. À l'opposé, chez les souris contrôles, l'activation de la voie NOTCH reste strictement neuronale. Cependant, l'équipe ne retrouve pas d'augmentation de l'expression de JAG1 dans les astrocytes mais seulement dans la microglie, proposant l'hypothèse que JAG1 au niveau de la microglie active la voie NOTCH astrocytaire (X. Ma *et al.* 2017). L'équipe de Liu a confirmé ces résultats sur le même modèle murin et corrélé l'augmentation de l'activation de la voie NOTCH dans les astrocytes à une augmentation de l'expression de DLL4 et de HES1 dans ces mêmes cellules. (C. Liu *et al.* 2020). À l'inverse, dans ce même

modèle de SLA, l'équipe de Nonneman retrouve à la fois une augmentation de NICD et de JAG1 au niveau astrocytaire. L'inhibition génique de JAG1 spécifiquement dans les astrocytes (souris Cx30-CreER JAG1lox/lox) provoque une aggravation de la maladie et une diminution de la viabilité des motoneurons ainsi qu'une augmentation de l'activation de la voie NOTCH astrocytaire suggérant un rôle bénéfique de l'activation de la voie dans la SLA (Nonneman et al. 2018).

Concernant l'humain, Gomez-Pinedo *et al.* ont effectué des immuno-marquages sur des coupes d'hippocampe de patients atteints de SLA. Les auteurs ont observé une augmentation de l'expression de NOTCH1 mais une diminution de la production de NICD associée à une diminution de l'expression des alphas secretases, ADAM10 et ADAM17. Les auteurs proposent que cette diminution de NICD correspond à une diminution de l'activation de la voie NOTCH dans les neurones. Cependant aucune quantification du NICD neuronal et astroglial n'a été effectuée (Gómez-Pinedo et al. 2019).

Tableau 2 Tableau récapitulatif de l'activité de la voie NOTCH *in vivo* dans diverses conditions neuro-inflammatoires

Pathologie	Modèle	Effet sur la voie NOTCH dans le SNC
SLA	SOD1-G93A	NOTCH1, JAG1, HEY1, HES1 et MAML1 sont augmentés dans la moelle épinière
SLA	SOD1-G93A	NICD est augmenté dans les astrocytes
SLA	SOD1-G93A	NICD / JAG1 / DLL4 sont augmentés dans les astrocytes
SLA	SOD1-G93A	NICD est augmenté dans les astrocytes
SLA	Humain : tissu de patient atteints de SLA	NICD est présent dans les astrocytes réactifs
SLA	Humain : tissu de patient atteints de SLA	NICD est diminué dans l'hippocampe
AVC	MCAO	NICD est augmenté dans le cerveau
AVC	MCAO	NICD est augmenté ou diminué dans les astrocytes
Lésion traumatique	Lésion traumatique médullaire	NICD est augmenté dans les astrocytes A1 en bordure de lésion comparativement à des astrocytes dans des lésions non atteintes
SMA	SMNΔ7	NICD est augmenté dans les astrocytes
SEP	EAE	NICD est augmenté dans la moelle épinière

7.2. Accident Vasculaire Cérébral

Le modèle murin de référence pour l'étude des accidents vasculaires cérébraux est l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO). La technique de base consiste à introduire un filament via la carotide et le faire progresser jusqu'à bloquer l'origine de l'artère cérébrale moyenne. En faisant varier la durée de l'occlusion, ce modèle peut donner des ischémies transitoires, des modèles d'ischémie reperfusion, ou des ischémies permanentes.

Dans un modèle d'ischémie reperfusion par MCAO, l'activité de la gamma-secretase dans le cerveau de souris augmente rapidement avant de revenir à la normale. Suivant une ischémie d'une heure, l'activité est significativement plus élevée après 2 heures de reperfusion et son niveau revient à la normale après 6 heures de reperfusion. Le niveau de NICD est élevé dès 1 heure d'ischémie et reste stable après 2 et 6 heures de reperfusion. Les auteurs ont utilisé deux techniques pour inhiber l'activation de la voie NOTCH : des souris transgénique NOTCH antisens (NAS) et des inhibiteurs de gamma-secretase. Les souris transgéniques NAS sont générées en faisant exprimer un oligonucléotide antisens NOTCH1 sous le contrôle du promoteur de mammary tumor virus long terminal repeat. Les deux inhibiteurs de gamma-secretase utilisés sont : DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-butyl ester) et DBZ ((S,S)-2-[2-(3,5-difluorophenyl)acetylamino]-N-(5-methyl-6-oxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[b,d]azepin-7yl)propionamide). De façon intéressante, les déficits neurologiques et les lésions cérébrales observés sont moins graves chez les souris transgéniques ou traitées par GSI que leurs contrôles. Cette meilleure récupération de la perfusion est corrélée à une moindre activation de la microglie et à une diminution de l'infiltration lymphocytaire (Arumugam et al. 2006). Dans cette étude, l'utilisation de souris transgéniques NAS et de GSI, ne permet pas de cibler un type cellulaire particulier. Si l'inhibition systémique de la voie NOTCH dans plusieurs types cellulaires paraît synergique sur les performances des souris après ischémie, elle ne permet pas une compréhension fine des mécanismes modulés dans ces différents types cellulaires. La même équipe a par la suite mis en évidence, *in vitro* et *in vivo*, que l'expression neuronale de NOTCH1 est responsable d'une activation de la cascade apoptotique dans un modèle d'ischémie cérébrale (Cheng et al. 2014).

Une autre équipe s'est intéressée aux produits de clivage de la gamma-secretase dans une sous-population d'astrocytes réactifs RC2+. Après ischémie cérébrale, une sous-population d'astrocytes péri-lésionnels prolifératifs (KI67+) se met à exprimer RC2. On retrouve dans ces astrocytes une augmentation de NICD et du domaine intracellulaire Amyloid Beta Precursor Protein (APP) appelé AICD, APP Intracellular Domain. Le traitement par GSI après ischémie cérébrale ne modifie pas le nombre total d'astrocytes réactifs (GFAP+) mais permet une diminution du nombre d'astrocytes RC2+ et du nombre d'astrocytes réactifs prolifératifs (GFAP+ KI67+). Dans un modèle de délétion

conditionnelle astrocytaire pour NOTCH1, les auteurs ont confirmé en grande partie les résultats obtenus avec les GSI : diminution du nombre d'astrocytes réactifs RC2+ et augmentation de l'infiltration parenchymale de cellules CD45+ (par contre, dans ce modèle, le nombre total d'astrocytes réactifs GFAP+ est diminué) (Shimada et al. 2011).

A l'inverse Magnusson *et al.* ont trouvé une diminution de l'activation de la voie NOTCH dans les astrocytes après ischémie cérébrale. Dans leur modèle d'ischémie induite par MCAO, l'occlusion est maintenue pendant 35 minutes chez les souris. Les auteurs ont utilisé une lignée de souris avec un système rapporteur pour les cellules recevant un signal de la voie NOTCH. Ce système se base sur la génération d'un récepteur chimérique de NOTCH1 dans lequel la partie intracellulaire est remplacée par GAL4-VP16 (N1-Gal4VP16) chez des souris qui sont croisées avec des souris transgéniques rapportrices UAS-lacZ (E. Smith et al. 2012). Deux semaines après l'induction de l'ischémie chez ces souris, NICD et l'ARN messager (ARNm) de la beta galactosidase deviennent indétectables dans le striatum des souris malades mais restent fortement exprimés dans le cerveau des souris indemnes. Également, les auteurs ont mis en évidence que dès le 2^{ème} jour post ischémie, les astrocytes du striatum expriment *Ascl1*, un facteur de transcription pro-neural et que deux semaines après l'ischémie, des clusters de neuroblastes positifs pour la doublecortin (DCX), un marqueur de neurogénèse, apparaissent. Afin d'identifier spécifiquement les astrocytes du striatum, les auteurs ont ensuite injecté un adénovirus exprimant la Cre sous la dépendance du promoteur GFAP à des souris R26R-YFP. Sept semaines après avoir induit une ischémie à ces souris, les cellules *Ascl1* + et DCX+ expriment également YFP démontrant que les astrocytes du striatum génèrent des neuroblastes. Enfin, la délétion de RBPJ dans les astrocytes du striatum de souris saines provoque un phénotype semblable à un phénotype post-ischémie à savoir une augmentation d'*Ascl1* et la génèse de neuroblastes. Ainsi, en post-ischémie, la réduction de l'activation de la voie NOTCH dans les astrocytes provoquerait un programme neurogénique (Magnusson et al. 2014).

7.3. Lésion traumatique

7.3.1. Moelle épinière

Après une lésion traumatique de la moelle épinière, une population d'astrocytes réactifs avec un phénotype toxique de type A1, exprimant le facteur du complément C3, est retrouvée au voisinage de la lésion. En effet, Qian *et al.* ont mis en évidence *in vitro* que le traitement d'astrocytes primaires humains par du milieu conditionné de cellules microgliales traitées au LPS, induit un phénotype A1 et provoque une augmentation de l'activation de la voie NOTCH. Le traitement par DAPT permet d'annuler le phénotype A1 des astrocytes et leur sécrétion de cytokines inflammatoires : TNF, IL1B et

IL6. En incubant des neurones avec le milieu conditionné d'astrocytes A1, les auteurs ont mis en évidence l'effet neurotoxique de ces astrocytes qui se caractérise par une augmentation de l'apoptose neuronale. L'apoptose des neurones, incubés avec le milieu conditionné d'astrocytes traités par DAPT, est diminuée de manière significative soulignant le caractère délétère pour les neurones de l'activation de la voie NOTCH dans les astrocytes. De manière intéressante, les auteurs ont ensuite mis en évidence une interaction entre la voie NOTCH et la voie STAT3 dans les astrocytes A1 : en effet, la phosphorylation de STAT3 est augmentée, en adéquation avec ce qui est retrouvé dans la littérature. Cependant, les auteurs ont également mis en évidence qu'en inhibant la voie NOTCH via DAPT, on diminue la phosphorylation de STAT3, et qu'il existe une interaction directe entre la voie NOTCH et la voie STAT3, démontrée par immuno-précipitation de STAT3 par NICD. Les auteurs suggèrent alors que NICD se lierait à STAT3 et faciliterait sa phosphorylation. Le complexe NICD/phospho-STAT3 serait alors transloqué au noyau et agirait comme facteur de transcription. Cette hypothèse reste cependant à démontrer (Qian et al. 2019).

7.3.2. Cerveau

Afin de mimer les effets d'une lésion traumatique cérébrale *in vitro* sur les astrocytes, Ribeiro *et al.* ont utilisé un modèle *in vitro* de scratch test sur des astrocytes primaires de souris en culture. Dans ce modèle, les auteurs observent une augmentation de la production de NICD dans les astrocytes activés suite au scratch test, *i.e.* en bordure de lésion (Ribeiro, Delgado-García, et Porcionatto 2021).

7.4. Amyotrophie spinale

L'amyotrophie spinale (SMA) est une maladie héréditaire orpheline caractérisée par une faiblesse des muscles squelettiques et une atrophie due à une diminution des niveaux transcriptionnels de la protéine survival motor neuron (SMN) causée par une mutation ou une délétion du gène survival motor neurone 1 (SMN1). SMN est encodée par 2 gènes qui diffèrent principalement par un nucléotide situé dans l'exon 7. La majorité des transcrits de SMN2 donne ainsi une protéine SMN tronquée au niveau de l'exon 7 (SMN Δ 7). Un modèle murin d'amyotrophie spinale couramment utilisé est le modèle SMN Δ 7 dans lequel le gène murin endogène *Smn1* est supprimé et remplacé par deux gènes humains, *SMN2* et *SMN2 Δ 7* (*mSmn*-/-; *SMN2*+/, *SMN2 Δ 7*+/).

Ohuchi *et al.* ont montré une augmentation du niveau de NICD et de P-STAT3 dans la moelle épinière des souris SMN Δ 7 à P5, dans les astrocytes GFAP+ (Ohuchi et al. 2019). Précédemment, en utilisant des fibroblastes issus de la peau d'un patient atteint de SMA, les auteurs ont généré des iPSCs (SMA-iPSC) et montré que la différenciation en motoneurons (SMA-iPSC-MN) aboutit également à la production d'une population d'astrocytes GFAP+ (Ohuchi et al. 2016). L'utilisation de LY-411575, un

inhibiteur de gamma-secretase, permet une réduction de la différenciation en astrocytes GFAP+ dans le modèle SMA-iPSC-MN, soulignant l'importance de la voie NOTCH dans la différenciation des iPSC en astrocytes versus neurones. *In vivo*, l'injection intra-ventriculaire à P2 et P5 de ce même inhibiteur à des souris SMNΔ7 permet une amélioration du déficit moteur. D'un point de vue anatomopathologique, les souris traitées par GSI présentent moins d'astrocytes GFAP+ au niveau médullaire que les contrôles (Ohuchi et al. 2019).

7.5. Hypoxie

In vitro, en utilisant des astrocytes primaires de rat en culture sous un mélange gazeux de 3% d'oxygène (O₂), 5% de dioxyde de carbone (CO₂) et 92% d'azote (N₂), Zhang *et al.* ont montré que l'hypoxie provoque une activation de la voie NOTCH dans les astrocytes après 12 heures d'incubation corrélée à une augmentation de la prolifération et de la production de cytokines pro-inflammatoires, TNF et IL1B. *In vivo*, les auteurs ont montré que le traitement par DAPT de rats hypoxiques permet de diminuer la réactivité astrocytaire et la production de VEGFA induite par l'hypoxie (Y. Zhang et al. 2015).

7.6. Stress oxydant

Le stress oxydant provoque l'oxydation des protéines et est impliqué dans de nombreuses pathologies neurologiques inflammatoires et dégénératives. La sulfiredoxin 1 (SRXN1) est une protéine antioxydante endogène qui a des effets neuroprotecteurs (Qiong Li et al. 2013).

Afin d'étudier l'effet du stress oxydant, Li *et al.* ont ajouté du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ à 100 μmol.L⁻¹) au milieu de culture d'astrocytes primaires de rat puis ont incubé les cellules pendant 6 heures. En situation de stress oxydant, l'expression astrocytaire de SRXN1 et le nombre d'astrocytes apoptotiques sont augmentés. D'autre part, l'ajout d'un siRNA dirigé contre *SRXN1* potentialise l'apoptose des astrocytes confirmant le rôle antioxydant protecteur de SRXN1. De façon intéressante, la voie NOTCH est activée dans les astrocytes après incubation avec H₂O₂ et le traitement par DAPT provoque une augmentation de l'apoptose des astrocytes induite par H₂O₂. Ensemble ces résultats suggèrent un rôle protecteur de la voie NOTCH dans les astrocytes suite à un stress oxydant (Lan Li et al. 2019).

Tableau 3 Effet de condition de culture pathologique sur l'activation de la voie NOTCH dans des astrocytes primaires

Espèce	Condition de culture	Traitement	Effet sur la voie NOTCH
--------	----------------------	------------	-------------------------

Astrocytes primaires de rat	Hypoxie	Mélange gazeux de 3% oxygène, 5% dioxyde de carbone et 92% d'azote	Augmentation de la production de NICD
Astrocytes primaires de rat	Stress oxydatif	Peroxyde d'hydrogène 100 µmol.L ⁻¹ pendant 6 heures	Augmentation de la production de NICD
Astrocytes primaires de souris	Inflammation	LPS 500 ng.mL ⁻¹ pendant 24 heures	Diminution de la production de NICD

7.7. Encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE)

Liu *et al.* se sont intéressés au rôle d'IL9, produit par les lymphocytes T auxiliaire 9 (TH9), sur l'astroglie. Le traitement d'astrocyte primaire murin par IL9 provoque une augmentation de l'activation de la voie NOTCH et de la phosphorylation de STAT3 ainsi qu'une augmentation des niveaux transcriptionnels de cytokines pro-inflammatoires, IL6, TNF, CXCL10 et CCL2. Les auteurs ont également mis en évidence la transcription d'un ARN long non codant (lncRNA) de 446 paires de base identique à une séquence antisens du gène *NOTCH* (lncRNA Gm13568) après stimulation par IL9. *In vitro*, Le traitement par un lentivirus inhibant Gm13568 ou par un petit ARN en épingle à cheveux (shRNA) dirigé contre NOTCH1 donne des résultats identiques à savoir une inhibition de la voie NOTCH dans les astrocytes aboutissant à une réduction de l'activation de la voie STAT3 ainsi qu'une inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires IL6, TNF et CXCL10. *In vivo*, dans un modèle murin d'EAE induite par le MOG, les auteurs ont montré que l'injection de lentivirus inhibant NOTCH1 ou inhibant Gm13568, permet un délai d'apparition de la maladie et une réduction des signes cliniques chez les souris, corrélé à une préservation de la myéline ainsi qu'à une réduction de l'infiltrat de cellules immunitaires dans le parenchyme médullaire (X. Liu et al. 2021).

La très grande majorité des publications s'accorde sur une activation de la voie NOTCH dans les modèles de neuroinflammation et son implication importante dans la physiopathologie des maladies inflammatoires.

Cependant, Acaz-Fonseca et al., ont publié en 2019 une étude allant à l'encontre des études citées ci-dessus qui décrivent les effets délétères de l'activation de la voie NOTCH dans les pathologies neuro-inflammatoires. En effet, les auteurs retrouvent, après traitement d'astrocytes primaires murins par LPS, une augmentation des niveaux transcriptionnels de JAG1 mais une diminution de l'activation de la voie NOTCH (diminution des niveaux transcriptionnels de l'effecteur HES-5 et diminution de NICD). Selon les auteurs, la diminution de l'activation de la voie NOTCH a un effet sur la morphologie des astrocytes mais pas sur l'augmentation de la production de facteurs pro-inflammatoires.

Plusieurs choses peuvent expliquer la diversité des effets de l'inactivation de cette voie : premièrement le type de pathologie étudié et le moment de l'induction du KO et de l'observation des signes cliniques et deuxièmement la méthode utilisée pour le KO, génique ou pharmacologique, et la cible, spécifique, i.e. ligand ou récepteur, ou non spécifique, par exemple le GSI.

Tout ceci soulève l'importance de l'étude de cette voie dans la physiopathologie de la SEP afin d'étudier la possibilité de la cibler en thérapeutique.

Objectifs

En condition inflammatoire, les astrocytes réactifs interagissent, selon un réseau de signalisations complexes, avec l'ensemble des cellules de l'UNV ainsi qu'avec les cellules immunitaires infiltrées dans le SNC, provoquant une modulation des fonctions de la BHE, de la neurogénèse et de la synaptogénèse. La compréhension des voies contrôlant l'astroglie et ses effets offre donc des perspectives thérapeutiques intéressantes dans le domaine de la neuro-immunologie.

Afin de mieux caractériser la signature astrocytaire pendant la neuro-inflammation, nous avons récemment effectué un séquençage de l'ARN sur des astrocytes humains non activés versus réactifs et identifié delta-like 4 (DLL4) comme étant fortement exprimé par les astrocytes réactifs.

Si le rôle du récepteur NOTCH1 dans les astrocytes réactifs est bien documenté, celui de ses ligands, l'est beaucoup moins. Le rôle important de la signalisation DLL4-NOTCH1 dans le système cardiovasculaire est déjà largement apprécié, alors que l'on ne connaît que peu de choses sur le rôle de cette voie spécifiquement dans l'astroglie réactive au cours de la neuro-inflammation.

L'objectif de notre projet est donc d'élucider la contribution de la signalisation DLL4-NOTCH1, au niveau de la glia limitans, sur la progression des maladies neuro-inflammatoires et plus particulièrement en contexte de SEP.

Notre hypothèse repose sur le postulat que les astrocytes communiquent avec les cellules voisines de l'UNV au cours de la neuropathologie pour réguler les fonctions et l'intégrité de la BHE.

Nos objectifs sont :

(A) Identifier l'effet de DLL4 au niveau astrocytaire sur l'homéostasie de la BHE et l'infiltration dans le parenchyme des cellules immunitaires en contexte de SEP

(B) Identifier les cellules répondant au signal DLL4 astrocytaire en condition neuro-inflammatoire et étudier la signalisation en amont et en aval de l'axe DLL4-NOTCH1 dans ces cellules

(C) Explorer le blocage de la signalisation DLL4-NOTCH1 comme cible thérapeutique potentielle dans la prise en charge des patients atteints de SEP

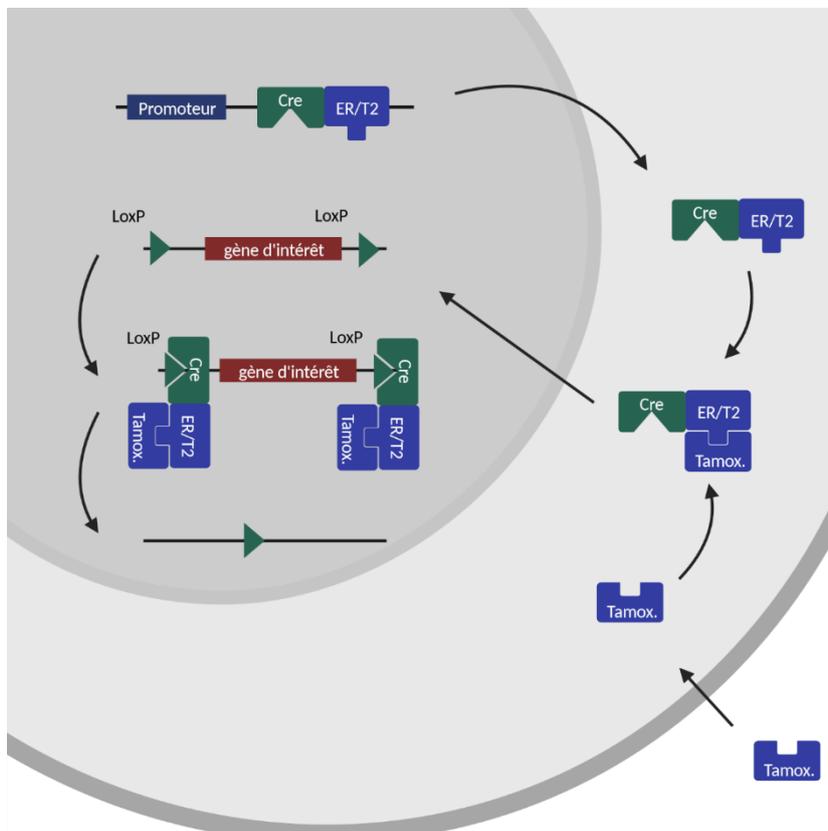
Matériel et méthodes

1. Souris

Les expérimentations animales ont été réalisées conformément à la directive 2010/63/EU du Parlement européen relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, et approuvées par le Comité local de protection et d'utilisation des animaux de l'Université de Bordeaux CEEA50 (protocole IACUC #16901).

1.1. Souris transgéniques

Les souris DLL4 flox/flox ont été croisées avec des souris ALDH1L1-Cre ERT2, GLAST-Cre ERT2 et CDH5-Cre ERT2. La Cre recombinase, exprimée sous la dépendance du promoteur d'ALDH1L1, de GLAST ou



de CDH5 respectivement, est transloquée au noyau suite à l'administration de 1 mg de tamoxifène 2 fois par jour pendant 5 jours pour les souris ALDH1L1-Cre ERT2 et GLAST-Cre ERT2, et 1 mg de tamoxifène 1 fois par jour pendant 5 jours pour les souris CDH5-Cre ERT2. Cela permet la délétion de Dll4 au niveau astrocytaire ou endothélial selon le promoteur utilisé. Une latence de 2 semaines est ensuite respectée avant d'initier la suite des expériences pour permettre

Figure 26 Fonctionnement du système de recombinaison Cre loxP inducible par le tamoxifène

l'élimination totale du tamoxifène du SNC.

1.2. Hébergement

Les souris sont hébergées en animalerie conventionnelle avec une photopériode de 12 h, en cages communes sur portoirs ventilés, ont accès à de l'enrichissement dans chaque cage, et à l'eau et à la nourriture *ad libitum*, en accord avec les protocoles internationaux d'hébergement des animaux de laboratoire. Les souris ont été traitées conformément aux directives 2010/63/EU du Parlement européen sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et approuvées par le Comité d'éthique en expérimentation animale local.

1.3. Induction de l'EAE

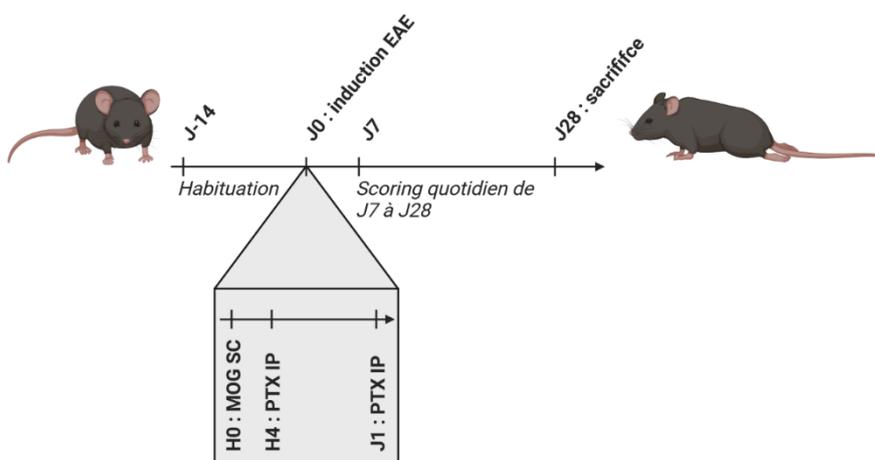


Figure 27 Protocole d'induction de l'EAE avec le MOG

afin de réduire au maximum le stress de l'animal (le stress ressenti par l'animal avant développement de la maladie réduit la sévérité de l'EAE), les souris sont habituées à être manipulées pendant au moins une semaine avant l'immunisation. A J0, les souris sont anesthésiées sous un mélange air-isoflurane (3% induction et 1,5% maintien) et injectées en sous cutané avec 0,2mL d'émulsion (0,1mL cou et 0,1 mL dos) MOG₃₅₋₅₅ (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) (Hooke Laboratories). Après deux heures, les souris sont injectées en intra péritonéal avec 80ng de toxine pertussique (0,1 mL). A J1, les souris reçoivent la seconde injection de 80ng (0,1 mL) de toxine pertussique en intra péritonéal. L'immunisation étant extrêmement sensible aux agents extérieurs et non douloureuse, les animaux ne reçoivent pas d'analgésique au cours de cette procédure. Score: les souris ayant subi l'immunisation sont observées quotidiennement par l'animalier entre J1 et J7 post induction. A partir de J7 jusqu'à J28 post induction, les souris sont pesées et scorées quotidiennement par l'expérimentateur en suivant le guide fourni par Hooke Laboratories (score de 0 à 4,5 qui mesure les symptômes de paralysie ascendante chez les animaux). Les animaux sont immédiatement euthanasiés lorsque le score atteint une valeur de 4,5 pendant deux jours consécutifs ou lorsque l'animal a perdu 20% de sa masse corporelle. Dès que les animaux montrent les premiers signes de paralysie (score 0,5-1), l'expérimentateur met à leur disposition des croquettes mouillées sur le sol de la cage ainsi qu'une

Afin de réduire au maximum le stress de l'animal (le stress ressenti par l'animal avant développement de la maladie réduit la sévérité de l'EAE), les souris sont habituées à être manipulées pendant

source facilement accessible d'eau. De l'hydrogel sera ensuite utilisé comme source d'eau pendant la phase de paralysie sévère (score 3-4,5).

1.4. Injection stéréotaxique

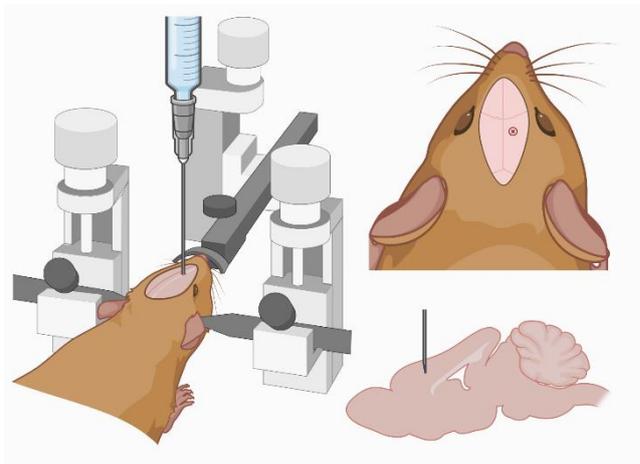


Figure 28 Schéma de l'installation de l'animal dans le cadre stéréotaxique et endroit de l'injection

Afin de minimiser les infections, les instruments sont stérilisés avant chaque stéréotaxie. Entre chaque animal, les outils sont rincés à l'alcool à 70%. La peau de l'animal est désinfectée avec de la Bétadine dermique 10% avant incision. Pour faciliter la récupération et lutter contre l'hypothermie, l'animal est placé sur une plaque chauffante pour maintenir sa température corporelle à 37°C. Pour minimiser le dessèchement oculaire, une crème ophtalmique est

appliquée pendant l'intervention. La souris est anesthésiée par un mélange d'air et d'isoflurane (3% induction et 1,5% maintien), le crâne est rasé puis l'animal placé sur un cadre de stéréotaxie (Stoelting) et la peau incisée sur 1cm. Une première injection de Buprénorphine (0,03 mg/kg) par voie sous cutanée est réalisée 30 min avant la chirurgie puis une deuxième 12 heures après la première. La chirurgie stéréotaxique consiste en la réalisation d'un orifice dans le crâne au niveau du cortex pré frontal médian avec une perceuse adaptée. L'injecteur est composé d'une seringue Hamilton descendue dans l'orifice. Une solution contenant l'adénovirus exprimant IL1B (3µL) est infusée, pendant 3 min puis l'injecteur est remonté et la peau du crâne suturée. L'opération prend 30 à 40 min et la récupération post-opératoire environ une heure. Le repos post-opératoire est de deux semaines pour les lentivirus afin d'assurer une expression virale optimale. Les animaux ayant subi la chirurgie stéréotaxique sont surveillés quotidiennement par l'expérimentateur ou l'animalier en charge de l'hébergement. En cas de problème de santé des animaux, l'expérimentateur est immédiatement alerté et prendra la décision de la mise à mort.

2. Immunoprécipitation de la chromatine

L'immuno-précipitation de la chromatine (ChIP) est réalisée avec des astrocytes primaires humains traités avec IL1B pendant 12h. Les protéines sont réticulées à l'ADN en ajoutant du formaldéhyde au milieu de culture à une concentration finale de 1% et en incubant pendant 10 minutes à 37°C.

Les cellules fixées sont rincées deux fois avec du phosphate-buffered saline (PBS) froid contenant du fluorure de 4-(2-aminoéthyl)benzènesulfonyl (AEBSF) 1/1000 v/v, de la leupeptine 1/1000 v/v et de l'aprotinine 1/1000 v/v. Les cellules (1 million) sont ensuite lysées dans 1000µL de tampon dodium dodecyl sulfate (SDS) (SDS 1% v/v, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 10mM, 2-Amino-2-

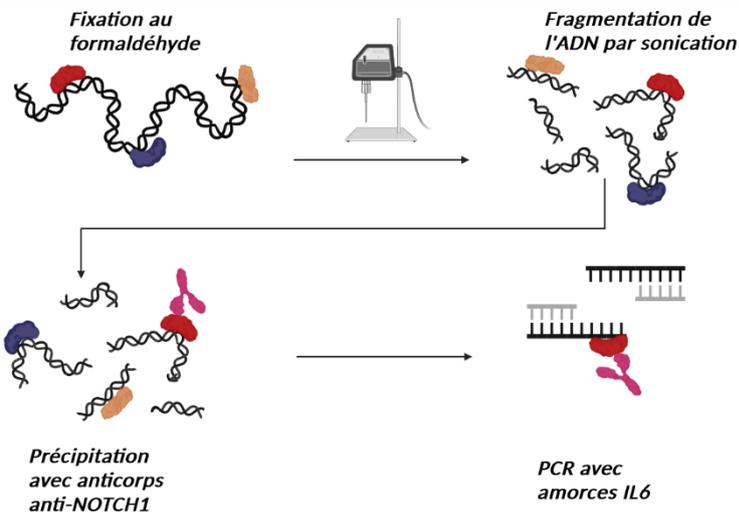


Figure 29 Protocole d'immunoprécipitation de la chromatine

(hydroxyméthyl)propane-1,3-diol (Tris) 50mM pH8, AEBSF 1/1000 v/v, leupeptine 1/1000 v/v, aprotinine 1/1000 v/v). Le lysat est soniqué sur glace 20 fois pendant 10 secondes pour obtenir des fragments d'ADN d'une taille moyenne de 500 pb. Puis la solution de chromatine est diluée dans un tampon de dilution (SDS 0,01%, 2-[4-(2,4,4-triméthylpentan-2-yl)phénoxy]éthanol (Triton X-100) 1,1%, EDTA1,2mM, Tris 16,7mM pH8, chlorure de sodium (NaCl) 167mM, phenylméthylsulfonyl fluorure (PMSF) 1mM, leupeptine1µg/mL, aprotinine 1µg/mL) jusqu'à un volume final de 2mL et incubée 30 minutes à +4 °C avec 30µg de sepharose de protéine G et 5µg d'ADN de sperme de saumon. Après centrifugation, le surnageant est incubé pendant une nuit à +4°C avec 10µl d'anticorps anti-NICD humain (#4147, Cell Signaling Technology, Inc.) ou d'IgG non spécifiques (I5006, Sigma-Aldrich).

Après avoir été lavées deux fois dans du PBS, 30µg de billes de protéine G sont bloquées avec 5µg d'ADN de sperme de saumon ajoutés à chaque échantillon et incubées pendant une heure à +4°C. Les échantillons immunoprécipités sont centrifugés et lavés une fois dans un tampon de lavage à faible teneur en sel, une fois dans un tampon de lavage à haute teneur en sel et une fois dans un tampon de lavage LiCl. Les échantillons sont ensuite lavés deux fois dans du Tris-EDTA. L'élution de la chromatine immunoprécipitée est réalisée en ajoutant 250µL de tampon d'élution et l'incubation est réalisée à température ambiante pendant 15 minutes, et répétée une fois. Pour inverser la réticulation de l'ADN, l'éluat est incubé pendant 4 heures à 65°C après avoir ajouté 20µL de NaCl 5M. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 1 heure à 65°C avec 2µL de protéinase K, 10µL d'EDTA 0,5M et 20µL de tampon TRIS EDTA 1M pH 6.5 pour l'élimination des protéines. L'ADN est ensuite purifié par extraction phénol/chloroforme.

Résultats

Le manuscrit présenté ci-dessous est la première version soumise au journal. L'article est en cours de révision au moment de la soutenance de la thèse.

Title

Juxtacrine DLL4-NOTCH1 signaling between astrocytes drives neuroinflammation via the IL-6-STAT3 axis

Astrocytic DLL4 pathway, a new actor of neuroinflammation

Authors

Pierre Mora,¹ Margaux Laisné,¹ Célia Bourguignon,¹ Paul Rouault,¹ Alain-Pierre Gadeau,¹ Marie-Ange Renault,¹ Sam Horng,² Thierry Couffignal,¹ Candice Chapouly^{1*}

Affiliations

¹Univ. Bordeaux, INSERM, Biology of Cardiovascular Diseases, U1034, Pessac, France.

²Department of Neurology and Neuroscience, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York City, New York, USA.

(*) candice.chapouly@inserm.fr

Abstract

Under neuroinflammatory conditions, astrocytes acquire a reactive phenotype named astrogliosis that drives acute inflammatory injury as well as chronic neurodegeneration. We hypothesized that astrocytic DLL4 interacts with its receptor NOTCH1 on neighboring astrocytes to regulate astrogliosis via downstream juxtacrine signaling pathways. We first demonstrated that astrocytic DLL4 is upregulated during neuroinflammation, both in mice and humans, driving astrogliosis and subsequent blood brain barrier permeability and inflammatory infiltration in two models of CNS inflammatory disease. We then showed that the DLL4-mediated NOTCH1 signaling in astrocytes directly drives IL-6 levels, induces STAT3 phosphorylation promoting upregulation of astrocyte reactivity markers, pro-permeability

factor secretion and consequent blood brain barrier destabilization. Finally, we revealed that blocking DLL4 with antibodies improves experimental autoimmune encephalomyelitis symptoms in mice, identifying a potential novel therapeutic strategy for CNS autoimmune demyelinating disease. In conclusion, this study demonstrates that DLL4-NOTCH1 signaling is not only a key pathway in vascular development and angiogenesis, but also in the control of astroglialosis during neuroinflammation.

Teaser

The astrocytic DLL4-NOTCH1 signaling drives astroglialosis and subsequent blood brain barrier permeability during neuroinflammation.

MAIN TEXT

Introduction

Proper function of the healthy central nervous system (CNS) requires the selective regulation of soluble factors and immune cells through the blood–brain barrier (1). Blood brain barrier structure and integrity involves a complex network of crosstalk among various components of the neurovascular unit, including vascular endothelial cells, pericytes, microglia and the astrocyte endfeet (Glia limitans) (2).

Substantial intercellular communication occurs between endothelial cells and the astrocyte endfeet of the blood brain barrier (1, 3). We recently identified a capacity for bidirectional signaling between endothelial cells and astrocytes in the neurovascular unit (4). How these signals contribute to cerebrovascular impairment, blood brain barrier dysfunction and neuroinflammation remains unclear and carries translational implications for autoimmune demyelinating diseases, stroke and other CNS inflammatory conditions.

Under neuroinflammatory conditions, astrocytes acquire a reactive phenotype, defined by morphological and molecular changes that drive acute inflammatory injury as well as chronic neurodegeneration. This “reactive astrogliosis” occurs in a context-specific manner with specific pathways and phenotypes recruited in response to the type, severity and timing of CNS injury. Furthermore, simultaneous induction of both pathogenic and protective pathways may be induced. For instance, during infections (HIV, Herpes virus), and in Alzheimer’s disease, multiple sclerosis and Parkinson’s disease, reactive astrocytes produce both pro-inflammatory factors such as endothelin1, glutamate, interleukin1 β , Tumor Necrosis Factor and nitrite oxide and neuroprotective factors such as nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors (5). We previously identified that reactive astrocytes induce blood brain barrier opening in inflammatory conditions via production of VEGFA and TYMP (6) which downregulate the endothelial tight junction proteins that protect the blood brain barrier in the healthy brain (7).

NOTCH1 receptor is a central effector of astrogliosis in a wide range of neuropathological contexts. After intra-cerebral hemorrhage (8), in stroke (9) and in several neuroinflammatory conditions such as amyotrophic lateral sclerosis (10), multiple sclerosis and experimental

auto-immune encephalomyelitis (EAE) (11, 12), NOTCH1 signal transduction is activated in reactive astrocyte populations.

Notch signaling, which is highly conserved in vertebrates, is stimulated by the interaction of Notch receptor with its ligands, Delta and Jagged, trans-membrane proteins with large extracellular domains. Ligand binding promotes two proteolytic cleavages in the Notch receptor: the first catalysed by ADAM-family metalloproteases and the second mediated by γ -secretase (13–15). The second cleavage releases the Notch intracellular domain (NICD), which translocates to the nucleus and cooperates with the DNA-binding protein CSL (named after CBF1, Su(H) and LAG-1) to promote transcription. The precise numbers of NOTCH receptors differ between species (16): in vertebrates, 4 different NOTCH receptors have been identified and in the neurovascular unit, NOTCH1 is expressed by astrocytes and endothelial cells, NOTCH4 by endothelial cells (17–19) and NOTCH3 by mural cells, or pericytes (20, 21).

Interestingly, activation of the NOTCH1-STAT3 axis in EAE has been shown to control the production of inflammatory cytokines by reactive astrocytes via the long non-coding RNA Gm13568, which has also been implicated in MS pathogenesis. Moreover, the NOTCH1-STAT3 pathway has similarly been identified as an effector of inflammation-induced differentiation of neurotoxic A1 astrocytes in a model of spinal cord injury and glial scar formation (22, 23).

As opposed to the abundant literature on the role of NOTCH1 receptor, DLL4 ligand expression has only been reported once, anecdotally, in reactive astrocytes, following brain injury (24). The important role of DLL4-NOTCH1 signaling in the cardiovascular system is already widely appreciated, but little is known about this specific pathway in reactive astrogliosis during neuroinflammation.

We hypothesized that astrocytic DLL4 may interact with the receptor NOTCH1 on neighboring astrocytes to regulate astrogliosis and neuroinflammation via downstream juxtacrine signaling pathways.

We first tested the role of astrocytic DLL4 on neurovascular unit homeostasis under neuroinflammatory conditions. We then probed for downstream effectors of the DLL4-NOTCH1 axis and targeted these for therapy in two models of CNS inflammatory disease. Here, we demonstrate that astrocytic DLL4 is upregulated during neuroinflammation, both in mice

and humans, driving astrogliosis and subsequent blood brain barrier permeability and inflammatory soluble factor and immune cell infiltration. We then show that the DLL4-mediated NOTCH1 signaling in astrocytes directly drives IL-6 levels, induces STAT3 phosphorylation promoting upregulation of astrocyte reactivity markers, pro-permeability factor secretion and consequent blood brain barrier destabilization. Finally, we reveal that blocking DLL4 with antibodies improves EAE symptoms in mice, identifying a potential novel therapeutic strategy for CNS autoimmune demyelinating disease.

In sum, we report here for the first time that the DLL4-NOTCH1 axis acts as a key driver of astrogliosis during neuroinflammation via upregulation of the IL-6-STAT3-TYMP/VEGFA signaling pathway, leading to disruption of the neurovascular unit, increased immune infiltration into the CNS parenchyma and worsened neuropathology. More generally, this study demonstrates that DLL4-NOTCH1 signaling is not only a key pathway in vascular development and angiogenesis, but also in the control of astrocytic reactivity during neuroinflammation.

Results

DLL4 is expressed by CNS astrocytes and up-regulated during chronic neuroinflammation.

First, we showed that *DLL4* is strongly up-regulated in reactive astrocytes under inflammatory conditions *in vitro* using CNS normal human astrocytes (NA) from ScienCell treated with IL-1 β (interleukin-1 β), a central pro-inflammatory cytokine driving multiple sclerosis pathophysiology (Figure 1, A, C-D) and *in vivo* (Figure 1, E), in the neurovascular unit, using experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a pre-clinical model of multiple sclerosis using MOG₃₅₋₅₅ to induce chronic neuroinflammation in *C57BL/6* mice. For this experiment, isolated spinal cord micro-vessels underwent a digestion step followed by a CD45⁺ T cell depletion step to eliminate inflammatory cell infiltrates induced by EAE. *DLL4* upregulation in human reactive astrocytes *in vitro* is associated with upregulation of the astrogliosis marker *TYMP1* (thymidine phosphorylase) (Figure 1, B). *Dll4* upregulation in the neurovascular unit is associated with upregulation of Notch signaling activation markers *Hey1* (hairly/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1) and *Jag1* (jagged 1) (Figure 1, F-G). We then confirmed that *DLL4* is up-regulated in reactive astrocytes *in vivo*, on spinal cord sections from EAE induced *C57BL/6* adult mice (Figure 1, H) and on cortical active lesions from multiple sclerosis patients (Figure 1, I).

Inactivation of astrocyte *Dll4* reduces disability in a model of multiple sclerosis during the onset and plateau of the disease.

To test the role of astrocyte *DLL4* in neuroinflammation, we conditionally disrupted *Dll4* expression in astrocytes using 2 different promoters (the *Glast-Cre^{ERT2}* promoter and the *Aldh1L1-Cre^{ERT2}* promoter) and examined the consequences on EAE pathology. Experimental mice consisted of *Glast-Cre^{ERT2}, Dll4^{Flox/Flox}* mice or *Aldh1L1-Cre^{ERT2}, Dll4^{Flox/Flox}* mice with corresponding littermate controls (*Dll4^{Flox/Flox}*). We first verified the efficiency of both knockouts, 4 months after inducing knockdown by intra-peritoneal injection of tamoxifen. The *Glast-Cre^{ERT2}* promoter induced a moderate recombination (30-50%) whereas the *Aldh1L1-Cre^{ERT2}* promoter induced a full recombination (90-100%) in both spinal cord and cortical astrocytes (Fig. S1, A-H). The difference in recombination efficiency enabled us to test the

effects of partial versus complete astrocyte *Dll4* knockdown in the disease course and spinal cord pathology of experimental multiple sclerosis (EAE).

In the rest of the manuscript, *Glast-Cre^{ERT2}, Dll4^{Flox/Flox}* mice will be named *Dll4^{ACKOP}* (for partial recombination) and *Aldh1L1-Cre^{ERT2}, Dll4^{Flox/Flox}* mice will be named *Dll4^{ACKOC}* (for complete recombination) to make reading easier.

We confirmed the absence of DLL4 astrocyte expression in non-reactive astrocytes in *Dll4^{ACKOC}* mice versus *control* littermates (Fig. S1, I) and highlighted astrocyte specific DLL4 down-regulation in EAE induced *Dll4^{ACKOC}* mice versus *control* littermates (Fig. S1, J) and in *Dll4^{ACKOP}* mice versus *control* littermates injected in the cortex with AdIL-1 β (Fig. S1, K), another mouse model of astrogliosis and CNS autoinflammation.

In the *Dll4^{ACKOP}* mouse model, *control* mice demonstrated neurologic deficits from day 11, which increased in severity until day 21, when the clinical score stabilized at a mean of 3.0, representing hind limb paralysis. In contrast, the clinical course in *Dll4^{ACKOP}* mice was much milder: disease reached a plateau at day 27 at a mean of 2.5, indicating hind limb weakness and unsteady gait, a milder phenotype (Figure 2, A). The EAE peak score (Figure 2, B) was no different between the groups but average score during the time of disability (Figure 2, C) was decreased in *Dll4^{ACKOP}* mice.

In the *Dll4^{ACKOC}* mouse model, *control* mice exhibited neurologic deficits from day 12, which increased in severity until day 20, when clinical score stabilized at a mean of 2.8, representing hind limb paralysis. In contrast, the onset of clinical signs in *Dll4^{ACKOC}* mice was first seen four days later, and the clinical course was very mild. Indeed, in *Dll4^{ACKOC}* mice, disease reached a plateau at day 18 at a mean of 0.4 indicating almost no sign of paralysis (Figure 2, D). Strikingly, only two *Dll4^{ACKOC}* mice developed very mild symptoms, the remaining majority showing no sign of pathology other the course of the disease. The EAE peak (Figure 2, E) and average scores during the time of disability (Figure 2, F) were both strongly decreased in *Dll4^{ACKOC}* mice.

Clinical course in both *Dll4^{ACKOP}* mice and *Dll4^{ACKOC}* mice was correlated with decreased areas of demyelination as compared to the *control* cohorts (Figure 2, G-J).

In sum, we found that clinical course and pathology of EAE are reduced in mice with astrocyte *Dll4* knockdown. Furthermore, degree of *Dll4* knockdown appeared to have a dose-dependent effect as reduced pathology was only observed during the onset of the disease in the *Dll4^{ACKOP}* mice while reduced pathology was observed during both the onset and plateau of the disease in the *Dll4^{ACKOC}* mice. Moreover, the magnitude of the protective effect of *Dll4* astrocyte knockdown was stronger in *Dll4^{ACKOC}* mice than in *Dll4^{ACKOP}* mice.

Astrocyte-specific *Dll4* inactivation induces down-regulation of astrocyte reactivity under neuroinflammatory condition both *in vitro* and *in vivo*.

To test the importance of astrocyte DLL4 expression at the Glia limitans during neuroinflammation, we conditionally disrupted DLL4 expression in human astrocytes, and examined the consequences on astrocyte reactivity. To do so, we used human Normal Astrocytes (NA) from ScienCell that we transfected with either a *siRNA control* or a *siRNA* targeting *Dll4* expression. Astrocytes were then activated using the pro-inflammatory cytokine IL-1 β to induce astrogliosis *in vitro*.

We first verified the efficiency of the knockdown by measuring DLL4 gene and protein expression in primary human NA cultures transfected with the *siCTRL* versus *siDLL4* and treated with IL-1 β , and showed that DLL4 gene and protein expression were strongly downregulated in the *siDLL4* condition compared to the *siCTRL* condition (Figure 3, A-C) along with the protein expression of JAG1 and NICD (notch1 intracellular domain) which reflects the level of activation of the notch pathway (Figure 3, D-F). The down-regulation of the DLL4-NOTCH1 axis was paired with the down-regulation of identified reactive astrocyte markers notably GFAP (glial acidic fibrillary protein) (25) and cleaved CASPASE 3 (26) (Figure 3, D, G-H). We then confirmed that *Dll4* knockdown leads to disruption of astrogliosis *in vivo*, on spinal cord lysates from EAE induced *Dll4^{ACKOP}* and *Dll4^{ACKOC}* mice and *control* littermates.

Transcriptional profiling of spinal cord lysates from EAE induced *Dll4^{ACKOP}* and *control* littermates showed that 637 genes were downregulated in EAE induced *Dll4^{ACKOP}* mice while 68 genes were up-regulated (Figureshare DOI: 10.6084/m9.Figureshare.23708805). Notably, among the downregulated genes, a wide cohort of transcripts linked to glial cell activation

including reactive astrocyte markers (Figure 3, I). Specifically, this approach identified, among others, *Vim* (vimentin) and *Lcn2* (lipocalin2) transcripts as downregulated in spinal cord samples from EAE induced *Dll4^{ACKOP}* mice (Figure 3, I). Importantly, these markers stand today as two of the most significant reactive astrocyte markers (25) identified in the literature. We then confirmed VIM and LCN2 protein down-regulation, in spinal cord lysates from both EAE induced *Dll4^{ACKOP}* and *Dll4^{ACKOC}* mice compared to control littermates (Figure 3 J-K). Surprisingly, *Gfap* transcripts weren't modulated in spinal cord samples from EAE induced *Dll4^{ACKOP}* mice (Figureshare DOI: 10.6084/m9.Figureshare.23708805). However, in examining GFAP protein expression on spinal cord sections from EAE-induced *Dll4^{ACKOP}* mice and *control* littermates and from EAE-induced *Dll4^{ACKOC}* mice and *control* littermates, we found that both GFAP and VIM expression are decreased in the CNS of astrocyte specific *Dll4* deficient mice (*Dll4^{ACKO}* mice) (Figure 3, L-N) (Fig. S2, A).

These findings support a requirement for astrocyte DLL4 expression in the induction of astrogliosis under neuroinflammatory conditions.

DLL4 expression depends on the phosphorylation of ERK 1/2 *in vitro* and drives NICD upregulation in astrocytes leading to the upregulation of IL-6 transcripts *via* a direct interaction with NICD.

Next, we explored the signaling factors upstream and downstream of DLL4 induced astrogliosis. In the literature, Xia et al. have shown that ERK (extracellular signal-regulated kinase)-inhibition attenuated LPS (lipopolysaccharide)-induced endothelial DLL4 expression and angiogenic sprouting, both *in vitro* and *in vivo* (27). Therefore, we next measured the expression level of the phosphorylated form of P42-44 MAPK (mitogen-activated protein kinases or ERK 1/2) in reactive astrocyte cultures treated with U0126, a cell permeable inhibitor of MAPK (ERK 1/2) which blocks the kinase activity of MAP Kinase, or control vehicle. We showed that down-regulation of phospho-P42-44 (P-P42-44) is effective in U0126 treated reactive astrocytes when compared to control (Figure 4, A, D) and associated with the down-regulation of both DLL4 and NICD expression (Figure 4, A-C) suggesting that the DLL4-NOTCH1 axis activity depends on the phosphorylation of ERK 1/2 *in vitro*.

Interestingly, NICD has been found to directly regulate IL-6 (interleukin-6) expression in activated macrophages (28) and our transcriptional RNA profiling of spinal cord lysates from EAE induced *Dll4*^{ACKOP} and *control* littermates revealed a strong cohort of transcripts linked to IL-6 production (Figureshare DOI: 10.6084/m9.Figureshare.23708805). Therefore, we hypothesized that a direct interaction between NICD and *IL-6*, already observed in reactive macrophages, may contribute to reactive astrogliosis pathways *in vitro*. To respond to this question, we performed a ChIP experiment on reactive astrocyte lysates using IgG *versus* NICD antibodies to do the pull down and human *IL-6* primers for the PCR and demonstrated that NICD directly interacts with IL-6 in reactive astrocytes *in vitro* (Figure 4, E). Then, to rule out any potential effect of the inflammatory factor IL-1 β on the upregulation of IL-6 in our *in vitro* model, we transduced non-reactive human astrocytes with a *DLL4* expressing lentivirus *versus* an *empty* lentivirus. First we validated that the DLL4-NOTCH1 pathway was activated in the astrocyte cultures transduced with the *DLL4* expressing lentivirus, showing the upregulation of *HES1*, *HEY1* and *HEY2* genes (Figure 4, F-H) and highlighted the concurrent upregulation of *IL-6* expression level (Figure 4, I). *DLL4* upregulation was also validated to ensure the transduction efficacy (Figure 4, J).

Altogether, these results suggest that DLL4 induction depends on the phosphorylation of ERK 1/2 in reactive astrocytes and that DLL4 driven NOTCH1 activation leads to the upregulation of IL-6 transcripts *via* a direct interaction between NICD and the gene coding for IL-6.

Astrocyte-specific *Dll4* inactivation induces downregulation of astrocyte reactivity through the downregulation of the IL-6-JAK/STAT pathway both *in vitro* and *in vivo*.

JAK/STAT (janus kinase/signal transducer and activator of transcription) signaling is an essential effector pathway for the development and regulation of immune responses. Unbridled activation of the JAK/STAT pathway by pro-inflammatory cytokines, notably IL-6, plays a critical role in driving the pathogenesis of multiple sclerosis/EAE (29). Moreover, STAT3 has been shown to control astrogliosis in various pathologies such as ischemic stroke, neuroinflammatory disorders and brain tumors (30–32). We tested whether the IL-6-JAK/STAT pathway was regulated by astrocytic *Dll4* *in vitro* and *in vivo*. First we showed that both IL-6

and P-STAT3 (phosphorylated form of STAT3) were downregulated in reactive human astrocytes transfected with the *DLL4 siRNA* compared to reactive human astrocytes transfected with the *CTRL siRNA*. Notably, IL-6 and P-STAT3 expression level in the *DLL4 siRNA* condition was similar to the one measured in non-reactive astrocytes (Figure 5, A-C). Under the same conditions *in vitro* and on spinal cord sections from *Dll4^{ACKO}C* mice and *control* littermates, we then demonstrated that IL-6 signal was co-localized with GFAP signal in reactive astrocytes (Figure 5, D-E) (Fig. S2, B) and that IL-6 expression level was downregulated following *Dll4* knockdown both *in vitro* and *in vivo* (Figure 5, D-G) (Fig. S2, B). To clearly establish the link between IL-6 and P-STAT3, we then measured the phosphorylation of STAT3 *in vitro*, in human reactive astrocytes treated with Tocilizumab, a humanized monoclonal antibody targeting IL-6 receptors, or IgG. We showed that P-STAT3 is downregulated after Tocilizumab treatment compared to IgG with an expression level similar to the one of non-reactive astrocytes (Figure 5, H-I). Importantly, *DLL4* expression level was stable in both IgG and Tocilizumab treated reactive astrocytes, highlighting that IL-6-JAK/STAT interaction happened downstream of *DLL4* during astrogliosis (Figure 5, H, J).

Here we showed that, following the direct upregulation of IL-6 transcription by NICD in reactive astrocytes, IL-6 protein expression is strongly increased and leads to the phosphorylation of STAT3, an already established marker of astrogliosis via its interaction with the receptor JAK.

Mice with astrocyte *Dll4* inactivation display resistance to increases in blood brain barrier permeability via decreases in VEGFA and TYMP secretion, protecting the parenchyma from inflammatory infiltrate in a model of multiple sclerosis and in a model of acute neuroinflammation.

We compared the impact of *Dll4* blockade in astrocytes on plasma protein and inflammatory cell infiltration in the parenchyma by measuring IgG, CD4 and CD45+ lymphocyte infiltration and IBA1 expression level *in vivo*, on spinal cord sections from EAE induced *Dll4^{ACKOP}* and *Dll4^{ACKOC}* mice versus *control* littermates (Figure 6, A-D) (Fig. S3, A-H). We found that astrocyte *Dll4* deficient mice induced with EAE displayed less parenchymal inflammatory infiltration than *control* littermates (Figure 6, A-D) (Fig. S3, A-H). We previously

reported that reactive astrocytes express pro-permeability factors, VEGFA and TYMP, which drive blood brain barrier permeability in EAE (6). We therefore tested whether astrocyte DLL4 signaling regulates VEGFA and TYMP expression *in vitro* in *DLL4 siRNA* treated reactive astrocytes and *in vivo* in EAE induced *Dll4^{ACKOP}* and *Dll4^{ACKOC}* mice. We found that VEGFA and TYMP were downregulated in IL-1 β induced reactive astrocytes transfected with *DLL4 siRNA* when compared to IL-1 β induced reactive astrocytes transfected with *CTRL siRNA* (Figure 6, E-H). Moreover we showed that TYMP expression level was highly correlated to astrogliosis threshold as it followed the same pattern as GFAP signal intensity (Figure 6, H, J-K). We then confirmed these results *in vivo*, finding downregulation of astrocyte VEGFA and TYMP signals on spinal cord sections from EAE induced *Dll4^{ACKOP}* and *Dll4^{ACKOC}* mice when compared to *control* littermates (Figure 6, I, L-M) (Fig. S3, I-K).

Altogether, these results suggest that, under neuroinflammatory condition, astrocyte *Dll4* knockdown leads to decreased astrogliosis and is associated with reduced levels of VEGFA and TYMP, protecting against blood brain barrier breakdown and subsequent parenchymal inflammatory infiltrate.

To further support whether astrocyte DLL4 participates to inflammatory lesion pathogenesis by controlling astrogliosis, we decided to verify the results we obtained in the EAE mouse model, in a model of acute neuroinflammatory lesion. Initially, we compared responses of *Dll4^{ACKOP}* mice and littermate *controls* to cortical injection of AdIL-1 β , measuring the area of neuronal cell death (NEUN loss) in lesions at 7 dpi (days post injection) (Fig. S4, A, F). We then measured astrocyte reactivity (VIM and GFAP signal intensity) and associated IL-6 and TYMP expression in lesions at 7 dpi (Fig. S4, B-C, G-J). Finally, the maximal area of inflammatory infiltration into the CNS in term of parenchymal entry of serum proteins, notably FGB (fibrinogen), and CD4⁺ T helper lymphocytes was assessed in lesions at 7 dpi (Fig. S4, D-E, K-L). Importantly, these studies demonstrated that lesion formation in *Dll4^{ACKOP}* mice was strongly decreased compared to littermate *controls*. Confirming efficacy and specificity of inactivation, AdIL-1 β -induced lesions in *Dll4^{ACKOP}* mice showed lower levels of DLL4 (Fig. S1, K). Lesion size in *Dll4^{ACKOP}* mice, as measured by neuronal cell death or loss of NEUN immunoreactivity, was much narrower than in *controls* at 7 dpi (Fig. S4, A, F). Moreover, GFAP and VIM, two markers of astrocyte reactivity were strongly downregulated in *Dll4^{ACKOP}* mice

compared to *controls* and were associated with a decreased expression of astrogliosis marker IL-6 and pro-permeability marker TYMP (Fig. S4, B-C, G-J). There were also large decreases in the areas of cortical FGB and CD4⁺ T helper lymphocytes infiltration seen in AdIL-1 β lesions in *Dll4^{ACKOP}* mice at 7 dpi (Fig. S4, D-E, K-L).

We concluded that astrocyte DLL4 upregulation during acute neuroinflammation leads to astrogliosis in the lesion area and upregulation of the pro-inflammatory cytokine IL-6 and pro-permeability factor TYMP by reactive astrocytes. Lesion size is more severe in presence of astrocyte DLL4 and associated with a stronger inflammatory infiltrate of fibrinogen and immune cells into the parenchyma. Altogether our findings in both cortical AdIL-1 β lesions and spinal cord EAE support a global role for astrocytic Dll4 in driving astrogliosis and neuroinflammatory lesion pathogenesis.

Blockade of DLL4 protects against blood brain barrier opening and paralysis in EAE

To test the therapeutic potential of exogenous DLL4 blockade during EAE, we designed experiments to test the effects of an anti-DLL4 antibody. To probe for possible off-target effects of Dll4 blockade on the vascular endothelium, we first tested the EAE phenotype in a transgenic mouse with conditional endothelial *Dll4* inactivation as DLL4 contributes to the regulation of angiogenesis *via* DLL4-mediated NOTCH1 signaling in endothelium, a key pathway for vascular development (33). Therefore, we induced EAE in 10 weeks old *Cadherin5-Cre^{ERT2}, Dll4^{Flox/Flox}* mice and corresponding littermate *controls* and found that *Dll4* endothelial specific down-regulation had no impact on EAE disease severity (Fig. S5, A), associated peak (Fig. S5, B) and average score during time of disability (Fig. S5, C), suggesting that exogenous Dll4 blockade with an anti-Dll4 antibody would have minimal effects on the vascular endothelium impacting the course or neuropathology of EAE.

We then compared the impact of DLL4 blockade on disease severity in EAE (Figure 7). We sensitized 8 weeks old *C57BL/6* mice (9 per group) and, beginning at the onset of the disease, treated them every three days for eleven days with the inVivoMab anti-mouse DLL4 antibody (500 μ g/mouse/d) for a total of 4 intraperitoneal injections at D9, D12, D15 and D18. The inVivoMab polyclonal Armenian hamster IgG (500 μ g/mouse/d) was injected to the mice in

the control group. Neurological signs and pathology were evaluated from day 1 to day 25 post sensitization.

Onset of the disease occurred at day 10 post-sensitization, and ascending paralysis was first observed 24 h later, with severity in controls (polyclonal Armenian hamster IgG-treated mice) increasing until day 19, when neurologic deficit reached a plateau at a mean score of 3.3, indicating severe disease with complete hindlimb paralysis (Figure 7, A). Signs in anti-mouse DLL4 antibody-treated mice were much milder, peaking at day 16 at a mean score of just 2.4, indicative of a limp tail with moderate hindlimb weakness (Figure 7, A). Comparison of peak clinical severity in each individual was different between the anti-mouse DLL4 antibody and the polyclonal Armenian hamster IgG-treated regimens (Figure 7, B). For anti-mouse DLL4 antibody, differences in disease severity were highly significant compared with polyclonal Armenian hamster IgG-treated controls (Figure 7, C). Almost all controls (89%) but only 33% of anti-mouse DLL4 antibody-treated mice displayed complete hindlimb paralysis or worse (score ≥ 3) (Figure 7, A-C). No mortality at all was encountered in all cohorts.

These improvements in clinical disease observed with the anti-mouse DLL4 antibody were associated with reduced tissue damage, in terms of decreased demyelination (Figure 7, D, H). They were also associated with reduced blood–brain barrier breakdown, plasmatic protein and inflammatory cell infiltration (Figure 7, E-F, J-L) and astrogliosis (Figure 7, G-H, M-N). No difference was observed in term of microglial activation (Figure 7, D, K). Downregulation of astrogliosis in the anti-mouse DLL4 antibody group was associated to a decreased expression of the pro-inflammatory cytokine IL-6 and of the pro-permeability factors TYMP and VEGFA (Figure 7, G-H, O-P).

Collectively, the results of these therapies confirm the therapeutic benefit of exogenous DLL4 blockade during EAE and support our findings that astrocyte DLL4 drives astrogliosis during neuroinflammation and subsequent TYMP and VEGFA induced increases in blood brain barrier permeability.

Discussion

A complex network of intercellular signaling occurs between cells of the neurovascular unit during neuroinflammation (1, 3). Understanding the pathways controlling reactive astrogliosis

and blood brain barrier function is of considerable translational interest to the field of neuroimmunology and stroke. Here, we report for the first time, a role for juxtacrine astrocytic DLL4 mediated NOTCH1 receptor signaling as a key regulator of astrogliosis and blood brain barrier leakage in two models of CNS autoinflammatory disease.

First, we found that astrocytic DLL4 expression is up-regulated during neuroinflammation, both in mice and humans, driving astrogliosis and subsequent blood brain barrier permeability and inflammatory infiltration during pathology. We then show that the DLL4-mediated NOTCH1 juxtacrine signaling in astrocytes directly controls IL-6 transcriptional level and triggers the phosphorylation of STAT3, driving astrocyte reactivity at the Glia limitans and inducing pro-permeability factor secretion and subsequent blood brain barrier destabilization. Finally, we reveal that targeting DLL4 with exogenous blocking antibodies improves EAE symptoms in mice. Together, these data identify the DLL4-NOTCH1 axis as a key driver of astrogliosis during neuroinflammation via the promotion of the IL-6-STAT3-TYMP/VEGFA signaling actors leading to the disruption of the neurovascular unit and worsening pathology.

The expression of DLL4 by reactive astrocytes has only been acknowledged once in a model of brain injury in a paper published in 2021(24). However, in the present study, we unraveled for the first time the role of the DLL4-NOTCH1 axis and associated signaling pathways, in controlling reactive astrogliosis in two models of CNS inflammation (acute CNS inflammation model and EAE, a model of multiple sclerosis). The next step would be to examine astrocytic DLL4 expression in other pathologies of the CNS, notably Alzheimer's disease, stroke or amyotrophic lateral sclerosis in which astrocytic NOTCH1 upregulation and subsequent blood brain barrier permeability have already been identified as critical pathophysiological players (8–11). This could implicate DLL4-NOTCH1 mediated reactive astrogliosis as a more generalized mechanism in other chronic diseases of the CNS.

Like other neuroimmune factors, astrocytes are a primary source of IL-6 in the CNS (34–37) and IL-6 signaling has been shown to activate downstream pathways including JAK/STAT in various conditions including neuroinflammatory disorders³⁸. In 2021, an international consortium of scientists working on astrocytes defined a “reactive astrocyte” nomenclature; they identified STAT3-mediated transcriptional programs as one of the pathways inducing astrogliosis (25). Here we demonstrated for the first time that DLL4-mediated NOTCH1

juxtacrine signaling directly controls IL-6 transcriptional level in reactive astrocytes under inflammatory condition. Based on our results and the literature, we therefore assume that DLL4-NOTCH1 axis drives reactive astrogliosis by stimulating the IL-6-JAK/STAT3 signaling cascade activity in astrocytes during neuroinflammation. Therefore, DLL4/NOTCH1 axis might be considered as a novel pathway inducing astrogliosis and could be added to the “reactive astrocyte” nomenclature as a marker of astrogliosis. It also might be interesting to look at the DLL4/NOTCH1-IL6-STAT3 signaling cascade in other chronic disorders such as Alzheimer’s and Parkinson’s diseases to broaden the scope of our study.

In the vertebrates, 4 different NOTCH receptors have been identified and at the blood brain barrier, NOTCH1 and NOTCH4 are expressed by endothelial cells (17–19) while NOTCH3 is expressed by mural cells, or pericytes (20, 21). Importantly, DLL4 was previously established as a critical regulator of angiogenesis via the DLL4-mediated NOTCH signaling in endothelial cells which is a key pathway for vascular development (33). During neuropathology, two interconnected and interdependent vascular processes are observed: blood brain barrier breakdown leading to parenchymal inflammatory infiltration (38) and abnormal angiogenesis (39). Notably, in multiple sclerosis, studies indicate that angiogenesis takes place early and show either beneficial or detrimental effect on clinical recovery depending on the literature (40). We tested extensively whether DLL4 astrocytic upregulation during neuroinflammation leads to abnormal angiogenesis and we found no differences in blood vessel density or mural cell coverage in astrocytic Dll4 knockdown mice versus controls at day 18 post-induction (data not shown). Within the neurovascular unit, astrocytes at the Glia limitans are not in direct contact with endothelial cells at the blood brain barrier and therefore, any potential regulation of angiogenesis through the DLL4-NOTCH pathway during neuroinflammation would require paracrine signaling between DLL4 secreted by astrocytes and its receptor NOTCH1 at the endothelium. We performed additional experiments testing for the presence of DLL4 expressing exosomes in conditioned media from cultured IL-1 β treated human astrocytes and did not detect these (data not shown). These negative results and our current neuropathological results suggest that astrocyte DLL4 upregulation drives endothelial blood brain barrier breakdown rather than angiogenesis, via the secretion of the pro-permeability factors TYMP and VEGFA (6).

The question remains as to whether astrocytic DLL4 engages with NOTCH receptors of other cell types within the neurovascular unit, including mural cells, or pericytes, microglial processes and most interestingly, immune cells. Once immune cells penetrate the blood brain barrier, they accumulate within the perivascular space, a region between the basal basement membrane of the endothelial cell wall and the parenchymal basement membrane abutting the astrocyte endfeet (41, 42). Interestingly, NOTCH signaling can influence the differentiation and function of T lymphocytes(43). Regulatory T cells (Treg) differentially express NOTCH3 and NOTCH4 (43) and the differentiation and expansion of Tregs are reportedly induced by JAGGED engagement (44) and NOTCH3 activation (45). Moreover, novel emerging properties of the DLL4-NOTCH signaling pathway have recently been identified in pathology, notably its role in controlling the CD4+/CD8+, Th17/Treg balance both in experimental autoimmune uveitis and EAE models (46, 47). Comparing conditional *DLL4 knockout* mice and controls, we found that astrocytic DLL4 promotes the entry of T cells into the CNS parenchyma in two *in vivo* models of CNS inflammation (EAE and IL-1 β cortical stereotactic injection) and that DLL4 astrocytic deletion reduces clinical disability and histopathological damage during EAE. Collectively, these results suggest that astrocytic DLL4 does not only control astrogliosis but may also influence T cell trafficking behaviors and/or activation and differentiation patterns. The extent to which T-cell activation and differentiation is influenced by local DLL4-NOTCH signaling interactions within the perivascular space has yet to be determined and is currently under investigation by our group.

Exogenous administration of an anti-mouse DLL4 antibody improved the disease in wild type mice induced with EAE, but this amelioration was moderate and similar to the one observed in EAE induced *Dll4^{ACKOP}* mice which have a moderate recombination in spinal cord astrocytes. The impact of the anti-mouse DLL4 antibody therapy on EAE pathology was less significant than the one observed in the *Dll4^{ACKOC}* mice which are characterized by a full recombination efficacy in spinal cord astrocytes. This discrepancy on EAE disease severity observed between a complete astrocyte *Dll4* knockdown and the anti-mouse DLL4 antibody therapy may be due to several possible factors. First, the anti-mouse DLL4 antibody is injected systemically, possibly affecting DLL4 expression in other cell types with potential opposite effects on EAE pathology. While we induced EAE in *Cadherin5-Cre^{ERT2}*, *Dll4^{Flox/Flox}* mice and littermate *controls* and showed that *Dll4* endothelial specific down-regulation has no impact

on EAE disease severity, the potential still exists for effects on other unidentified cell types in adult mice induced with EAE that might express DLL4 and have opposing effects on EAE. Second, another possibility could be that the blood brain barrier, although permeable during EAE, still displays barrier properties limiting the amount of anti-mouse DLL4 antibody accessing the perivascular space and parenchyma. A third consideration is the specificity of the *Aldh1L1-Cre* promoter to astrocytes. While prior work showed high specificity of this promoter within the CNS to astrocytes, it is possible that it induces recombination in other cell types in the body expressing Dll4 which might contribute to the EAE phenotype (48).

Overall, our study identifies the DLL4-NOTCH1 axis as a key driver of astrogliosis during neuroinflammation via the IL-6-STAT3-TYMP/VEGFA signaling pathway, which is associated with disruption of the neurovascular unit and worsening pathology. This work also raises exciting questions about the role of the DLL4-NOTCH signaling in T-cell activation and differentiation (CD4+/CD8+, Th17/Treg balance) within the perivascular spaces of the neurovascular unit and its impact on neuropathology during neuroinflammation.

In conclusion, this work highlights a novel role for the astrocyte ligand DLL4 in the driving of astrogliosis and breakdown of the blood brain barrier during neuroinflammation via juxtacrine NOTCH1 mediated signaling to neighboring astrocytes.

Materials and Methods

Experimental Design

In this study, we investigated the role of astrocytic DLL4 on neurovascular unit homeostasis under neuroinflammatory conditions. To do so, we probed for downstream effectors of the DLL4-NOTCH1 axis and targeted these for therapy in two models of CNS inflammatory disease: experimental auto-immune encephalomyelitis (EAE) and stereotactic injection of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β . By combining molecular and cellular biology analysis, we first demonstrated that astrocytic DLL4 is upregulated during neuroinflammation, both in mice (EAE model) and humans (cortical biopsies from patients with multiple sclerosis acute lesions), driving astrogliosis and subsequent blood brain barrier permeability and inflammatory

infiltration. We then showed that the DLL4-mediated NOTCH1 signaling in astrocytes directly drives IL-6 levels using co-immunoprecipitation assay, and induces STAT3 phosphorylation promoting upregulation of astrocyte reactivity markers, pro-permeability factor secretion and consequent blood brain barrier destabilization. Finally, we revealed that blocking DLL4 with antibodies improves EAE symptoms in mice, identifying a potential novel therapeutic strategy for CNS autoimmune demyelinating disease.

Study approval

Human samples: The Neuro-CEB bio bank and the INSERM U1034 certify that all human sections utilized for this study are ethically obtained with documented, legal permission for research use (authorization number #AC-2018-3290 obtained from the Ministry of Higher Education and Research) and in the respect of the written given consent from the source person in accordance with applicable laws and the WMA Helsinki declaration of 2013.

Animal experiments were performed in accordance with the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes and approved by the local Animal Care and Use Committee of the Bordeaux University CEEA50 (IACUC protocol #16901).

Human tissues

Cortical sections from multiple sclerosis patients (active lesions) and healthy controls (frontal cortex) were obtained from the Neuro-CEB bio bank (<https://www.neuroceb.org/fr>). The sections were 30 μ m thick and obtained from fresh frozen samples.

Mice

The *Glast-Cre^{ERT2}* mice, *Aldh1L1-Cre^{ERT2}* mice, *Cdh5-Cre^{ERT2}* mice, *Dll4 Floxed (Dll4^{Flox})* mice and *C57BL/6* mice were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA).

The Cre recombinase in *Glast-Cre^{ERT2}* mice, *Aldh1L1-Cre^{ERT2}* mice and *Cdh5-Cre^{ERT2}* mice was activated by intraperitoneal injection of 1 mg tamoxifen (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 5 consecutive days at 8 weeks of age. Mice were phenotyped 2 weeks later. Successful and specific activation of the Cre recombinase has been verified by measuring recombination efficacy in *Glast-Cre^{ERT2};Rosa26^{mTmG}* mice, *Aldh1L1-Cre^{ERT2};Rosa26^{mTmG}*, and *Cdh5-Cre^{ERT2};Rosa26^{mTmG}* mice (Fig. S1, A-H)(4).

Neurovascular fraction enrichment from mouse CNS

Mouse was euthanized by cervical dislocation. Spinal cord was then harvested and transferred in a potter containing 2 mL of buffer A (HBSS 1X w/o phenol red (Gibco, Waltham, MA, USA), 10 mM HEPES (Gibco, Waltham, MA, USA) and 0,1 % BSA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and the tissue was pounded to obtain an homogenate which was collected in a 15 mL tube. The potter was rinsed with 1 mL of buffer A which was added to the 2 mL homogenate. Cold 30 % dextran solution was then added to the tube (V:V) to obtain a 15 % dextran working solution centrifuged for 25 minutes at 3000 g, 4 °C without brakes. After centrifugation, the pellet (neurovascular components and red cells) was collected and the supernatant (dextran solution and neural components) was centrifuged again to get the residual vessels. Neurovascular components were then pooled and re-suspended in 4 mL of buffer B (HBSS 1X Ca²⁺/ Mg²⁺ free with phenol red (Gibco, Waltham, MA, USA), 10 mM HEPES (Gibco, Waltham, MA, USA) and 0,1 % BSA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)).

Neurovascular fraction enrichment for qRT-PCR: after centrifugation of the cell suspension, the pellet was washed 3 times with the buffer B and filtered through a 100 µm nylon mesh (Millipore Corporation, Burlington, MA, USA). The nylon mesh was washed with 7 mL of buffer B to collect the retained enriched neurovascular fractions. The suspension was then centrifuged for 10 minutes at 1000 g and the pellet suspended in 300 µL of RIPA lysis buffer for western blot analysis or 1000 µL of Tri-Reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA) for qRT-PCR analysis.

RNA sequencing

RNA was isolated using Tri Reagent® as instructed by the manufacturer (Molecular Research Center Inc). Each sample was obtained from a single mouse. mRNA library preparation was performed based on manufacturer's recommendations (KAPA mRNA HyperPrep Kit [ROCHE]). Pooled library preparations were sequenced on NextSeq® 500 whole genome sequencing (Illumina®), corresponding to 2x30million reads per sample after demultiplexing. Quality of raw data was evaluated with FastQC(49). Poor-quality sequences were trimmed or removed with Trimmomatic(50) software to retain only good quality paired reads. Star v2.5.3a(51) was used to align reads on mm 10 reference genome using standard options. Quantification of gene and isoform abundances was done using RNA-Seq by Expectation-Maximization (RSEM) 1.2.28, prior to normalization using the edgeR Bioconductor software package³⁹. Finally, differential analysis was conducted with the generalized linear model (GLM) framework likelihood ratio test from edgeR. Multiple hypothesis-adjusted p-values were calculated using the Benjamini-Hochberg procedure to control for the false discovery rate (FDR). The fragments per kilobase per million mapped reads (FPKM) values of all transcripts of which expression was significantly different between MOG₃₅₋₅₅ EAE-sensitized *Dll4*^{ACKO/P} mice and littermate *controls* is provided in Figureshare (DOI: 10.6084/m9.Figureshare.23708805)

Cell culture

Human Normal Astrocytes (NA) (ScienCell, Carlsbad, California) were cultured in astrocyte medium (AM) (ScienCell, Carlsbad, California). Cell from passage 2 to passage 4 were used. Before any treatment, cells were serum starved in DMEM 1 g/L glucose, Mg⁺, Ca²⁺ (Gibco, Waltham, MA, USA) without serum for 12h or 24 hours depending on the experiment.

Transfection/Transduction

ON-TARGET plus SMART Pool Human non-targeting (20 µM) and *Human DLL4 siRNA* (20 µM) were purchased from Dharmacon (Colorado, USA). Cells were transfected using JetPRIME™ transfection reagent (Polyplus Transfection) according to the manufacturer's instructions.

More precisely, 500 000 astrocytes were seeded in 3.8 cm² cell culture wells. Transfection was done at day +1 with 1.8 µL of each siRNA and 4 µL JetPRIME per well. Cells were starved in DMEM 1 g/L glucose, Mg⁺, Ca²⁺ (Gibco, Waltham, MA, USA) at day +2, treated with PBS or IL-1β (10 ng/mL) at day +3 and RNA or protein samples harvested at day +4.

The human *DLL4* plasmid vector was obtained from the Theodor-Boveri-Institute, (Physiological Chemistry I, Biocenter of the University of Wurzburg) and the lentiviral plasmid was then produced and amplified in our lab. The empty lentiviral vector (*pRRLsin.MND.MCS.WPRE (lentiMND14)*) was produced and amplified in our lab. 500 000 astrocytes were seeded in 3.8 cm² cell culture wells and incubated for 18h before infection. Lentiviral supernatant was added with multiplicity of infection (MOI) at 10. After 8h, the lentiviral supernatant was replaced with fresh complete cell culture medium and the cells were incubated for 24 h before harvesting RNA samples.

Cytokines/Growth Factors/Chemicals

Human IL-1β was purchased from PeproTech (Rocky Hills, NJ, USA) and used at 10 ng/mL. U0126, a cell permeable inhibitor of MAPK (ERK 1/2) was purchased from Cell Signaling (Danvers, MA, USA) and used at 10µM. The humanized anti-IL-6 receptor antibody Tocilizumab was used at 1µg/mL.

Antibodies

Anti-CDH5 (Goat), anti-DLL4 (goat), anti-IL-6 (goat), anti-PODXL (goat), anti-SOX9 (goat) and anti-TYMP (goat) were from R&D systems (Minneapolis, MN, USA). Anti-FGB (rabbit) was from Dako (Carpinteria, CA, USA). Anti-human-LCN2 (mouse), anti-MBP (rat) and anti-VEGFA (Rabbit) were from Abcam (Cambridge, MA, USA). Anti-CD4 (rat) and anti-GFAP (rat and rabbit) were from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Anti-RNA binding fox-1 homolog 3 (NEUN) (rabbit) was from Millipore (Billerica, MA, USA). Anti-human-DLL4 (Rabbit) and anti-LAM (rabbit) were from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Anti β-ACTIN (rabbit), anti-CASP3 (rabbit) and Cleaved CASP3 (rabbit), anti-cleaved NOTCH1 (NICD) (rabbit), anti-DLL4 (rabbit), anti-human-JAG1 (rabbit), anti-P42-44 MAPK (rabbit) and phospho-P42-44

MAPK (rabbit), and anti-VIM (rabbit) were from cell signaling (Danvers, MA, USA). Anti-human-IL-6 (rabbit) was from Proteintech (Rosemont, IL, USA). Anti-human-STAT3 (mouse) and anti-human-P-STAT3 Tyr705 (rabbit) were from Ozyme (Saint-Cyr-l'École, France). Anti-IBA1 (rabbit) was from Fujifilm Wako (Osaka, Japan). Anti-GFP (Goat) was from Novus Biologicals (Minneapolis, MN, USA).

Chromatin ImmunoPrecipitation

Chromatin immune-precipitation (ChIP) assay was performed with human NAs treated with IL-1 β for 12h. Proteins were crosslinked to DNA by adding formaldehyde to the culture media to a final concentration of 1% and incubating for 10 minutes at 37°C.

Fixed cells were rinsed twice with ice cold PBD containing AEBSF 1/1000 v/v, leupeptine 1/1000 v/v and aprotinine 1/1000 v/v. Cells (1 million) were lysed in 1.000 μ L of SDS buffer (SDS 1% v/v, EDTA 10mM, Tris-HCl 50mM pH8, AEBSF 1/1000 v/v, leupeptine 1/1000 v/v, aprotinine 1/1000 v/v). Lysate was sonicated on ice 20 times for 10 seconds to obtain DNA fragments with an average size of 500bp. The chromatin solution was diluted in dilution buffer to a final volume of 2mL and incubated 30 minutes at +4 °C with 30 μ g of protein G sepharose and 5 μ g of salmon sperm DNA. After centrifugation, the supernatant was incubated overnight at +4°C with 10 μ l of anti-human NICD antibody or non-specific IgG. After being washed twice in PBS, 30 μ g of G protein beads were blocked with 5 μ g of salmon sperm DNA added to each sample and incubated one hour at +4°C. Immuno-precipitated samples were centrifuged and washed once in low salt wash buffer, once in high salt wash buffer, once in LiCl wash buffer. Samples were then washed twice in Tris-EDTA. Elution of immune-precipitated chromatin was performed by adding 250 μ L of elution buffer and incubation was performed at room temperature for 15 minutes, and repeated once. To reverse DNA crosslinking, the eluate was incubated for 4 hours at 65°C after adding 20 μ L of NaCl 5M. Samples were then incubated 1 hour at 65°C with 2 μ L of proteinase K, 10 μ L of EDTA 0,5M and 20 μ L of TE 1M pH 6.5 for protein removal. DNA was then purified using phenol/chloroform extraction.

Quantitative RT-PCR

RNA was isolated using Tri Reagent® (Molecular Research Center Inc) as instructed by the manufacturer, from 3×10^5 cells or from isolated mouse enriched neurovascular fractions. For quantitative RT-PCR analyses, total RNA was reverse transcribed with M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) and amplification was performed on a DNA Engine Opticon®2 (MJ Research Inc, St Bruno, Canada) using B-R SYBER® Green SuperMix (Quanta Biosciences, Beverly, MA, USA). Primer sequences are reported in Table 1.

The relative expression of each mRNA was calculated by the comparative threshold cycle method and normalized to β -actin mRNA expression.

Western Blots

Protein expression was evaluated by SDS-PAGE. Protein loading quantity was controlled using the rabbit monoclonal anti- β -actin antibody (cell signaling, Danvers, MA, USA). Secondary antibodies were from Invitrogen. The signal was then revealed by using an Odyssey Infrared imager (LI-COR, Lincoln, NE, USA). For quantification, the mean pixel density of each band was measured using Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA) and data were standardized to β -actin, and fold change versus control calculated.

Stereotactic injection

10 weeks old *Dll4^{ACKO/P}* mice and littermate *controls* (6 mice per condition) were anaesthetized using isoflurane (3% induction and 1% maintenance) (Virbac Schweiz, Glattbrugg, Germany) and placed into a stereotactic frame (Stoelting Co., IL, USA). To prevent eye dryness, an ophthalmic *ointment* was applied at the ocular surface to maintain eye hydration during the time of surgery. The skull was shaved and the skin incised on 1 cm to expose the skull cap. Then, a hole was drilled into the skull, using a pneumatic station S001+TD783 Bien Air, until reaching the dura mater. AdIL-1 (10^7 PFU) was then delivered into the frontal cortex at coordinates of 1 μ m posterior to bregma, 2 μ m left of the midline and 1.5 μ m below the surface of the cortex.

Mice received a subcutaneous injection of buprenorphine (0,05 mg/kg) (Ceva santé animale, Libourne, France) 30 minutes before surgery and again 8 hours post-surgery to assure a constant analgesia during the procedure and postoperatively. Mice were euthanized by pentobarbital (Richter Pharma, Wels, Austria) overdose at 7 days post injection (dpi). For histological assessment, the brain of each animal was harvested.

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)

10 week old female mice were immunized by subcutaneous injection of 300 µg myelin oligodendrocyte glycoprotein-35-55 (MOG₃₅₋₅₅) (Hooke laboratories, Lawrence, MA, USA) in 200 µl Freund's Adjuvant containing 300 µg/mL mycobacterium tuberculosis H37Ra (Hooke laboratories, Lawrence, MA, USA) in the dorsum. Mice were administered with 500 ng pertussis toxin (PTX) *intra-peritoneously* on day of sensitization and 1 day later (Hooke laboratories). The emulsion provides antigen which initiates expansion and differentiation of MOG-specific autoimmune T cells. PTX enhances EAE development by providing additional adjuvant. EAE will develop in mice 7-14 days after immunization (Day 0): animals which develop EAE will become paralyzed. Disease was scored (0, no symptoms; 1, floppy tail; 2, hind limb weakness (paraparesis); 3, hind limb paralysis (paraplegia); 4, fore- and hind limb paralysis; 5, death)(52) from day 7 post immunization until day 28 post immunization. At Day 28, all the animals were euthanized by pentobarbital (Richter Pharma, Wels, Austria) overdose. For histological assessment, cervical, lumbar and dorsal sections of each animal spinal cord, as well as the spleen, were harvested.

Therapies

inVivoMab polyclonal Armenian hamster IgG (500 µg/mouse/d) was used as control group therapy. InVivoMab anti-mouse DLL4 antibody (500 µg/mouse/d) was used as experimental group therapy. Intra-peritoneal injection of each therapy was injected (9 mice per therapy) at day 8, day 12, day 15 and day 18 post EAE immunization.

Immunohistochemistry

Prior to tissue collection and staining, mice were transcardially perfused with PBS (10mL) followed by 10% Formalin (10mL) to remove intravascular plasma proteins. Brain and spinal cord samples were either fixed in 10 % formalin for 3 hours, incubated in 30 % sucrose overnight, OCT embedded and cut into 9 μm thick sections or directly OCT embedded and cut into 9 μm thick sections. Cultured cells were fixed with 10 % formalin for 10 minutes. Human frozen sections were used directly without any prior treatment. Concerning the fixed sections, for IL-6, prior to blocking, sections were soaked in Citrate (pH 7.5; 100 °C). For TYMP, prior to blocking, sections were soaked in EDTA (pH 6.0; 100 °C). For CD4, sections were treated with 0.5 mg/mL protease XIV (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 37 °C for 5 minutes. Primary antibodies were used at 1:100 except DLL4 (1:50), FGB (1:500) and LAM (1:1.000). Samples were examined using a Zeiss Microsystems confocal microscope (Oberkochen, Germany), and stacks were collected with z of 1 μm .

For immunofluorescence analyzes, primary antibodies were resolved with Alexa Fluor®–conjugated secondary polyclonal antibodies (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and nuclei were counterstained with DAPI (1:5000) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For all immunofluorescence analyses, negative controls using secondary antibodies only were done to check for antibody specificity.

Statistical analyses

Results are reported as mean \pm SEM. Comparisons between groups were analyzed for significance with the non-parametric Mann-Whitney test, the non-parametric Kruskal Wallis test followed by the Dunn's multiple comparison test when we have more than 2 groups or a nonlinear regression test (Boltzmann sigmoidal) for the EAE scoring analysis **using GraphPad Prism v8.0.2 (GraphPad Inc, San Diego, CA, USA)**. Differences between groups were considered significant when $p \leq 0.05$ (*: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$ ****: $p \leq 0.0001$).

References

1. H. L. McConnell, C. N. Kersch, R. L. Woltjer, E. A. Neuwelt, The Translational Significance of the Neurovascular Unit. *J. Biol. Chem.* **292**, 762–770 (2017).
2. B. Engelhardt, C. Coisne, Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids Barriers CNS.* **8**, 4 (2011).
3. C. Iadecola, The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron.* **96**, 17–42 (2017).
4. P. Mora, P.-L. Hollier, S. Guimbal, A. Abelanet, A. Diop, L. Cornuault, T. Couffinhal, S. Horng, A.-P. Gadeau, M.-A. Renault, C. Chapouly, Blood-brain barrier genetic disruption leads to protective barrier formation at the Glia Limitans. *PLoS Biol.* **18**, e3000946 (2020).
5. U. Gimsa, N. A. Mitchison, M. C. Brunner-Weinzierl, Immune privilege as an intrinsic CNS property: astrocytes protect the CNS against T-cell-mediated neuroinflammation. *Mediators Inflamm.* **2013**, 320519 (2013).
6. C. Chapouly, A. Tadesse Argaw, S. Horng, K. Castro, J. Zhang, L. Asp, H. Loo, B. M. Laitman, J. N. Mariani, R. Straus Farber, E. Zaslavsky, G. Nudelman, C. S. Raine, G. R. John, Astrocytic TYMP and VEGFA drive blood-brain barrier opening in inflammatory central nervous system lesions. *Brain.* **138**, 1548–1567 (2015).
7. T. Nitta, M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse, S. Tsukita, Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol.* **161**, 653–660 (2003).
8. J.-H. Zhong, H.-J. Zhou, T. Tang, H.-J. Cui, A.-L. Yang, Q.-M. Zhang, J.-H. Zhou, Q. Zhang, X. Gong, Z.-H. Zhang, Z.-G. Mei, Activation of the Notch-1 signaling pathway may be involved in intracerebral hemorrhage-induced reactive astrogliosis in rats. *J Neurosurg.* **129**, 732–739 (2018).
9. I. S. Shimada, A. Borders, A. Aronshtam, J. L. Spees, Proliferating reactive astrocytes are regulated by Notch-1 in the peri-infarct area after stroke. *Stroke.* **42**, 3231–3237 (2011).

10. A. Nonneman, N. Criem, S. A. Lewandowski, R. Nuyts, D. R. Thal, F. W. Pfrieder, J. Ravits, P. Van Damme, A. Zwijsen, L. Van Den Bosch, W. Robberecht, Astrocyte-derived Jagged-1 mitigates deleterious Notch signaling in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis.* **119**, 26–40 (2018).
11. Y.-Y. Cheng, Y.-X. Ding, G.-L. Bian, L.-W. Chen, X.-Y. Yao, Y.-B. Lin, Z. Wang, B.-Y. Chen, Reactive Astrocytes Display Pro-inflammatory Adaptability with Modulation of Notch-PI3K-AKT Signaling Pathway Under Inflammatory Stimulation. *Neuroscience.* **440**, 130–145 (2020).
12. X. Liu, F. Zhou, W. Wang, G. Chen, Q. Zhang, R. Lv, Z. Zhao, X. Li, Q. Yu, J. M. Meves, H. Hua, X. Li, X. Wang, H. Sun, D. Gao, IL-9-triggered lncRNA Gm13568 regulates Notch1 in astrocytes through interaction with CBP/P300: contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation.* **18**, 1–15 (2021).
13. M. E. Fortini, Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**, 673–684 (2002).
14. D. Selkoe, R. Kopan, Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci.* **26**, 565–597 (2003).
15. J. S. Mumm, R. Kopan, Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol.* **228**, 151–165 (2000).
16. S. J. Bray, Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**, 678–689 (2006).
17. P. A. Murphy, M. T. Y. Lam, X. Wu, T. N. Kim, S. M. Vartanian, A. W. Bollen, T. R. Carlson, R. A. Wang, Endothelial Notch4 signaling induces hallmarks of brain arteriovenous malformations in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 10901–10906 (2008).
18. A. Grigorian, R. Hurford, Y. Chao, C. Patrick, T. D. Langford, Alterations in the Notch4 pathway in cerebral endothelial cells by the HIV aspartyl protease inhibitor, nelfinavir. *BMC Neurosci.* **9**, 1–18 (2008).
19. L. Yu, Z. Lu, S. Burchell, D. Nowrangi, A. Manaenko, X. Li, Y. Xu, N. Xu, J. Tang, H. Dai, J. H. Zhang, Adropin preserves the blood-brain barrier through a Notch1/Hes1 pathway after intracerebral hemorrhage in mice. *J Neurochem.* **143**, 750–760 (2017).

20. H. Liu, S. Kennard, B. Lilly, NOTCH3 expression is induced in mural cells through an autoregulatory loop that requires endothelial-expressed JAGGED1. *Circ Res.* **104**, 466–475 (2009).
21. K. Gaengel, G. Genové, A. Armulik, C. Betsholtz, Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **29**, 630–638 (2009).
22. D. Qian, L. Li, Y. Rong, W. Liu, Q. Wang, Z. Zhou, C. Gu, Y. Huang, X. Zhao, J. Chen, J. Fan, G. Yin, Blocking Notch signal pathway suppresses the activation of neurotoxic A1 astrocytes after spinal cord injury. *Cell Cycle.* **18**, 3010–3029 (2019).
23. M. Patel, J. Anderson, S. Lei, Z. Finkel, B. Rodriguez, F. Esteban, R. Risman, Y. Li, K.-B. Lee, Y. L. Lyu, L. Cai, Nkx6.1 enhances neural stem cell activation and attenuates glial scar formation and neuroinflammation in the adult injured spinal cord. *Exp Neurol.* **345**, 113826 (2021).
24. T. N. Ribeiro, L. M. Delgado-García, M. A. Porcionatto, Notch1 and Galectin-3 Modulate Cortical Reactive Astrocyte Response After Brain Injury. *Front Cell Dev Biol.* **9**, 649854 (2021).
25. C. Escartin, E. Galea, A. Lakatos, J. P. O’Callaghan, G. C. Petzold, A. Serrano-Pozo, C. Steinhäuser, A. Volterra, G. Carmignoto, A. Agarwal, N. J. Allen, A. Araque, L. Barbeito, A. Barzilai, D. E. Bergles, G. Bonvento, A. M. Butt, W.-T. Chen, M. Cohen-Salmon, C. Cunningham, B. Deneen, B. De Strooper, B. Díaz-Castro, C. Farina, M. Freeman, V. Gallo, J. E. Goldman, S. A. Goldman, M. Götz, A. Gutiérrez, P. G. Haydon, D. H. Heiland, E. M. Hol, M. G. Holt, M. Iino, K. V. Kastanenka, H. Kettenmann, B. S. Khakh, S. Koizumi, C. J. Lee, S. A. Liddelow, B. A. MacVicar, P. Magistretti, A. Messing, A. Mishra, A. V. Molofsky, K. K. Murai, C. M. Norris, S. Okada, S. H. R. Oliet, J. F. Oliveira, A. Panatier, V. Parpura, M. Pekna, M. Pekny, L. Pellerin, G. Perea, B. G. Pérez-Nievas, F. W. Pfrieger, K. E. Poskanzer, F. J. Quintana, R. M. Ransohoff, M. Riquelme-Perez, S. Robel, C. R. Rose, J. D. Rothstein, N. Rouach, D. H. Rowitch, A. Semyanov, S. Sirko, H. Sontheimer, R. A. Swanson, J. Vitorica, I.-B. Wanner, L. B. Wood, J. Wu, B. Zheng, E. R. Zimmer, R. Zorec, M. V. Sofroniew, A. Verkhratsky, Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci.* **24**, 312–325 (2021).
26. D.-C. Wagner, U. M. Riegelsberger, S. Michalk, W. Härtig, A. Kranz, J. Boltze, Cleaved caspase-3 expression after experimental stroke exhibits different phenotypes and is predominantly non-apoptotic. *Brain Res.* **1381**, 237–242 (2011).

27. S. Xia, H. L. Menden, T. R. Korfhagen, T. Kume, V. Sampath, Endothelial immune activation programmes cell-fate decisions and angiogenesis by inducing angiogenesis regulator DLL4 through TLR4-ERK-FOXC2 signalling. *The Journal of Physiology*. **596**, 1397–1417 (2018).
28. W. Wongchana, T. Palaga, Direct regulation of interleukin-6 expression by Notch signaling in macrophages. *Cell Mol Immunol*. **9**, 155–162 (2012).
29. Y. Liu, S. A. Gibson, E. N. Benveniste, H. Qin, Opportunities for Translation from the Bench: Therapeutic Intervention of the JAK/STAT Pathway in Neuroinflammatory Diseases. *Crit Rev Immunol*. **35**, 505–527 (2015).
30. N. Reichenbach, A. Delekate, M. Plescher, F. Schmitt, S. Krauss, N. Blank, A. Halle, G. C. Petzold, Inhibition of Stat3-mediated astrogliosis ameliorates pathology in an Alzheimer's disease model. *EMBO Mol Med*. **11**, e9665 (2019).
31. L. Abjean, L. Ben Haim, M. Riquelme-Perez, P. Gipchtein, C. Derbois, M.-A. Palomares, F. Petit, A.-S. Hérard, M.-C. Gaillard, M. Guillermier, M. Gaudin-Guérif, G. Aurégan, N. Sagar, C. Héry, N. Dufour, N. Robil, M. Kabani, R. Melki, P. De la Grange, A. P. Bemelmans, G. Bonvento, J.-F. Deleuze, P. Hantraye, J. Flament, E. Bonnet, S. Brohard, R. Olasso, E. Brouillet, M.-A. Carrillo-de Sauvage, C. Escartin, Reactive astrocytes promote proteostasis in Huntington's disease through the JAK2-STAT3 pathway. *Brain*, awac068 (2022).
32. K. Ceyzériat, L. Abjean, M.-A. Carrillo-de Sauvage, L. Ben Haim, C. Escartin, The complex STATES of astrocyte reactivity: How are they controlled by the JAK-STAT3 pathway? *Neuroscience*. **330**, 205–218 (2016).
33. M. Hellström, L.-K. Phng, J. J. Hofmann, E. Wallgard, L. Coultas, P. Lindblom, J. Alva, A.-K. Nilsson, L. Karlsson, N. Gaiano, K. Yoon, J. Rossant, M. L. Iruela-Arispe, M. Kalén, H. Gerhardt, C. Betsholtz, Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*. **445**, 776–780 (2007).
34. S. S. Choi, H. J. Lee, I. Lim, J. Satoh, S. U. Kim, Human Astrocytes: Secretome Profiles of Cytokines and Chemokines. *PLOS ONE*. **9**, e92325 (2014).
35. Y. Dong, E. N. Benveniste, Immune function of astrocytes. *Glia*. **36**, 180–190 (2001).

36. C. Farina, F. Aloisi, E. Meinl, Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* **28**, 138–145 (2007).
37. T. Nakamachi, M. Tsuchida, N. Kagami, S. Yofu, Y. Wada, M. Hori, D. Tsuchikawa, A. Yoshikawa, N. Imai, K. Nakamura, S. Arata, S. Shioda, IL-6 and PACAP receptor expression and localization after global brain ischemia in mice. *J Mol Neurosci.* **48**, 518–525 (2012).
38. B. Engelhardt, R. M. Ransohoff, Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol.* **33**, 579–589 (2012).
39. F. Girolamo, C. Coppola, D. Ribatti, M. Trojano, Angiogenesis in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathologica Communications.* **2**, 84 (2014).
40. J. Lengfeld, T. Cutforth, D. Agalliu, The role of angiogenesis in the pathology of multiple sclerosis. *Vasc Cell.* **6**, 23 (2014).
41. B. Engelhardt, C. Coisne, Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids Barriers CNS.* **8**, 4 (2011).
42. B. Engelhardt, R. M. Ransohoff, Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol.* **33**, 579–589 (2012).
43. K. Tanigaki, T. Honjo, Regulation of lymphocyte development by Notch signaling. *Nat Immunol.* **8**, 451–456 (2007).
44. E. S. Yvon, S. Vigouroux, R. F. Rousseau, E. Biagi, P. Amrolia, G. Dotti, H.-J. Wagner, M. K. Brenner, Overexpression of the Notch ligand, Jagged-1, induces alloantigen-specific human regulatory T cells. *Blood.* **102**, 3815–3821 (2003).
45. E. Anastasi, A. F. Campese, D. Bellavia, A. Bulotta, A. Balestri, M. Pascucci, S. Checquolo, R. Gradini, U. Lendahl, L. Frati, A. Gulino, U. Di Mario, I. Screpanti, Expression of activated Notch3 in transgenic mice enhances generation of T regulatory cells and protects against experimental autoimmune diabetes. *J Immunol.* **171**, 4504–4511 (2003).

46. H. Eixarch, M. J. Mansilla, C. Costa, S. L. Kunkel, X. Montalban, N. Godessart, C. Espejo, Inhibition of delta-like ligand 4 decreases Th1/Th17 response in a mouse model of multiple sclerosis. *Neuroscience Letters*. **541**, 161–166 (2013).
47. X. Yin, B. Liu, H. Wei, S. Wu, L. Guo, F. Xu, T. Liu, H. Bi, D. Guo, Activation of the Notch signaling pathway disturbs the CD4+/CD8+, Th17/Treg balance in rats with experimental autoimmune uveitis. *Inflamm Res*. **68**, 761–774 (2019).
48. D. Nemeth, N. Luqman, L. Chen, N. Quan, *MicroPubl Biol*, in press, doi:10.17912/micropub.biology.000832.
49. G. de Sena Brandine, A. D. Smith, Falco: high-speed FastQC emulation for quality control of sequencing data. *F1000Res*. **8**, 1874 (2019).
50. A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel, Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. **30**, 2114–2120 (2014).
51. A. Dobin, C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, T. R. Gingeras, STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. **29**, 15–21 (2013).
52. B. T. Gurfein, Y. Zhang, C. B. López, A. T. Argaw, A. Zameer, T. M. Moran, G. R. John, IL-11 regulates autoimmune demyelination. *J. Immunol*. **183**, 4229–4240 (2009).

Acknowledgments

We thank Sylvain Grolleau and Maxime David for their technical help. We thank Christelle Boullé for administrative assistance.

Funding:

Fondation pour l'aide à la recherche sur la sclérose en plaques (ARSEP), projet EMERGENCE ARSEP 2021 numéro 1246, grant R21076GG (CC, PM).

Author contributions:

Conceptualization: PM, ML, CB, PR

Methodology: PM, ML, CC

Investigation: PM, CC

Visualization: CC, MAR

Supervision: CC

Writing—original draft: CC

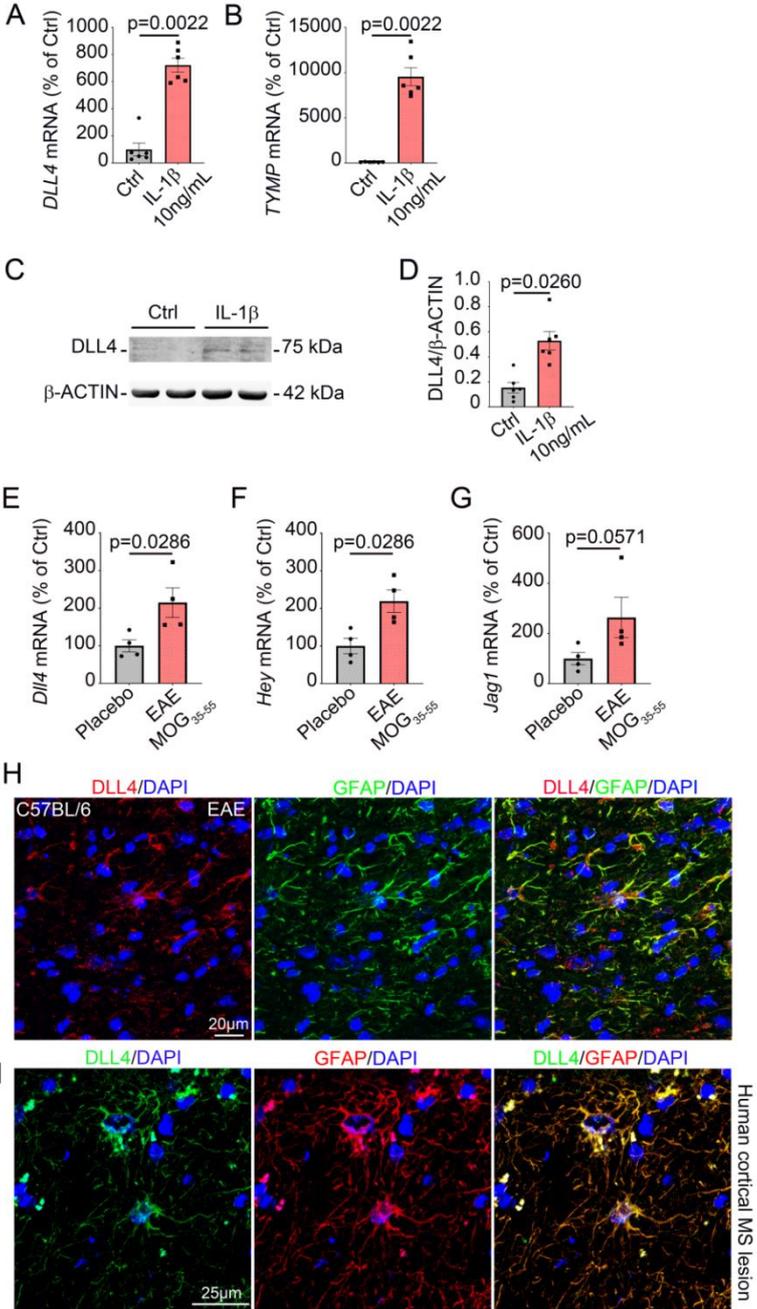
Writing—review & editing: CC, MAR, APG, TC, SH

Competing interests: Authors declare that they have no competing interests.

Data and materials availability: All data are available in the main text or the supplementary materials.

Figures and Tables

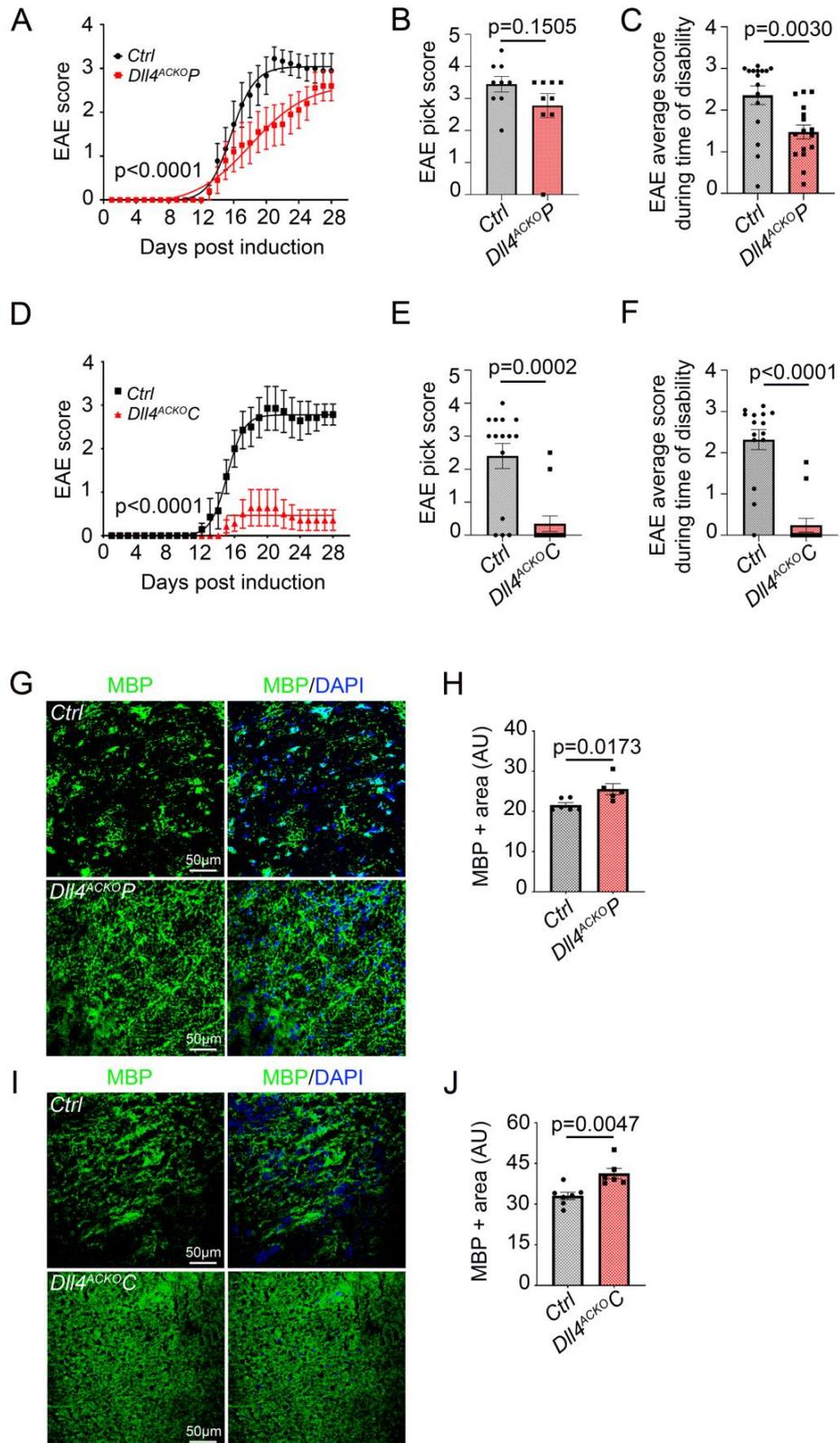
Figure 1



DLL4 is expressed by CNS astrocytes and up-regulated during chronic neuroinflammation :

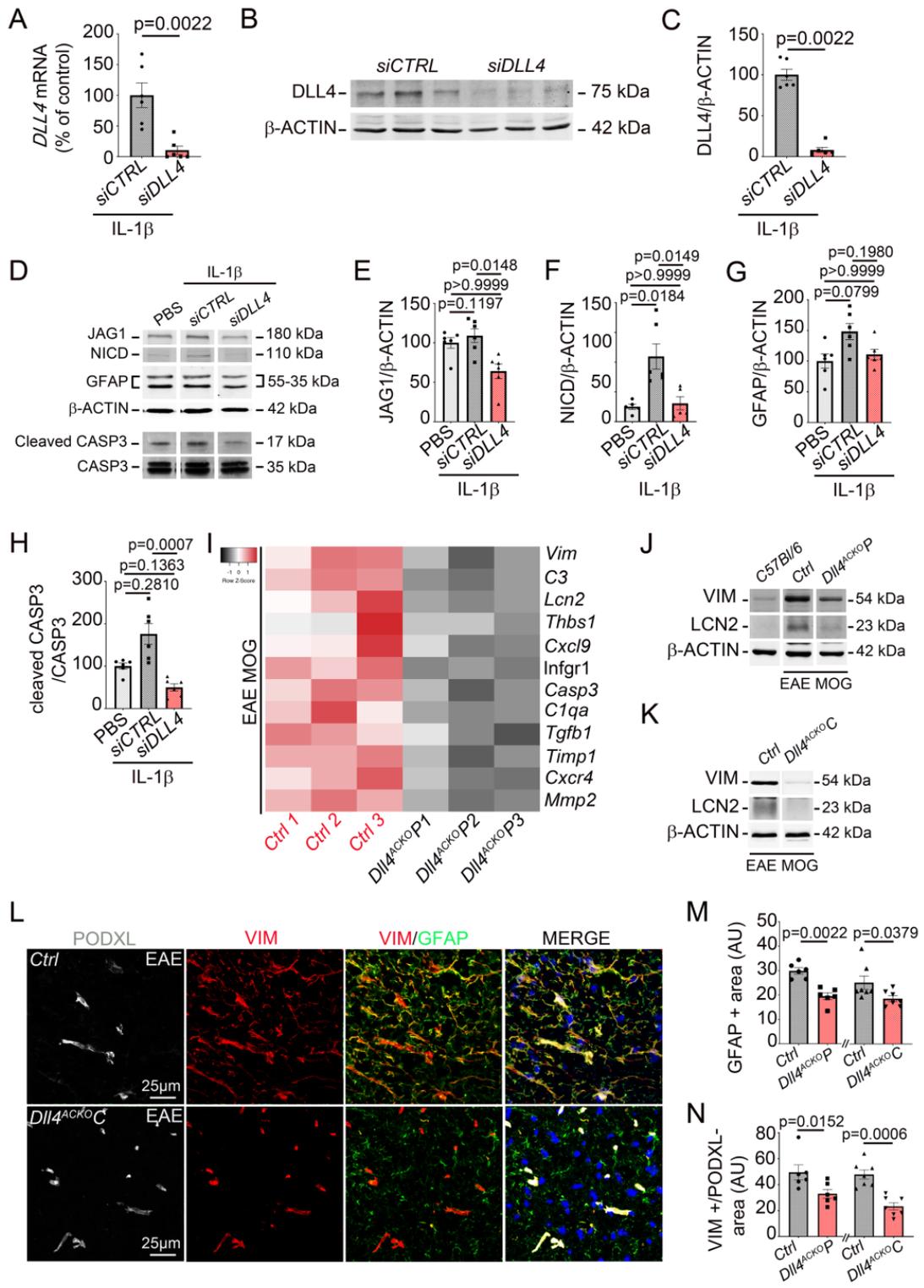
(A-D) Human Normal Astrocytes (NA) were seeded and cultured until confluence and starved for 24 h. NA were then treated for 24h with PBS 1X (control condition) versus 10 ng/mL of recombinant IL-1 β (test condition). **(A)** *DLL4* and **(B)** *TYMP* expression were then quantified by qRT-PCR. *β -ACTIN* was used as a reference. **(C)** Representative western blot for *DLL4* and *β -ACTIN* protein expression level are shown. **(D)** *DLL4* protein expression level was quantified by western blot. *β -ACTIN* was used as a reference. **(E-H)** 12-week-old *C57Bl/6* females (4 animals per group) were induced with MOG₃₅₋₅₅ EAE versus Placebo. At day 13 post induction, mice were euthanized and spinal cord neurovascular units were isolated. **(E)** *Dll4*, **(F)** *Hey1*, and **(G)** *Jag1* expression were measured via qRT-PCR in both groups (MOG₃₅₋₅₅ versus placebo). **(H)** Spinal cord sections were harvested from MOG₃₅₋₅₅ EAE induced versus Placebo treated *C57Bl/6* females and immune-stained with anti-DLL4 (in green) and anti-GFAP (in red) antibodies. Representative DLL4/GFAP staining is shown. **(I)** Human cortical sections from healthy donors and patients with cortical multiple sclerosis lesions were obtain from the NeuroCEB biobank and immunostained with anti-DLL4 (in green) and anti-GFAP (in red) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (in blue). Representative DLL4/GFAP staining is shown. Mann-Whitney U test.

Figure 2



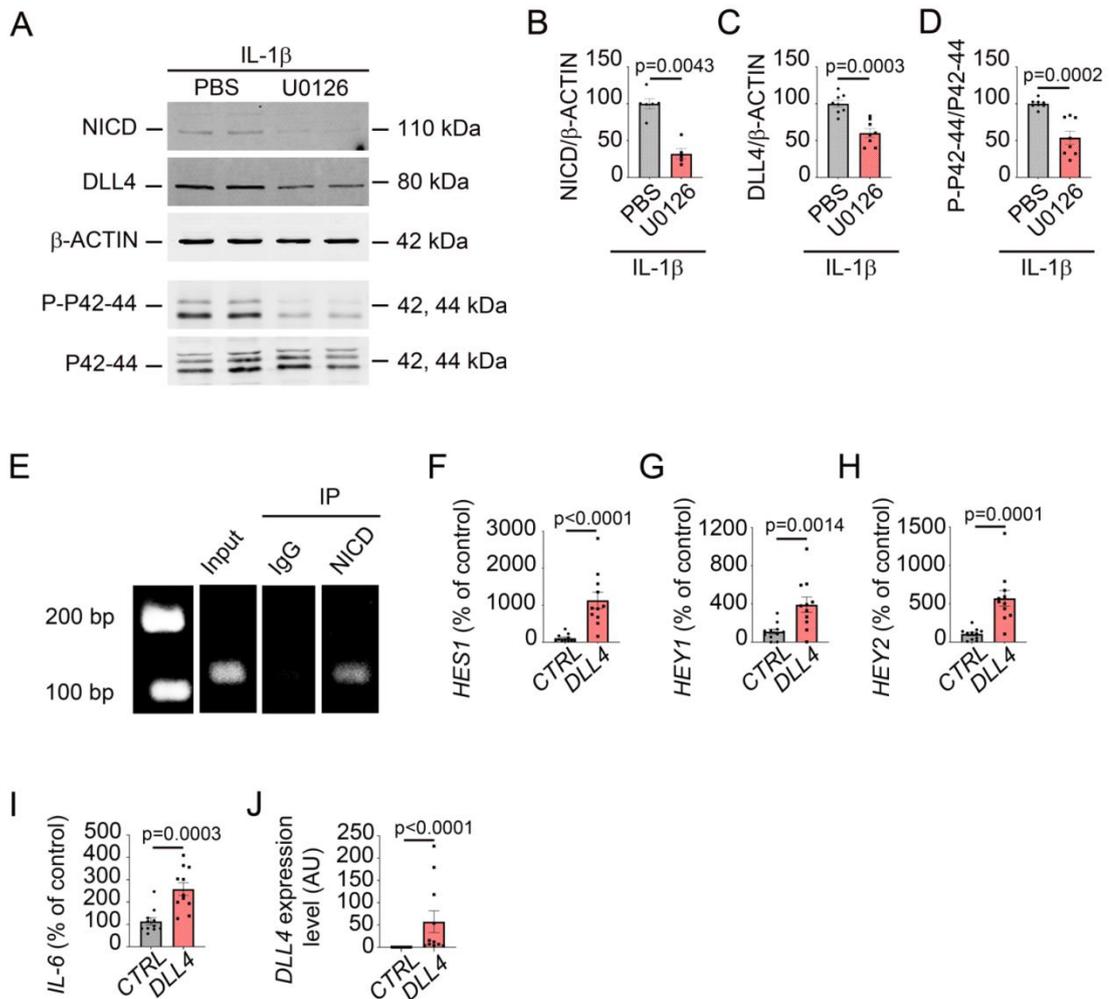
Inactivation of astrocyte *Dll4* reduces disability in a model of multiple sclerosis during the onset and plateau of the disease : (A) *Dll4*^{ACKOP} mice and *control* mice induced with EAE were scored daily according to a widely-used 5-point scale (EAE scoring: 1 limp tail; 2 limp tail and weakness of hind limb; 3 limp tail and complete paralysis of hind legs; 4 limp tail, complete hind leg and partial front leg paralysis), nonlinear regression (Boltzmann sigmoidal). (*Dll4*^{ACKOP} *n* = 10, WT *n* = 9). (B) *Dll4*^{ACKOP} and *control* mice EAE peak score and (C) EAE average score during time of disability were quantified over the course of the disease. (D) *Dll4*^{ACKO} mice and *control* mice induced with EAE were scored daily on a standard 5-point scale, nonlinear regression (Boltzmann sigmoidal). (*Dll4*^{ACKO}C *n* = 15, WT *n* = 15). (E) *Dll4*^{ACKO}C and *control* mice EAE peak score and (F) EAE average score during time of disability were quantified over the course of the disease. (G-J) Spinal cord EAE lesions from *Dll4*^{ACKOP} mice, *Dll4*^{ACKO}C mice and littermate *controls* were harvested at 18 days post induction. (G) *Dll4*^{ACKOP} mice and *control* lesions and (I) *Dll4*^{ACKO}C mice and *control* lesions were immune-stained with an anti-MBP (in green) antibody. Nuclei were stained with DAPI (in blue). (H, J) MBP positive areas were quantified (H) (*Dll4*^{ACKOP} mice *n* = 5, WT *n* = 6), (J) (*Dll4*^{ACKO}C mice *n* = 6, WT *n* = 7)). Mann-Whitney U test.

Figure 3



Astrocyte-specific *Dll4* inactivation induces down-regulation of astrocyte reactivity under neuroinflammatory condition both *in vitro* and *in vivo*: **(A-C)** human Normal Astrocytes (NA) were seeded and cultured until 70% confluence. They were then transfected with a *CONTROL siRNA* (20 μ M) versus a *DLL4 siRNA* (20 μ M), starved for 12 hours and treated with IL-1 β 10ng/mL for 12h. The experiment was repeated 3 \times . **(A-C)** DLL4 expression was quantified by **(A)** qRT-PCR and **(B-C)** western blot. β -ACTIN was used as a reference. **(B)** Representative western blot for DLL4 and β -ACTIN protein expression level are shown. **(C)** DLL4 protein expression level was quantified. **(D-H)** Human Normal Astrocytes (NA) were seeded and cultured until 70% confluency. They were then treated as above and **(D-E)** JAG1, **(D, F)** NICD, **(D, G)** GFAP, and **(D, H)** cleaved CASP3 expression were quantified by western blot. β -ACTIN and CASP3 total were used as references. **(I)** Spinal cord sections were harvested from MOG₃₅₋₅₅ EAE induced *Dll4ACKO1* mice and *control* littermates at 18 days post induction. Transcriptional *RNA* profiling of spinal cord lysates was performed and a Heatmap generated showing the list of genes involved in astrogliosis whose expression is different in both groups. **(J-K)** VIM and LCN2 protein expression were then quantified by western blot in spinal cord lysates from 10 weeks old *C57BL/6* mice and EAE induced *Dll4ACKO1* mice, *Dll4ACKO2* mice and *control* littermates (at 18 days post induction). β -ACTIN was used as a reference. **(J-K)** Representative western blot for VIM, LCN2 and β -ACTIN in spinal cord lysates from **(J)** 10 weeks old *C57BL/6* mice and EAE induced *Dll4^{ACKOP}* mice versus *controls* and **(K)** EAE induced *Dll4^{ACKOC}* mice versus *controls* are shown. **(L-N)** Spinal cord EAE lesions from *Dll4^{ACKOP}* mice, *Dll4^{ACKOC}* mice and littermate *controls* were harvested at 18 days post induction and tissues were immune-stained with anti-GFAP (in green), anti-VIM (in red) and anti PODXL (in grey) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (in blue). **(L)** *Dll4^{ACKOC}* mice versus *control* tissues are shown. **(M)** GFAP+ and **(N)** VIM+/PODXL- areas were quantified (*Dll4^{ACKOP}* mice $n = 6$, WT $n = 6$), **(O)** (*Dll4^{ACKOC}* mice $n = 7$, WT $n = 7$). Mann-Whitney U test or Kruskal Wallis test.

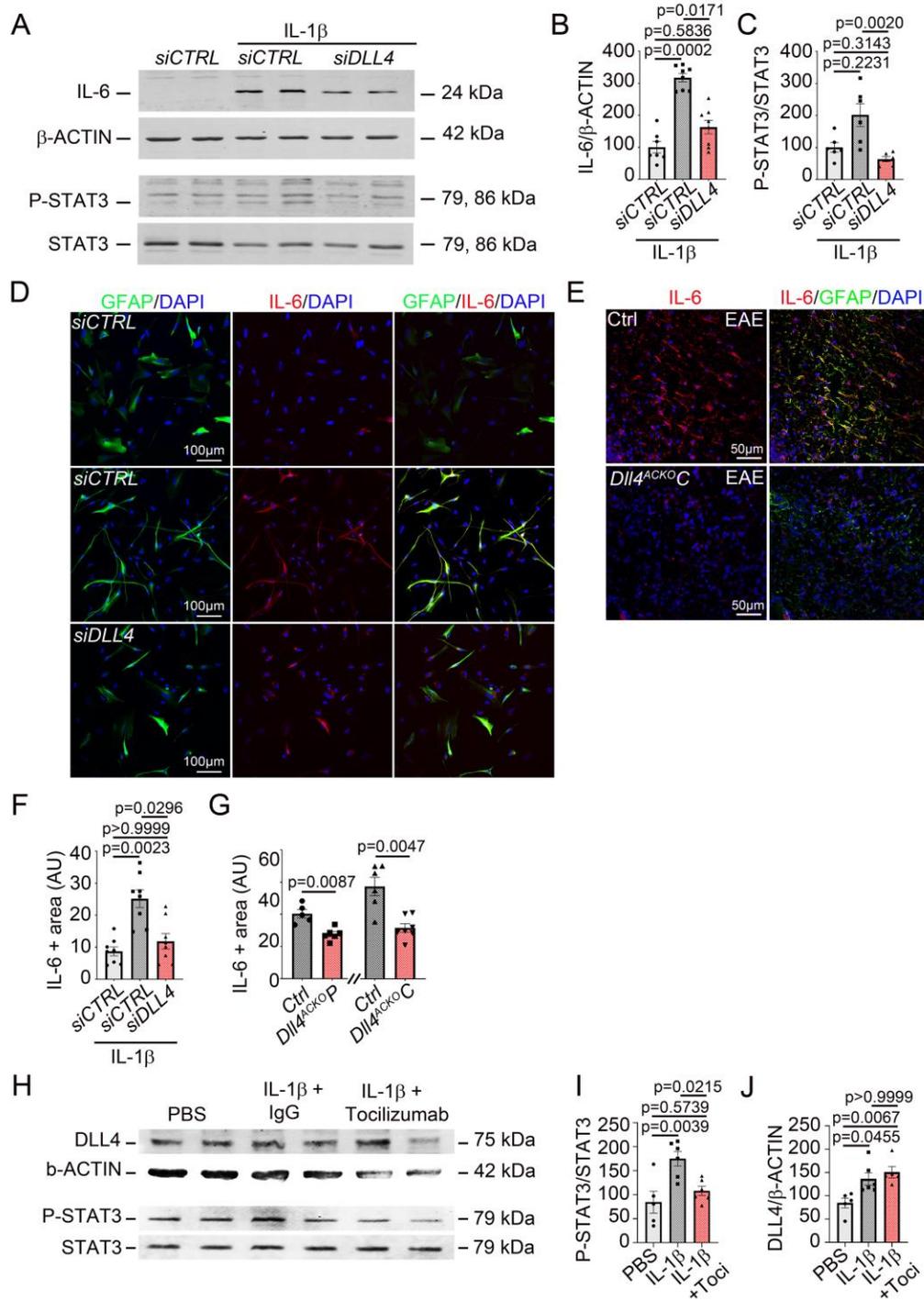
Figure 4



DLL4 expression depends on the phosphorylation of ERK 1/2 *in vitro* and drives NICD upregulation in astrocytes leading to the upregulation of IL-6 transcripts *via* a direct interaction with NICD: (A-D) Human Normal Astrocytes (NA) were seeded and cultured until confluence. They were then starved for 12 hours and treated with IL-1 β 10ng/mL for 24h with or without U0126 (10 μ M), a cell permeable inhibitor of MAPK (ERK 1/2). The experiment was

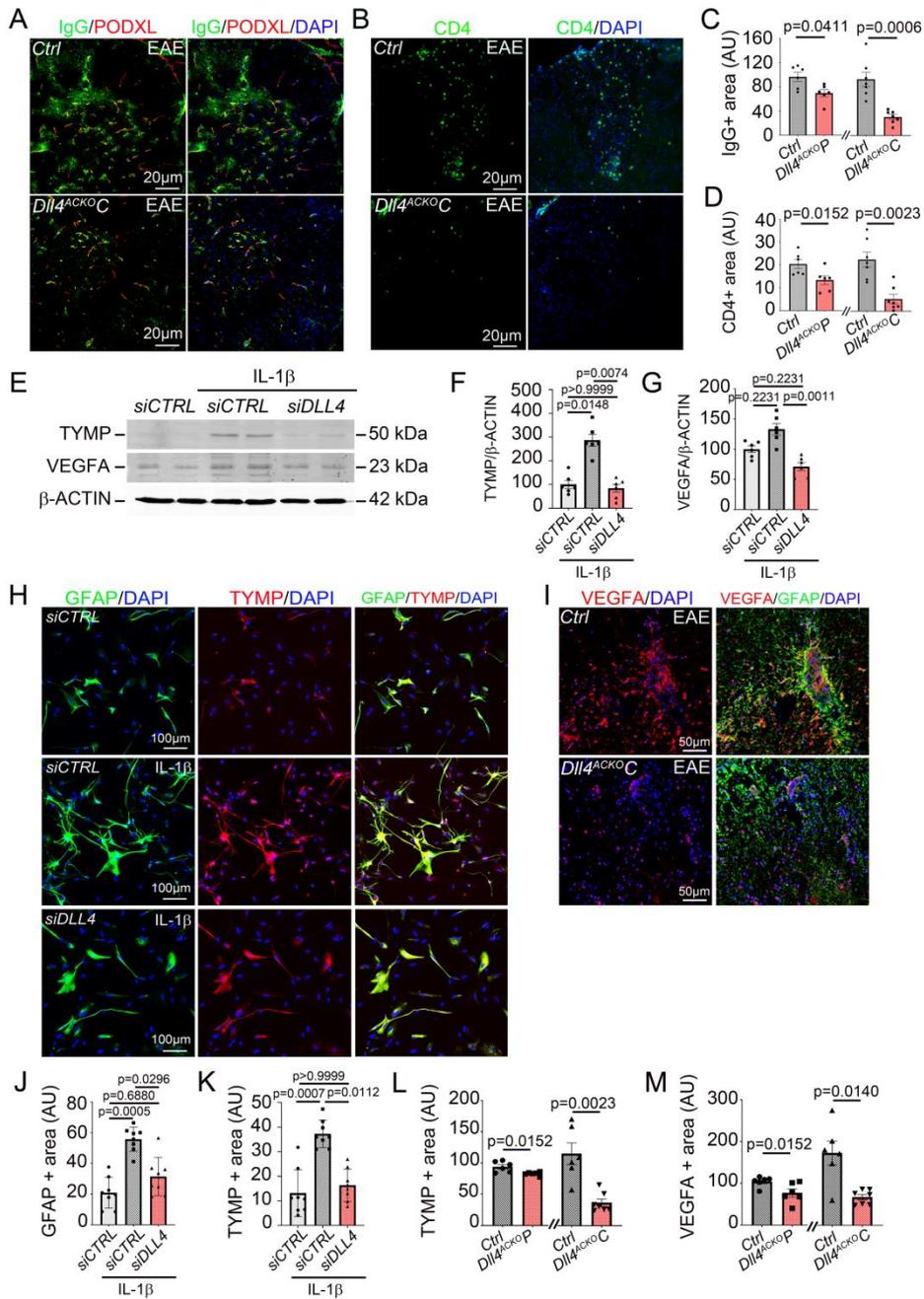
repeated 3×. **(A-B)** NICD, **(A, C)** DLL4 and **(A, D)** P-P42-44 expression were quantified by western blot. β -ACTIN and P42-44 total were used as references. **(E)** Human Normal Astrocytes (NA) were seeded and cultured until confluence. They were then starved for 12 hours and treated with IL-1 β 10ng/mL for 24h. A Chromatin Immuno-Precipitation (ChIP) was then performed on NA lysates using NICD antibody versus IgG controls to pull-down. *IL-6* DNA expression level was then quantified by PCR. **(F-J)** Human Normal Astrocytes (NA) were seeded and cultured until 70% confluence. They were then transduced with an empty lentivirus (6.21×10^8 PFU/mL) versus a *DLL4*-expressing lentivirus (4.14×10^8 PFU/mL) and harvested 24h post transduction. The experiment was repeated 3×. **(F)** *HES1*, **(G)** *HEY1*, **(H)** *HEY2*, **(I)** *IL-6* and **(J)** *DLL4* expression were quantified by qRT-PCR. β -ACTIN was used as a reference. Mann-Whitney U test.

Figure 5



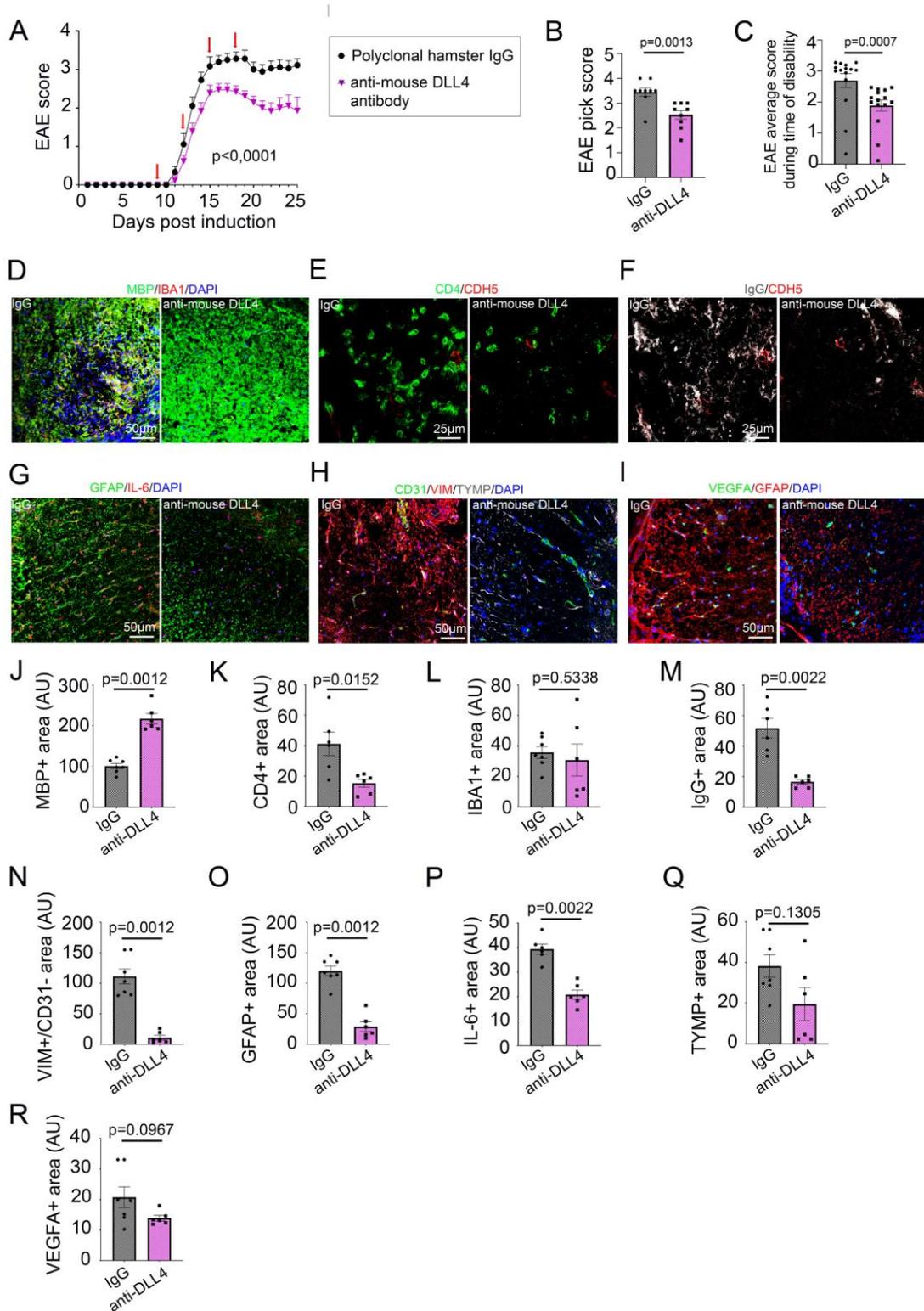
Astrocyte-specific *Dll4* inactivation induces down-regulation of astrocyte reactivity through the down-regulation of the IL-6-JAK/STAT pathway both *in vitro* and *in vivo*: **(A-C)** Human Normal Astrocytes (NA) were seeded and cultured until 70% confluence. They were then transfected with a *CONTROL siRNA* (20 μ M) versus a *DLL4 siRNA* (20 μ M), starved for 12 hours and treated with 1X PBS versus IL-1 β 10ng/mL for 12h. The experiment was repeated 3 \times . **(A-B)** IL-6 and **(A, C)** P-STAT3 expression were quantified by western blot. β -ACTIN and STAT3 total were used as references. **(D)** NA were cultured on Lab-Tek[®] until 70% of confluence. They were then treated as above. The experiment was repeated 3 \times . **(D)** GFAP (in green) and IL-6 (in red) localizations were evaluated by immuno-fluorescent staining. Nuclei were stained with DAPI (in blue). **(E)** Spinal cord EAE lesions from *Dll4*^{ACKO}P mice, *Dll4*^{ACKO}C mice and littermate *controls* were harvested at 18 days post induction. *Dll4*^{ACKO}C and *control* lesions were immunostained with anti-GFAP (in green) and anti-IL-6 (in red) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (in blue). *Dll4*^{ACKO}C and *control* tissues are shown. **(F-G)** IL-6 positive areas were quantified **(F)** in reactive NA and **(G)** in spinal cord lesions (*Dll4*^{ACKO}P mice $n = 6$, WT $n = 5$) (*Dll4*^{ACKO}C mice $n = 7$, WT $n = 6$). **(H-I)** NA were seeded and cultured until 70% confluence. They were then starved for 12 hours and treated with 1X PBS versus IL-1 β 10ng/mL with IgG or an anti-IL-6 receptor antibody Tocilizumab (1 μ g/mL) for 24h. The experiment was repeated 3 \times . **(H-I)** P-STAT3 and **(H, J)** DLL4 were quantified by western blot. STAT3 total and β -ACTIN were used as references. Mann-Whitney U test OR Kruskal Wallis test

Figure 6



Mice with astrocyte *Dll4* inactivation display resistance to increases in blood brain barrier permeability via decreases in VEGFA and TYMP secretion, protecting the parenchyma from inflammatory infiltrate in a model of multiple sclerosis: **(A-D)** Spinal cord EAE lesions from *Dll4^{ACKOP}* mice, *Dll4^{ACKOC}* mice and littermate *controls* were harvested at 18 days post induction. **(A-B)** *Dll4^{ACKO}* and *control* lesions were immune-stained with **(A)** anti IgG (in green) and anti-PODXL (in red) antibodies and **(B)** anti CD4 (in green) and anti LAM (in red) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (in blue). *Dll4^{ACKOC}* and *control* tissues are shown. **(A, C)** IgG and **(A, D)** CD4 positive areas were quantified (*Dll4^{ACKOP}* mice *n* = 6, WT *n* = 5) (*Dll4^{ACKOC}* mice *n* = 7, WT *n* = 7). **(E-G)** Human Normal Astrocytes (NA) were seeded and cultured until 70% confluence. They were then transfected with a *CONTROL siRNA* (20 μ M) versus a *DLL4 siRNA* (20 μ M), starved for 12 hours and treated with 1X PBS versus IL-1 β 10ng/mL for 12h. The experiment was repeated 3 \times . **(E-F)** TYMP and **(E, G)** VEGFA expression were quantified by western blot. β -ACTIN was used as a reference. **(H)** Human Normal Astrocytes (NA) were cultured on Lab-Tek[®] until 70% of confluence. They were then treated as above. The experiment was repeated 3 \times . GFAP (in green) and TYMP (in red) localizations were evaluated by immuno-fluorescent staining. Nuclei were stained with DAPI (in blue). **(I)** Spinal cord EAE lesions from *Dll4^{ACKOP}* mice, *Dll4^{ACKOC}* mice and littermate *controls* were harvested at 18 days post induction. *Dll4^{ACKO}* and *control* lesions were immune-stained with anti-GFAP (in green) and anti-VEGFA (in red) or anti-TYMP (in red) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (in blue). Representative GFAP/VEGFA staining of *Dll4^{ACKOC}* and *control* lesions is shown. **(J)** GFAP and **(K)** TYMP positive areas were quantified in reactive NA in cultures and **(L)** TYMP and **(M)** VEGFA positive areas were quantified in spinal cord lesions (*Dll4^{ACKOP}* mice *n* = 6, WT *n* = 6) (*Dll4^{ACKOC}* mice *n* = 7, WT *n* = 6). Mann-Whitney U test or Kruskal Wallis test

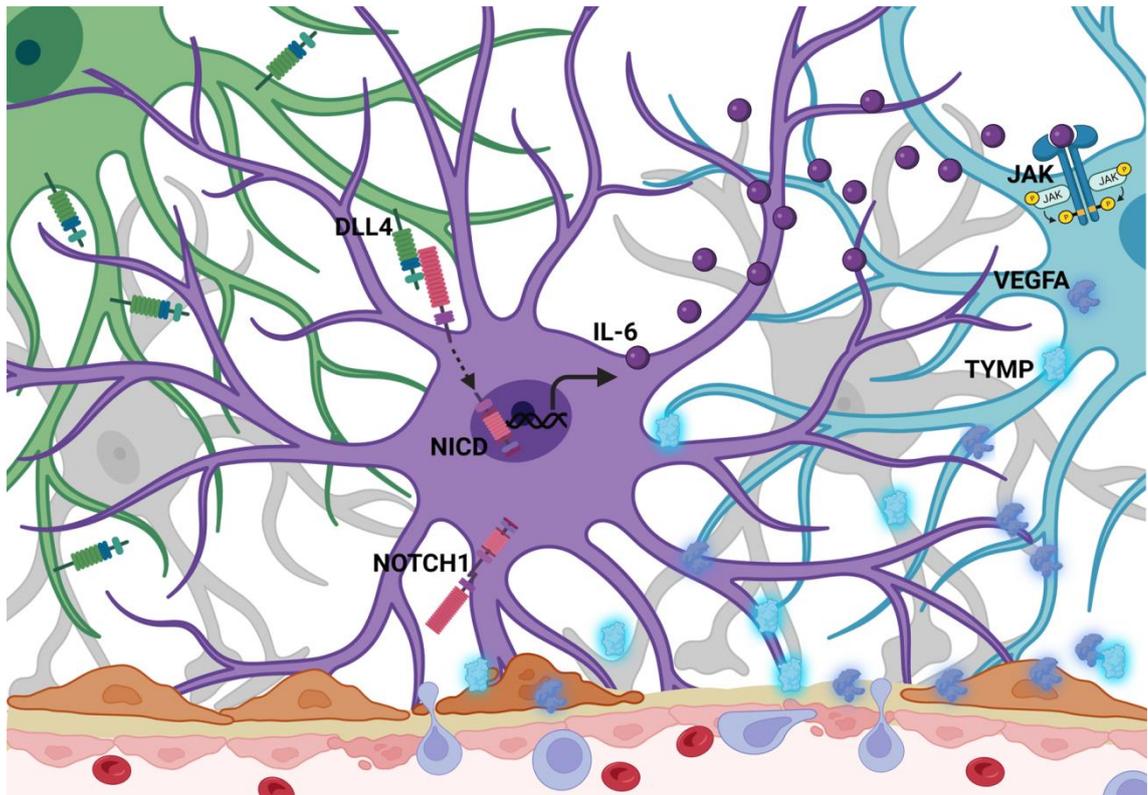
Figure 7



Blockade of DLL4 protects against blood brain barrier opening and paralysis in EAE: (A) Mean clinical scores are shown from mice (10-week-old female *C57BL/6*, 9 per group) sensitized with EAE MOG_{35–55}, then from onset of disease (8 days post-induction) treated every 3 days for 11

days (red arrows) with an inVivoMab anti-mouse DLL4 antibody (500 µg/mouse/d) or an inVivoMab polyclonal Armenian hamster IgG (500 µg/mouse/d) in the control group. Neurological deficit was scored (from day 1 to day 25 post sensitization) daily for each animal according to a widely-used 5-point scale (EAE scoring: 1 limp tail; 2 limp tail and weakness of hind limb; 3 limp tail and complete paralysis of hind legs; 4 limp tail, complete hind leg and partial front leg paralysis), nonlinear regression (Boltzmann sigmoidal). **(B)** For each group of mice, EAE peak score and **(C)** EAE average score during time of disability was quantified over the course of the disease. **(D-H)** Cortical lesions were immuno-stained with **(D)** anti MBP (in green) and anti-IBA1 (in red) antibodies, **(E)** anti-CD4 (in green) and anti-CDH5 (in red) antibodies, **(F)** anti-IgG (in grey) and anti-CDH5 (in red) antibodies, **(G)** anti-GFAP (in green) and anti-IL-6 (in red) antibodies, **(H)** anti-CD31 (in green), anti-VIM (in red) and anti-TYMP (in grey) antibodies and **(I)** anti-VEGFA (in green) and anti-GFAP (in red) antibodies. **(D-I)** Nuclei were stained with DAPI (in blue). **(J)** MBP, **(K)** CD4, **(L)** IBA1, **(M)** IgG, **(N)** VIM+/CD31-, **(O)** GFAP, **(P)** IL-6, **(Q)** TYMP and **(R)** VEGFA positive areas were quantified. Mann-Whitney U test.

Figure 8



Summary scheme of the role of DLL4-NOTCH1 signaling on astrogliosis and blood brain barrier opening during neuroinflammation. In multiple sclerosis, resident and infiltrating immune cells produce cytokines that activate astrocytes. This astrogliosis leads to overexpression of DLL4 in astrocytes; DLL4 interacts with its membrane receptor NOTCH1 on the surface of a neighboring astrocytes. This leads to translocation of the intracellular active form of NOTCH1 (NICD) into the nucleus where it acts as a transcription factor to stimulate expression of the pro-inflammatory cytokine IL-6. As a result, IL-6 binds to its receptor JAK which leads to phosphorylation of STAT3, a pathway known to stimulate astrogliosis. In response to astrogliosis induced by the DLL4-NOTCH1 pathway and the NICD-IL-6-JAK/STAT signaling cascade, astrocytes secrete pro-permeability factors (TYMP and VEGFA) that participate to blood brain barrier opening and inflammatory infiltration of the parenchyma. Thus, an astrogliosis amplification loop led by DLL4-NOTCH1 is established and actively participates in the pathophysiology of neuroinflammation.

Tables

Table 1: List of primers used for reverse transcription (RT) quantitative polymer chain reaction (qPCR)

<i>mDll4</i>	F	5' -TGGCAATGTCTCCACGCCGG- 3'
	R	5' -TGTTCCGCAAATCTTACCCACAGCA- 3'
<i>mHey1</i>	F	5' -TCCATGTCCCCAACGACATC- 3'
	R	5' -GCAGTGTGCAGCATTTCAG- 3'
<i>mJag1</i>	F	5' -AGTGCATGTGTCCCGGTGGC- 3'
	R	5' -CCGTCCACACAGGTCCCGCTA- 3'
<i>mVegfC</i>	F	5' -TTTAAGGAAGCACTTCTGTGTGT- 3'
	R	5' -GTAAAAACAACTTTTCCCTAATTC 3'
<i>mβ-actin</i>	F	5' - GATCAAGATCATTGCTCCTCCTG- 3'
	R	5' -AGGGTGTAACGCAGCTCA- 3'
<i>hDLL4</i>	F	5' -CCTTCGCTGTCCGGGACGACA- 3'
	R	5' -TCTGACCCACAGCTAGGGAGCC- 3'
<i>hHES1</i>	F	5' -CACCTCCGGAACCTGCAGCG- 3'
	R	5'-CAGTTGGCCAGGTGGCCGAG-3'
<i>hHEY1</i>	F	5' -TGAGAAGGCTGGTACCCAGTGCT- 3'
	R	5' -TCCATAGCAAGGGCGTGCGC- 3'
<i>hHEY2</i>	F	5' -AGATGCTTCAGGCAACAGGGGGT- 3'
	R	5' -GGAGCTCAGGTACCGCGCAA- 3'
<i>hIL-6</i>	F	5' -TCTTGGGACTGATGCTGGTGAC- 3'

	R	5' -TGAAGGACTCTGGCTTTGTCTTTC- 3'
<i>hTYMP</i>	F	5' - GGAAGTTCCGCGTGTCC- 3'
	R	5' - GACCGTAGGGTTCAGGGTTC- 3'
<i>hβ-ACTIN</i>	F	5' -CACACAGGGGAGGTGATAGC- 3'
	R	5' -GACCAAAAGCCTTCATACATCTCA- 3'

F forward, R reverse

β-actin was used as the household gene

Supplementary Materials for

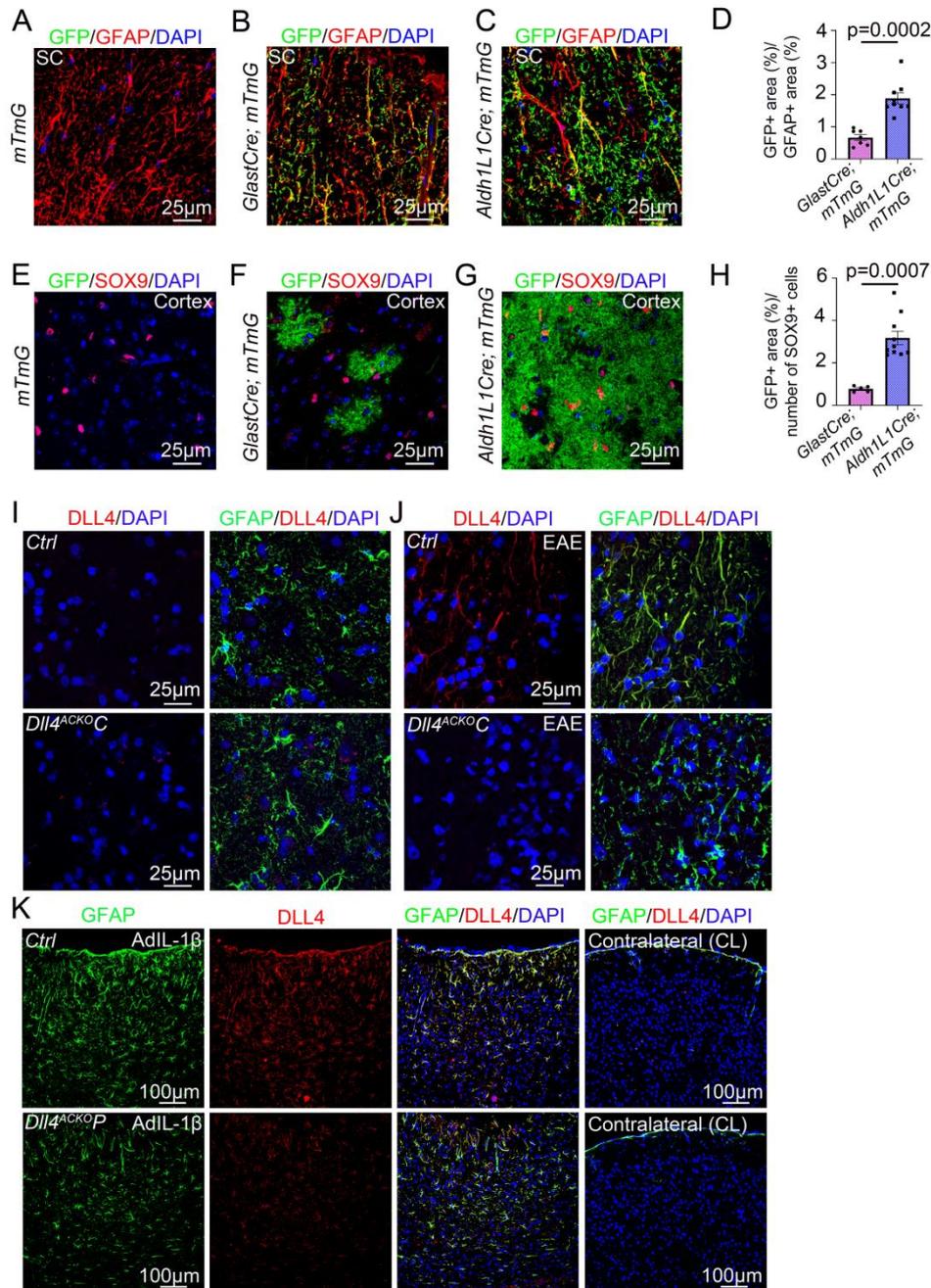
Juxtacrine DLL4-NOTCH1 signaling between astrocytes drives neuroinflammation via the IL-6-STAT3 axis

For papers with only two authors: Paste the full name of the first and second author.

Pierre Mora *et al.*

*Corresponding author. Email: candice.chapouly@inserm.fr

Fig. S1.



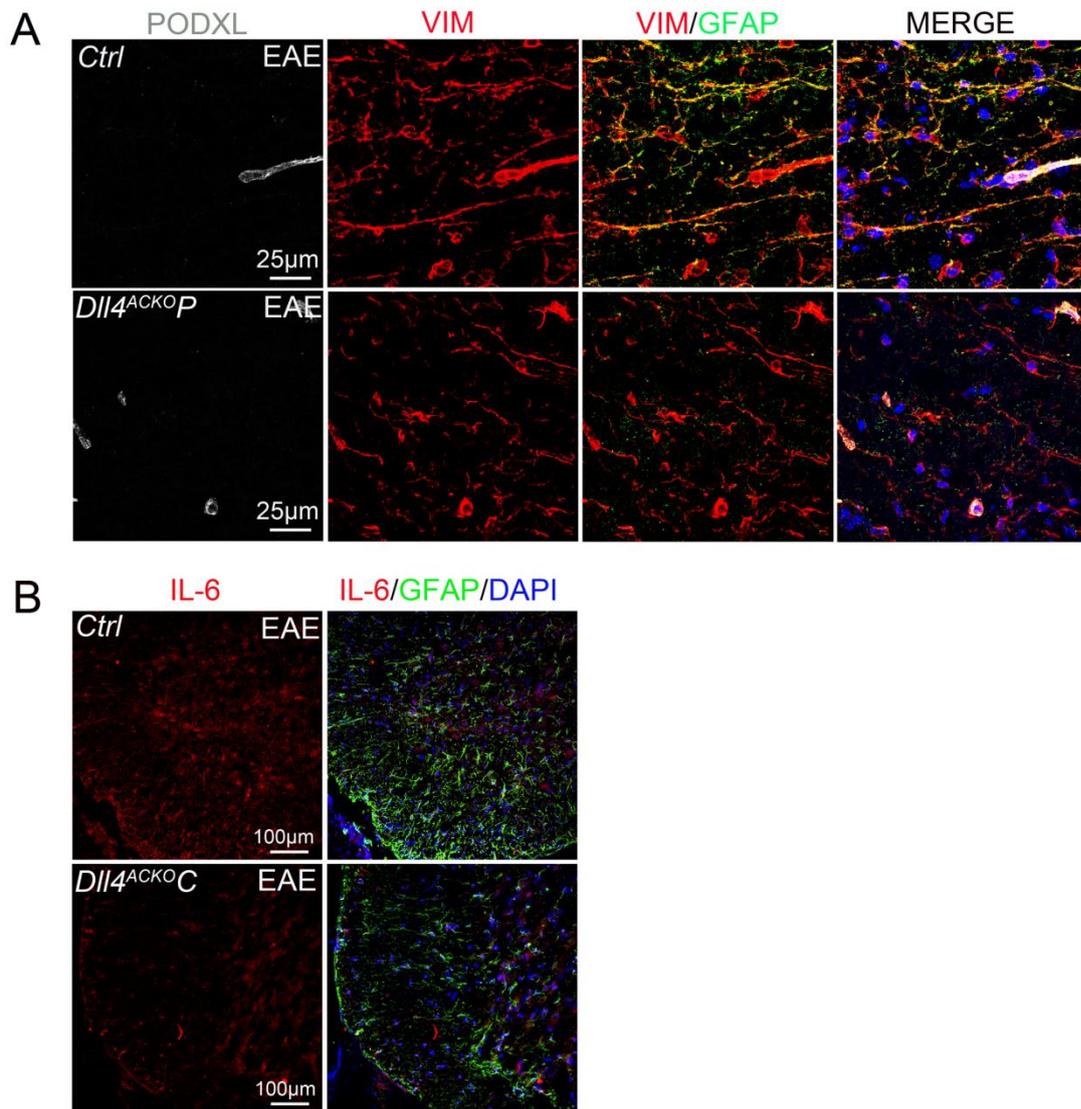
Related to Figure 2: *Glast-Cre^{ERT2}* recombinase activation is specific but moderate in spinal cord astrocytes and cortical astrocytes whereas *Aldh1L1-Cre^{ERT2}* recombination is specific and strong in both spinal cord and cortical astrocytes: (A-D) spinal cord and (E-H) cortical sections were harvested from *GlastCre^{ERT2}*, *Rosa26^{mTmG}* mice, *Aldh1L1Cre1^{ERT2}*, *Rosa^{mTmG}* mice and control littermates. They were then immuno-stained with (A-C) anti-GFP (in green) and anti-GFAP (in red) antibodies or (E-G) anti-GFP (in green) and anti-SOX9 (in red) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (in blue). (D) The

ratio of GFP+ area/GFAP+ area was then quantified in spinal cord sections from *GlastCre^{ERT2}*, *Rosa26^{mTmG}* mice and *Aldh1LCre1^{ERT2}*, *Rosa^{mTmG}* mice. (H) The ratio of GFP+ area/number of SOX9+ cells was then quantified in cortical sections from *GlastCre^{ERT2}*, *Rosa26^{mTmG}* mice and *Aldh1LCre1^{ERT2}*, *Rosa^{mTmG}* mice

Related to Figure 7: *Dll4* astrocyte knockdown is efficient under chronic and acute

neuroinflammatory conditions: (I-J) Spinal cord sections were harvested from **(I)** healthy versus **(J)** MOG₃₅₋₅₅ EAE-sensitized *Dll4^{ACKO}*C mice and littermate *controls* (18 days post induction) and immunostained with anti-GFAP (in green) and anti-DLL4 (in red) antibodies. **(K)** Cerebral cortices of 10-week-old *Dll4^{ACKO}*P mice and *control* littermates were harvested 7 days following stereotactic microinjection of AdIL-1 (10⁷ PFU). Cortical lesions and contralateral were immuno-stained with anti-GFAP (in green) and anti-DLL4 (in red) antibodies. Mann-Whitney U test.

Fig. S2.



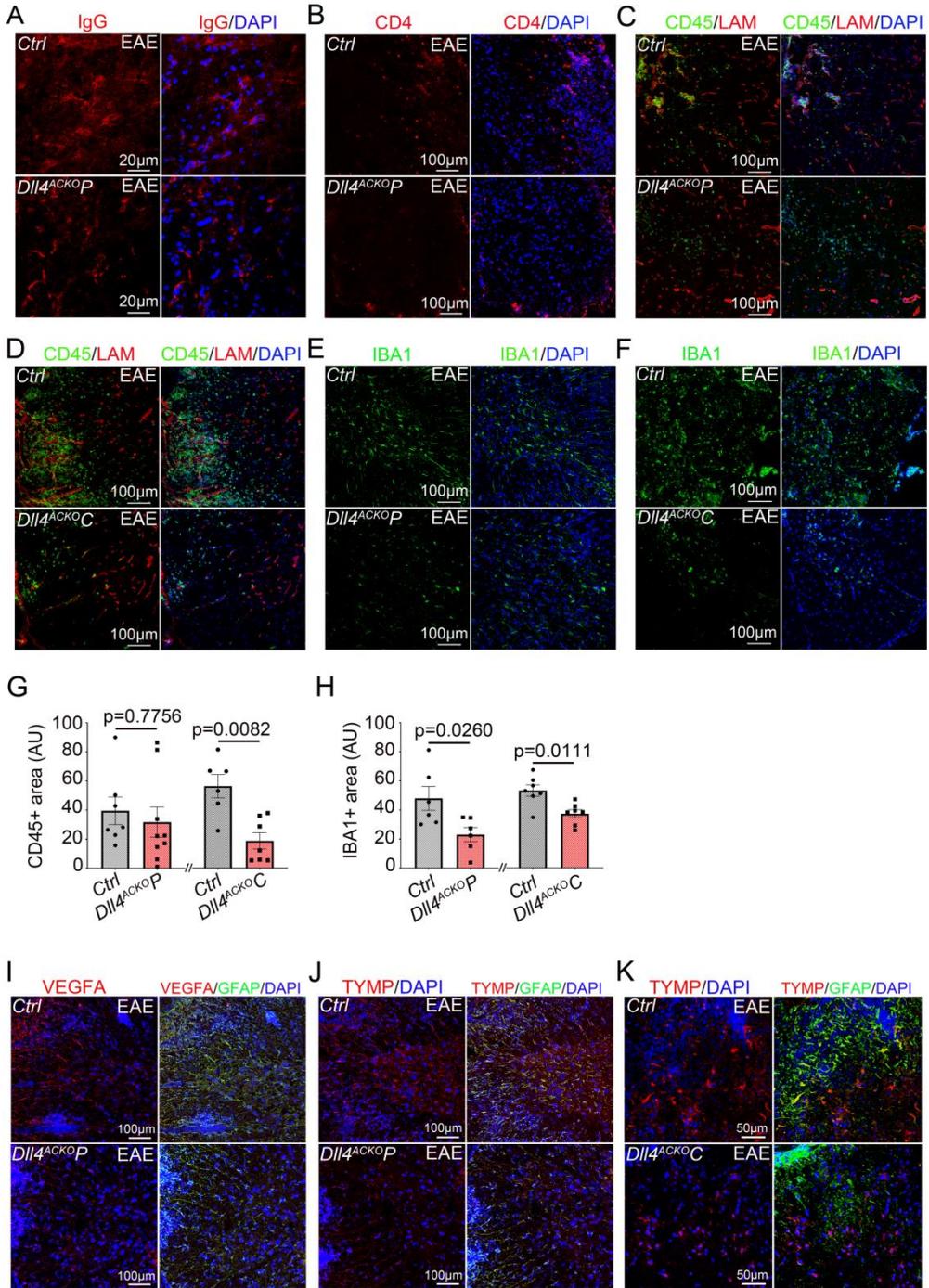
Related to Figure 3: *Dll4^{ACKO}P* mice display less expression of GFAP and VIM under EAE condition.

(A) Spinal cord EAE lesions from *Dll4^{ACKO}P* mice and littermate *controls* were harvested at 18 days post induction and tissues were immune-stained with anti-GFAP (in green), anti-VIM (in red) and anti-PODXL (in grey) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (in blue). *Dll4^{ACKO}P* versus control lesions are shown.

Related to Figure 5: *Dll4^{ACKO}P* mice display less expression of IL-6 under EAE condition. (B)

Spinal cord EAE lesions from *Dll4^{ACKO}P* mice and littermate *controls* were harvested at 18 days post induction. *Dll4^{ACKO}P* and *control* lesions were immune-stained with anti-GFAP (in green) and anti-IL-6 (in red) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (in blue).

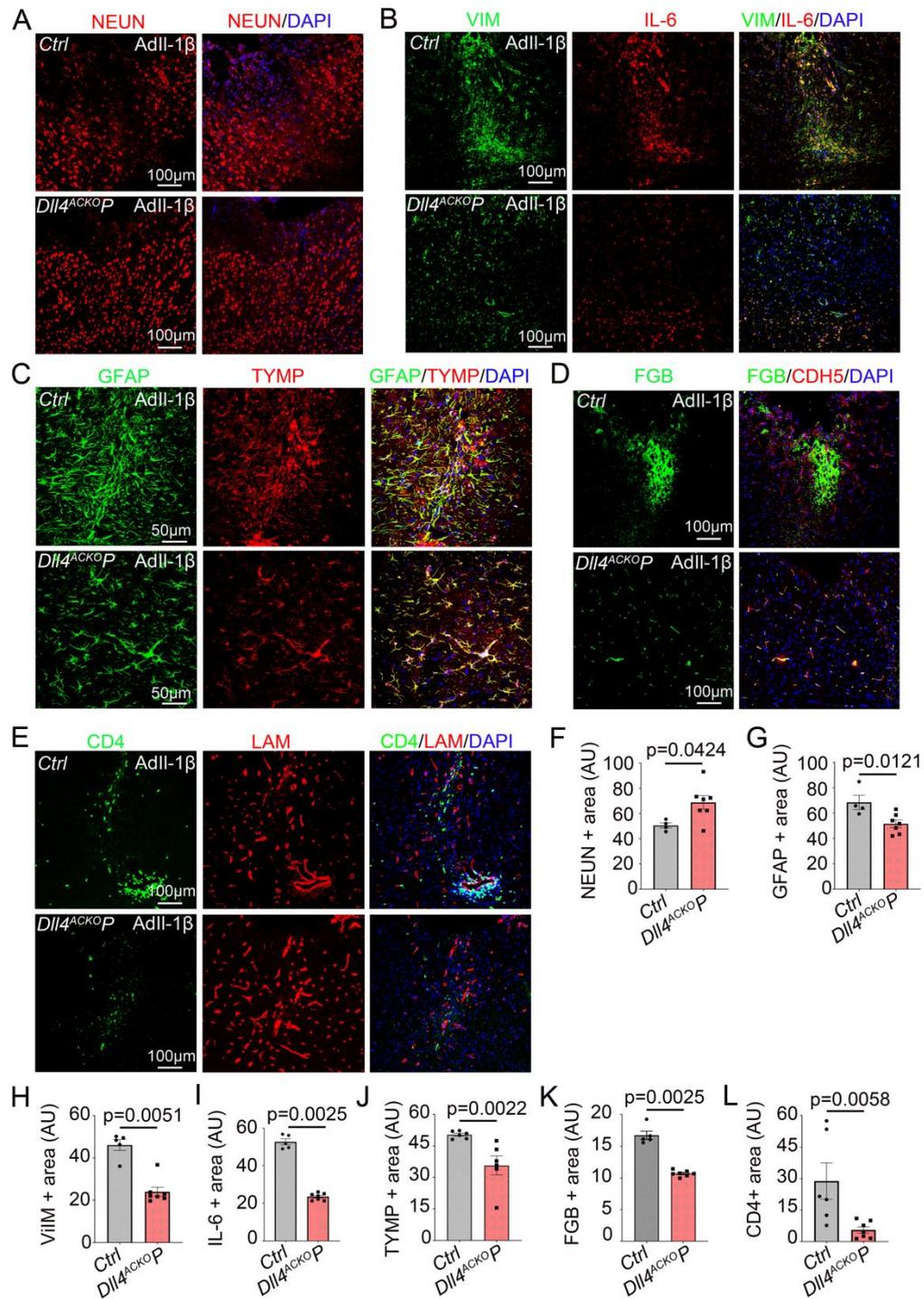
Fig. S3.



Related to Figure 6: *Dll4^{ACKO}* mice display less inflammatory infiltration under EAE condition. (A-B) Spinal cord EAE lesions from *Dll4^{ACKO}P* mice and littermate *controls* were harvested at 18 days post induction. *Dll4^{ACKO}P* and *control* lesions were immune-stained with **(A)** an anti IgG (in red) antibody and **(B)** an anti CD4 (in red) antibody. Nuclei were stained with DAPI (in blue). **(C-F):** Spinal cord EAE lesions from *Dll4^{ACKO}C* mice, *Dll4^{ACKO}P* mice and littermate *controls* were harvested at 18 days post induction. **(C-F)** *Dll4^{ACKO}P* and *control* lesions were immune-stained with **(C-D)** anti-CD45 (in green) and anti-LAM (in red) antibodies and **(E-F)** an anti IBA1 (in green) antibody. Nuclei were stained with DAPI (in blue). **(G-H)** CD45 and IBA1 positive areas were quantified (*Dll4^{ACKO}P* mice n = 6-7, WT n = 6-7) (*Dll4^{ACKO}C* mice n = 7, WT n = 6-7).

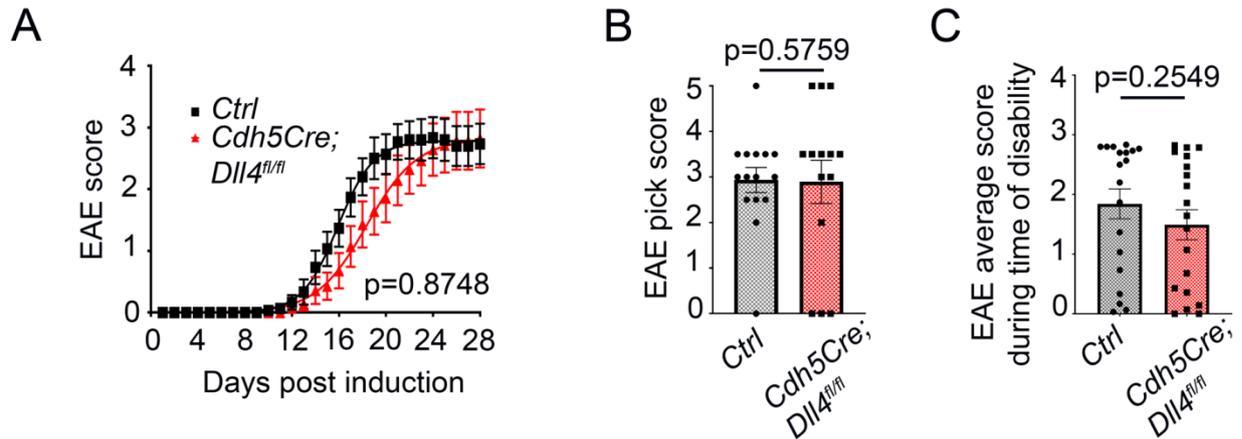
Related to Figure 6: VEGFA and TYMP are downregulated in *Dll4^{ACKO}P* mice and TYMP is downregulated in *Dll4^{ACKO}C* mice when compared to *controls*. (I-J) Spinal cord EAE lesions from *Dll4^{ACKO}P* mice and littermate *controls* were harvested at 18 days post induction. *Dll4^{ACKO}P* and *control* lesions were immune-stained with anti-GFAP (in green) and **(I)** anti-VEGFA (in red) or **(J)** anti-TYMP (in red) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (in blue). **(K)** Spinal cord EAE lesions from *Dll4^{ACKO}C* mice and littermate *controls* were harvested at 18 days post induction. *Dll4^{ACKO}C* and *control* lesions were immune-stained with an anti-GFAP (in green) and anti-TYMP (in red) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (in blue). Mann-Whitney U test.

Fig. S4.



Conditional astrocyte *Dll4* inactivation reduces the size of inflammatory CNS lesions in a model of acute neuroinflammation: (A-L) Cerebral cortices of 10-week-old *Dll4*^{ACKO} mice and control littermates were harvested 7 days following stereotactic microinjection of AdIL-1 β (10⁷ PFU). Cortical lesions were immuno-stained with **(A)** an anti-NEUN antibody, **(B)** anti-VIM (in red) and anti-IL-6 (in green) antibodies, **(C)** anti-GFAP (in green) and anti-TYMP (in red) antibodies, **(D)** anti-FGB (in green) and anti-CDH5 (in red) antibodies, and **(E)** anti-CD4 (in green) and anti-LAM (in red) antibodies. **(A-E)** Nuclei were stained with DAPI (in blue). **(F)** NEUN, (G) GFAP, (H) VIM, (I) IL-6, (J) TYMP, (K) FGB and (L) CD4 positive areas were quantified (*Dll4*^{ACKO} mice *n* = 6 to 7, WT *n* = 5 to 6). Mann-Whitney U test.

Fig. S5.



Related to Figure 8: Mice with endothelial specific *Dll4* inactivation display equivalent disability to control littermates in a model of multiple sclerosis: (A) *Cdh5-Cre^{ERT2}, Dll4^{Flox/Flox}* mice and control mice induced with EAE were scored daily according to a widely-used 5-point scale (EAE scoring: 1 limp tail; 2 limp tail and weakness of hind limb; 3 limp tail and complete paralysis of hind legs; 4 limp tail, complete hind leg and partial front leg paralysis), nonlinear regression (Boltzmann sigmoidal). (*Cdh5-Cre^{ERT2}, Dll4^{Flox/Flox}* $n = 14$, WT $n = 15$). **(B)** *Cdh5-Cre^{ERT2}, Dll4^{Flox/Flox}* and control mice EAE peak score and **(C)** EAE average score during time of disability were quantified other the course of the disease.

Discussion

Ce travail de thèse met en évidence, pour la première fois, le rôle de la signalisation astrocytaire juxtacrine DLL4-NOTCH1 comme régulateur clé de l'astrogliose et de la perméabilisation de la BHE dans deux modèles de maladie inflammatoire du SNC.

Tout d'abord, nous démontrons que l'expression astrocytaire de DLL4 est stimulée pendant la neuro-inflammation, à la fois chez la souris et chez l'homme. Nous observons que cette augmentation est corrélée à une augmentation de l'astrogliose, de la perméabilisation de la BHE et de l'infiltration inflammatoire du parenchyme au cours de la pathologie. Nous identifions ensuite la signalisation juxtacrine DLL4-NOTCH1 dans les astrocytes comme participant au contrôle direct des niveaux transcriptionnels d'IL6 astrocytaire avec pour conséquence la phosphorylation de STAT3 qui stimule l'astrogliose. Cette réactivité astrocytaire est alors responsable de la sécrétion de facteurs de perméabilisation et de la déstabilisation de la BHE qui en découle. Enfin, nous révélons que cibler DLL4 avec un anticorps bloquant exogène améliore les symptômes de l'EAE chez la souris.

Ensemble, ces données identifient l'axe DLL4-NOTCH1 comme un acteur clé de l'astrogliose pendant la neuro-inflammation via l'activation de la cascade signalétique IL6-STAT3-TYMP/VEGFA conduisant à la perturbation de l'UNV et à l'aggravation de la pathologie.

Autres modèles de neuro-inflammation

La voie NOTCH est activée dans les astrocytes lors du développement alors que NOTCH1 n'est exprimé qu'à bas bruit de manière physiologique chez l'adulte. La réactivation et la participation de NOTCH1 au processus d'astrogliose et à la rupture consécutive de la BHE sont des phénomènes physiopathologiques déjà identifiés qui jouent un rôle majeur dans de nombreux modèles de maladies (SLA, ischémie, lésion cérébrale, amyotrophie spinale, EAE, hypoxie, stress oxydatifs) avec des effets délétères sur la neurogénèse, la perméabilisation de la BHE et l'infiltration inflammatoire.

Dans cette thèse, nous avons mis en évidence que l'activation de la voie NOTCH dans un modèle d'EAE chez la souris et dans des lésions corticales humaines de SEP était due à une augmentation de l'expression d'un de ses ligands, DLL4, via une communication juxtacrine entre des astrocytes voisins.

Au vu de ces résultats, il pourrait être intéressant d'examiner l'expression astrocytaire de DLL4 dans d'autres pathologies du SNC, notamment la maladie d'Alzheimer, les AVC ou la SLA, dans lesquelles NOTCH1 a déjà été identifié comme modulé par d'autres groupes de recherche (S.-Y. Wang et al. 2015;

C. Liu et al. 2020; X. Ma et al. 2017; Nonneman et al. 2018; Gómez-Pinedo et al. 2019; Arumugam et al. 2006; Cheng et al. 2014; Shimada et al. 2011; Qian et al. 2019; Ribeiro, Delgado-García, et Porcionatto 2021; Ohuchi et al. 2019; X. Liu et al. 2021), afin de déterminer si l'astrogliose réactive médiée par l'axe DLL4-NOTCH1 est un mécanisme spécifique de l'EAE et de la SEP ou un mécanisme plus général, présents dans d'autres maladies chroniques du SNC.

IL6 et NOTCH

Les astrocytes sont une source primaire d'IL6 dans le SNC et il a été démontré que la signalisation d'IL6 active des voies en aval, notamment JAK2 / STAT3, dans diverses conditions, y compris neuro-inflammatoires (Maimone, Guazzi, et Annunziata 1997; Schönrock, Gawlowski, et Brück 2000; Okuda et al. 1998). Les programmes transcriptionnels médiés par STAT3 agissent alors comme l'une des voies induisant l'astrogliose (Wanner et al. 2013, 3; Escartin et al. 2021).

NICD agit comme cofacteur activateur de RBPJ, un facteur de transcription majeur de la voie NOTCH. La régulation de la transcription d'*IL6* par RBPJ, en se liant à une région promotrice du gène codant pour IL6, a été mise en évidence dans certaines cellules du système immunitaire (Wongchana et Palaga 2012). Dans notre travail, nous avons démontré pour la première fois, grâce à une immunoprécipitation de la chromatine, que le NICD libéré suite à l'interaction juxtacrine astrocytaire DLL4-NOTCH1, participe au contrôle direct des niveaux de transcription d'*IL6* dans les astrocytes réactifs en condition inflammatoire.

In vitro, l'inhibition de DLL4 dans les astrocytes provoque une réduction de la production d'IL6 sans que celle-ci ne revienne à l'état basal, *i.e.* dans des astrocytes non réactifs. Il apparaît ainsi probable que la production d'IL6 dans les astrocytes ne soit pas uniquement due à une activation par NICD mais plutôt que NICD agisse comme cofacteur activateur.

Ainsi, l'identification d'autres partenaires de l'activation transcriptionnelle d'*IL6* pourrait permettre une inhibition plus efficace de sa production en condition d'astrogliose.

Communication intercellulaire

Les interactions des astrocytes avec les autres éléments de l'UNV sont nombreuses et complexes. Cependant, les astrocytes ne sont pas en contact direct avec tous les éléments cellulaires qui composent l'UNV. Par exemple, les pieds astrocytaires sont séparés des cellules endothéliales par les protéines matricielles et les cellules murales. Nous avons donc voulu savoir si les astrocytes réactifs peuvent produire une forme sécrétée de DLL4. De façon intéressante, nous n'avons pas pu mettre en évidence la sécrétion d'une forme soluble de DLL4 dans le milieu de culture d'astrocytes primaires humains traités par IL1B. De plus, malgré le fait que la production de vésicules extracellulaires par les

astrocytes réactifs ait été démontrée dans la littérature (X. Wang et al. 2023), nous n'avons pas non plus réussi à mettre en évidence la production d'exosomes par les astrocytes traitées par IL1B malgré l'utilisation de différentes techniques d'isolement et / ou de filtrations. Parmi les explications possibles à nos résultats, l'utilisation d'astrocytes primaires ainsi que les conditions de culture ou le seuil de sensibilité des techniques appliquées pour la détection des exosomes peuvent être critiqués.

Ces résultats nous ont conduits à conclure que les effets de l'axe DLL4-NOTCH1 observés dans notre étude sont médiés uniquement par une communication juxtacrine entre deux astrocytes activés en contact direct l'un avec l'autre.

NOTCH et angiogénèse

Chez les vertébrés, 4 récepteurs NOTCH différents ont été identifiés et au niveau de la BHE, NOTCH1 (T. Liu et al. 2023) et NOTCH4 (Nielsen et al. 2023) sont exprimés par les cellules endothéliales tandis que NOTCH3 est exprimé par les cellules murales, ou péricytes (Machuca-Parra et al. 2017). Il est important de noter que DLL4 a déjà été identifié comme un régulateur critique de l'angiogénèse via la signalisation NOTCH médiée par DLL4 dans les cellules endothéliales, qui est une voie clé pour le développement vasculaire (Lu et al. 2021; Margadant 2020). En neuropathologie, on observe deux processus vasculaires interconnectés et interdépendants : la rupture de la BHE (entraînant une infiltration inflammatoire parenchymateuse) et une angiogénèse anormale. Notamment, dans la SEP, des études indiquent que l'angiogénèse intervient précocement et qu'elle a un effet soit bénéfique soit néfaste (arguments contradictoires dans la littérature) sur la récupération clinique. Nous avons testé de manière approfondie si la régulation astrocytaire de DLL4 pendant la neuro-inflammation

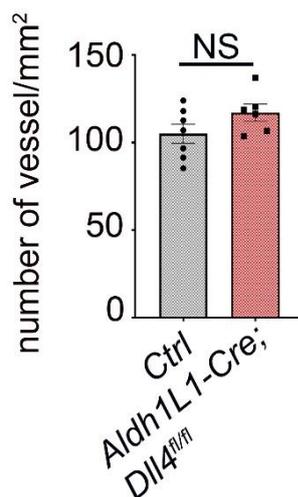


Figure 30 Comparaison du nombre de vaisseaux dans la moelle épinière de souris DLL4^{ACKOC} versus contrôle

conduit à une angiogénèse anormale mais nous n'avons trouvé aucune différence concernant la densité des vaisseaux sanguins ou la couverture vasculaire par les cellules murales chez les souris déficientes pour Dll4 dans les astrocytes par rapport aux témoins au 18ème jour après l'induction de l'EAE. L'ensemble de nos résultats suggèrent que l'augmentation de DLL4 dans les astrocytes activés entraîne la rupture de la BHE endothéliale plutôt que l'angiogénèse, via la sécrétion des facteurs de pro-perméabilité TYMP et VEGFA (Chapouly et al. 2015).

Il reste à déterminer si, au cours de la neuro-inflammation, le DLL4 astrocytaire s'engage avec les récepteurs NOTCH à la surface d'autres types cellulaires de l'UNV via une communication juxtacrine, notamment les cellules murales ou péricytes, les processus microgliaux et surtout les cellules

immunitaires infiltrées dans les espaces perivasculaires. En effet, une fois que les cellules immunitaires ont pénétré la BHE, elles s'accumulent dans les espaces périvasculaires, des régions situées entre la membrane basale de la paroi des cellules endothéliales et la membrane basale parenchymateuse qui jouxte les extrémités des astrocytes (Engelhardt et Coisne 2011). L'étude de l'interaction potentielle du ligand DLL4 astrocytaire avec les récepteurs NOTCH des cellules inflammatoires infiltrées nous intéressent tout particulièrement parce que la littérature montre que la signalisation NOTCH peut influencer la différenciation et la fonction des lymphocytes T (Tanigaki et Honjo 2007). Les cellules T régulatrices (Treg) expriment différemment NOTCH3 et NOTCH4 et la différenciation et l'expansion des Tregs seraient induites par l'engagement de JAGGED (Yvon et al. 2003) et l'activation de NOTCH3 (Anastasi et al. 2003). En outre, de nouvelles propriétés émergentes de la voie de signalisation DLL4-NOTCH ont récemment été identifiées en pathologie, notamment son rôle dans le contrôle de l'équilibre CD4+/CD8+, Th17/Treg dans les modèles d'uvéite auto-immune expérimentale et d'EAE. En comparant des souris DLL4^{ACKO} et des témoins, nous avons constaté que le DLL4 astrocytaire favorise l'entrée des cellules T dans le parenchyme du SNC dans deux modèles *in vivo* d'inflammation du SNC (EAE et injection stéréotaxique corticale d'IL1B) et que la délétion astrocytaire de DLL4 réduit l'incapacité clinique et les dommages histopathologiques au cours de l'EAE. Collectivement, ces résultats suggèrent que le DLL4 astrocytaire ne contrôle pas seulement l'astrogliose mais peut également influencer l'infiltration des cellules T dans le parenchyme. L'influence de l'axe DLL4-NOTCH1 sur l'activation et la différenciation des cellules T dans les espaces périvasculaires reste à déterminer et sera l'objet de la suite de ce projet par notre groupe.

Anticorps anti-DLL4

Dans notre étude, l'administration exogène d'un anticorps anti-DLL4 de souris a permis une amélioration de la maladie chez des souris C57BL/6 adultes induites par l'EAE, mais cette amélioration est modérée et similaire à celle observée chez les souris Dll4^{ACKOP} induites par l'EAE qui ont une recombinaison modérée dans les astrocytes du cortex et de la moelle épinière. L'impact de la thérapie par anticorps anti-DLL4 de souris sur la pathologie de l'EAE est donc moins important que celui observé chez les souris Dll4^{ACKOC}, qui sont caractérisées par une efficacité de recombinaison totale dans les astrocytes du cortex et de la moelle épinière. Cette différence sur la sévérité de la maladie EAE observée entre un knockdown complet de Dll4 dans les astrocytes et la thérapie par anticorps anti-DLL4 de souris peut s'expliquer de différentes façons. Tout d'abord, l'anticorps anti-DLL4 de souris est injecté par voie systémique, ce qui peut affecter l'expression de DLL4 dans d'autres types cellulaires, avec des effets potentiellement opposés sur la pathologie de l'EAE. Pour tenter de répondre à cette hypothèse, sachant que DLL4 est reconnu comme un acteur majeur de la mise en place et du maintien

du système cardiovasculaire, nous avons induit l'EAE chez des souris *Cdh5-CreERT2, Dll4Flox/Flox* et leurs contrôles. Nous avons montré que l'inhibition de l'expression de DLL4 spécifiquement dans les cellules endothéliales n'a pas d'impact sur la sévérité de l'EAE chez les souris. Cependant il existe toujours un effet potentiel de l'inhibition systémique de DLL4 sur d'autres types cellulaires que les cellules endothéliales chez les souris adultes induites avec l'EAE, qui pourraient exprimer DLL4 et avoir des effets opposés aux astrocytes réactifs sur l'EAE.

Une autre explication à l'effet intermédiaire de l'anticorps anti-DLL4 murin sur la sévérité de la maladie, est que la BHE, bien que perméable pendant l'EAE, présente encore des propriétés de barrière limitant la quantité d'anticorps qui accède à l'espace périvasculaire et au parenchyme.

Une dernière considération est la spécificité du promoteur *Aldh1L1-Cre* pour les astrocytes. Bien que des travaux antérieurs aient montré la grande spécificité de ce promoteur dans le SNC pour les astrocytes, il a récemment été démontré que ce promoteur induit une recombinaison dans d'autres types cellulaires de l'organisme notamment au sein des glandes salivaires et de la rate (Nemeth et al. 2023). Ainsi, dans ces organes, si la recombinaison touche des cellules qui expriment DLL4, cela pourrait contribuer au phénotype majeur observé dans l'EAE chez les souris *Dll4^{ACKO}*.

Le développement d'un médicament vectorisé, donc plus spécifique, et plus à même de franchir la BHE pourrait être intéressant afin d'étudier le potentiel du ciblage de DLL4 dans la SEP.

Anticorps anti-IL6

L'utilisation de siltuximab, un anticorps dirigé contre le récepteur à l'IL6, seul ou en association à l'anticorps monoclonal dirigé contre DLL4 n'a pas eu d'efficacité notable sur les performances cliniques

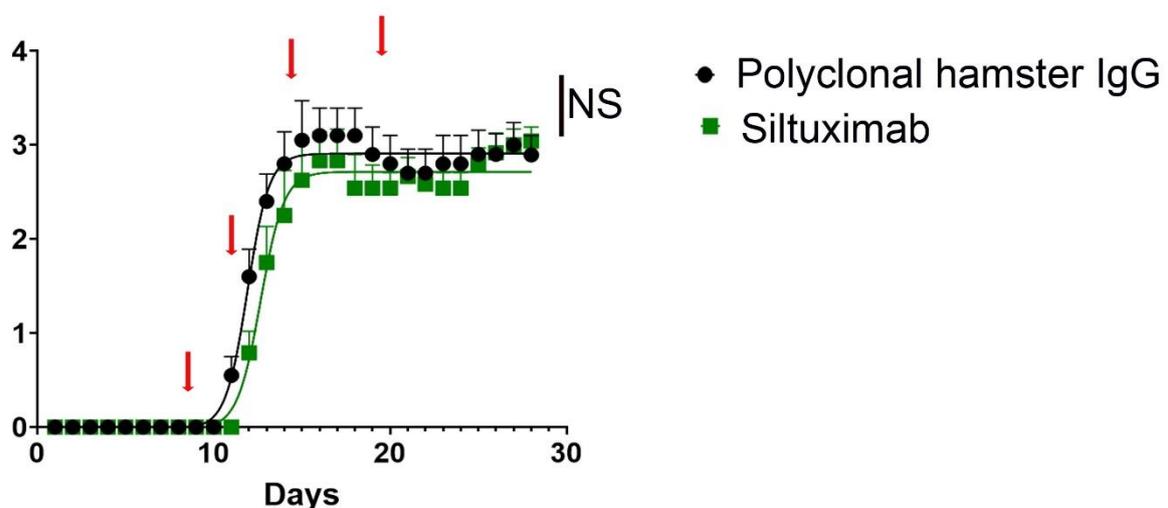


Figure 31 Effet de l'injection d'un anticorps monoclonal anti-IL6, le siltuximab, sur le développement de l'EAE chez la souris

des souris atteintes d'EAE. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette contreperformance : une diffusion réduite dans le parenchyme cérébral, de la même manière que pour l'anticorps anti DLL4, mais également une moins bonne sensibilité du siltuximab pour l'IL6 murin, comme décrit dans la littérature.

Dans l'ensemble, notre étude identifie l'axe DLL4-NOTCH1 comme un moteur clé de l'astroglie pendant la neuro-inflammation via la voie de signalisation IL6-STAT3-TYMP/VEGFA, qui est associée à la perturbation de l'UNV et à l'aggravation de la pathologie. Ces travaux soulèvent également des questions passionnantes sur le rôle de la signalisation DLL4-NOTCH dans l'activation et la différenciation des lymphocytes T (CD4+/CD8+, équilibre Th17/Treg) dans les espaces périvasculaires de l'unité neurovasculaire et son impact sur la neuropathologie au cours de la neuro-inflammation.

Références

- Abadier, Michael, Neda Haghayegh Jahromi, Ludmila Cardoso Alves, Rémy Boscacci, Dietmar Vestweber, Scott Barnum, Urban Deutsch, Britta Engelhardt, et Ruth Lyck. 2015. « Cell Surface Levels of Endothelial ICAM-1 Influence the Transcellular or Paracellular T-Cell Diapedesis across the Blood–Brain Barrier ». *European Journal of Immunology* 45 (4): 1043-58. <https://doi.org/10.1002/eji.201445125>.
- Ables, Jessica L., Joshua J. Breunig, Amelia J. Eisch, et Pasko Rakic. 2011. « Not(Ch) Just Development: Notch Signalling in the Adult Brain ». *Nature Reviews. Neuroscience* 12 (5): 269-83. <https://doi.org/10.1038/nrn3024>.
- Adams, C.W.M., R.N. Poston, et S.J. Buk. 1989. « Pathology, Histochemistry and Immunocytochemistry of Lesions in Acute Multiple Sclerosis ». *Journal of the Neurological Sciences* 92 (2-3): 291-306. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(89\)90144-5](https://doi.org/10.1016/0022-510X(89)90144-5).
- Agrawal, Smriti, Per Anderson, Madeleine Durbeej, Nico van Rooijen, Fredrik Ivars, Ghislain Opendakker, et Lydia M. Sorokin. 2006. « Dystroglycan Is Selectively Cleaved at the Parenchymal Basement Membrane at Sites of Leukocyte Extravasation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Journal of Experimental Medicine* 203 (4): 1007-19. <https://doi.org/10.1084/jem.20051342>.
- Álamo, David del, Hervé Rouault, et François Schweisguth. 2011. « Mechanism and Significance of Cis-Inhibition in Notch Signalling ». *Current Biology* 21 (1): R40-47. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.10.034>.
- Alberi, Lavinia, Sarah E. Hoey, Emanuele Brai, Alessandra L. Scotti, et Swananda Marathe. 2013. « Notch Signaling in the Brain: In Good and Bad Times ». *Ageing Research Reviews* 12 (3): 801-14. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.03.004>.
- Alvarez, J. A., A. Baird, A. Tatum, J. Daucher, R. Chorsky, A. M. Gonzalez, et E. G. Stopa. 1992. « Localization of Basic Fibroblast Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor in Human Glial Neoplasms ». *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 5 (3): 303-7.
- Alvarez, Jorge Ivan, Romain Cayrol, et Alexandre Prat. 2011. « Disruption of Central Nervous System Barriers in Multiple Sclerosis ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, Molecular Basis of Multiple Sclerosis*, 1812 (2): 252-64. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.06.017>.
- Alvarez, Jorge Ivan, Aurore Dodelet-Devillers, Hania Kebir, Igal Ifergan, Pierre J. Fabre, Simone Terouz, Mike Sabbagh, et al. 2011. « The Hedgehog Pathway Promotes Blood-Brain Barrier Integrity and CNS Immune Quiescence ». *Science (New York, N.Y.)* 334 (6063): 1727-31. <https://doi.org/10.1126/science.1206936>.
- Amatruda, Mario, Candice Chapouly, Viola Woo, Farinaz Safavi, Joy Zhang, David Dai, Anthony Therattil, et al. 2022. « Astrocytic Junctional Adhesion Molecule-A Regulates T-Cell Entry Past the Glia Limitans to Promote Central Nervous System Autoimmune Attack ». *Brain Communications* 4 (2): fcac044. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcac044>.
- Ambrosini, Elena, Sandra Columba-Cabezas, Barbara Serafini, Antonella Muscella, et Francesca Aloisi. 2003. « Astrocytes Are the Major Intracerebral Source of Macrophage Inflammatory Protein-3alpha/CCL20 in Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and in Vitro ». *Glia* 41 (3): 290-300. <https://doi.org/10.1002/glia.10193>.
- Anastasi, Emanuela, Antonio F. Campese, Diana Bellavia, Angela Bulotta, Anna Balestri, Monica Pascucci, Saula Checquolo, et al. 2003. « Expression of Activated Notch3 in Transgenic Mice Enhances Generation of T Regulatory Cells and Protects against Experimental Autoimmune

- Diabetes1 ». *The Journal of Immunology* 171 (9): 4504-11.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.9.4504>.
- Andrawes, Marie Blanke, Xiang Xu, Hong Liu, Scott B. Ficarro, Jarrod A. Marto, Jon C. Aster, et Stephen C. Blacklow. 2013. « Intrinsic Selectivity of Notch 1 for Delta-like 4 Over Delta-like 1* ». *Journal of Biological Chemistry* 288 (35): 25477-89.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.454850>.
- Apte, Rajendra S., Daniel S. Chen, et Napoleone Ferrara. 2019. « VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development ». *Cell* 176 (6): 1248-64.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>.
- Argaw, Azeb Tadesse, Linnea Asp, Jingya Zhang, Kristina Navrazhina, Trinh Pham, John N. Mariani, Sean Mahase, et al. 2012. « Astrocyte-Derived VEGF-A Drives Blood-Brain Barrier Disruption in CNS Inflammatory Disease ». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (7): 2454-68.
<https://doi.org/10.1172/JCI60842>.
- Argaw, Azeb Tadesse, Blake T. Gurfein, Yueting Zhang, Andleeb Zameer, et Gareth R. John. 2009. « VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (6): 1977-82.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0808698106>.
- Argaw, Azeb Tadesse, Yueting Zhang, Brian J. Snyder, Meng-Liang Zhao, Natalya Kopp, Sunhee C. Lee, Cedric S. Raine, Celia F. Brosnan, et Gareth R. John. 2006. « IL-1 β Regulates Blood-Brain Barrier Permeability via Reactivation of the Hypoxia-Angiogenesis Program ». *The Journal of Immunology* 177 (8): 5574-84. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.8.5574>.
- Arumugam, Thiruma V., Sic L. Chan, Dong-Gyu Jo, Gokhan Yilmaz, Sung-Chun Tang, Aiwu Cheng, Marc Gleichmann, et al. 2006. « Gamma Secretase-Mediated Notch Signaling Worsens Brain Damage and Functional Outcome in Ischemic Stroke ». *Nature Medicine* 12 (6): 621-23.
<https://doi.org/10.1038/nm1403>.
- Aubert, Agnès, Robert Costalat, Pierre J. Magistretti, et Luc Pellerin. 2005. « Brain Lactate Kinetics: Modeling Evidence for Neuronal Lactate Uptake upon Activation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (45): 16448-53.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0505427102>.
- Aurrand-Lions, Michel, Lidia Duncan, Christoph Ballestrem, et Beat A. Imhof. 2001. « JAM-2, a Novel Immunoglobulin Superfamily Molecule, Expressed by Endothelial and Lymphatic Cells* ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (4): 2733-41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005458200>.
- Aurrand-Lions, Michel, Chrystelle Lamagna, John P. Dangerfield, Shijun Wang, Pedro Herrera, Sussan Nourshargh, et Beat A. Imhof. 2005. « Junctional Adhesion Molecule-C Regulates the Early Influx of Leukocytes into Tissues during Inflammation1 ». *The Journal of Immunology* 174 (10): 6406-15. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6406>.
- Babbe, Holger, Axel Roers, Ari Waisman, Hans Lassmann, Norbert Goebels, Reinhard Hohlfeld, Michael Friese, et al. 2000. « Clonal Expansions of CD8 α T Cells Dominate the T Cell Infiltrate in Active Multiple Sclerosis Lesions as Shown by Micromanipulation and Single Cell Polymerase Chain Reaction ».
- Babinski, Joseph (1857-1932) Auteur du texte. 1885. *Étude anatomique et clinique sur la sclérose en plaques / par le Dr J. Babinski,...* <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k77393r>.
- Bai, Xiao-chen, Chuangye Yan, Guanghui Yang, Peilong Lu, Dan Ma, Linfeng Sun, Rui Zhou, Sjors H. W. Scheres, et Yigong Shi. 2015. « An Atomic Structure of Human γ -Secretase ». *Nature* 525 (7568): 212-17. <https://doi.org/10.1038/nature14892>.
- Bandeira, Fabiana, Roberto Lent, et Suzana Herculano-Houzel. 2009. « Changing Numbers of Neuronal and Non-Neuronal Cells Underlie Postnatal Brain Growth in the Rat ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (33): 14108-13.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0804650106>.
- Battistini, Luca, Laura Piccio, Barbara Rossi, Simona Bach, Simona Galgani, Claudio Gasperini, Linda Ottoboni, et al. 2003. « CD8+ T cells from patients with acute multiple sclerosis display

- selective increase of adhesiveness in brain venules: a critical role for P-selectin glycoprotein ligand-1 ». *Blood* 101 (12): 4775-82. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3309>.
- Bauer, Hans-Christian, István A. Krizbai, Hannelore Bauer, et Andreas Traweger. 2014. « “You Shall Not Pass”—tight junctions of the blood brain barrier ». *Frontiers in Neuroscience* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2014.00392>.
- Beachy, Philip A., Sarah G. Hymowitz, Robert A. Lazarus, Daniel J. Leahy, et Christian Siebold. 2010. « Interactions between Hedgehog Proteins and Their Binding Partners Come into View ». *Genes & Development* 24 (18): 2001-12. <https://doi.org/10.1101/gad.1951710>.
- Bell, Robert D., Ethan A. Winkler, Abhay P. Sagare, Itender Singh, Barb LaRue, Rashid Deane, et Berislav V. Zlokovic. 2010. « Pericytes Control Key Neurovascular Functions and Neuronal Phenotype in the Adult Brain and during Brain Aging ». *Neuron* 68 (3): 409-27. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.043>.
- Bennett, Jami, Jayasree Basivireddy, Anita Kollar, Kaan E. Biron, Peter Reickmann, Wilfred A. Jefferies, et Stephen McQuaid. 2010. « Blood–Brain Barrier Disruption and Enhanced Vascular Permeability in the Multiple Sclerosis Model EAE ». *Journal of Neuroimmunology* 229 (1): 180-91. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.08.011>.
- Bergsland, Niels, Michael G. Dwyer, Dejan Jakimovski, Eleonora Tavazzi, Ralph H. B. Benedict, Bianca Weinstock-Guttman, et Robert Zivadinov. 2023. « Association of Choroid Plexus Inflammation on MRI With Clinical Disability Progression Over 5 Years in Patients With Multiple Sclerosis ». *Neurology* 100 (9): e911-20. <https://doi.org/10.1212/WNL.000000000000201608>.
- Bernard, C. C. A., T. G. Johns, A. Slavin, M. Ichikawa, C. Ewing, J. Liu, et J. Bettadapura. 1997. « Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein: A Novel Candidate Autoantigen in Multiple Sclerosis ». *Journal of Molecular Medicine* 75 (2): 77-88. <https://doi.org/10.1007/s001090050092>.
- Berndt, Philipp, Lars Winkler, Jimmi Cording, Olga Breitzkreuz-Korff, André Rex, Sophie Dithmer, Valentina Rausch, et al. 2019. « Tight Junction Proteins at the Blood–Brain Barrier: Far More than Claudin-5 ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 76 (10): 1987-2002. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03030-7>.
- Berthelot, Laureline, David-Axel Laplaud, Ségolène Pettré, Caroline Ballet, Laure Michel, Sophie Hillion, Cécile Braudeau, et al. 2008. « Blood CD8+ T Cell Responses against Myelin Determinants in Multiple Sclerosis and Healthy Individuals ». *European Journal of Immunology* 38 (7): 1889-99. <https://doi.org/10.1002/eji.200838023>.
- Bjornevik, Kjetil, Marianna Cortese, Brian C. Healy, Jens Kuhle, Michael J. Mina, Yumei Leng, Stephen J. Elledge, et al. 2022. « Longitudinal Analysis Reveals High Prevalence of Epstein-Barr Virus Associated with Multiple Sclerosis ». *Science (New York, N.Y.)* 375 (6578): 296-301. <https://doi.org/10.1126/science.abj8222>.
- Blackhall, Fiona, Kevin Jao, Laurent Greillier, Byoung Chul Cho, Konstantin Penkov, Noemi Reguart, Margarita Majem, et al. 2021. « Efficacy and Safety of Rovalpituzumab Tesirine Compared With Topotecan as Second-Line Therapy in DLL3-High SCLC: Results From the Phase 3 TAHOE Study ». *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 16 (9): 1547-58. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.02.009>.
- Blanco, Víctor M., Javier E. Stern, et Jessica A. Filosa. 2008. « Tone-Dependent Vascular Responses to Astrocyte-Derived Signals ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 294 (6): H2855-2863. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.91451.2007>.
- Bø, L, C A Vedeler, H Nyland, B D Trapp, et S J Mørk. 2003. « Intracortical Multiple Sclerosis Lesions Are Not Associated with Increased Lymphocyte Infiltration ». *Multiple Sclerosis Journal* 9 (4): 323-31. <https://doi.org/10.1191/1352458503ms9170a>.
- Booss, J., M. M. Esiri, W. W. Tourtellotte, et D. Y. Mason. 1983. « Immunohistological Analysis of T Lymphocyte Subsets in the Central Nervous System in Chronic Progressive Multiple Sclerosis ». *Journal of the Neurological Sciences* 62 (1-3): 219-32. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(83\)90201-0](https://doi.org/10.1016/0022-510x(83)90201-0).

- Borggreffe, T., et F. Oswald. 2009. « The Notch Signaling Pathway: Transcriptional Regulation at Notch Target Genes ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 66 (10): 1631-46. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8668-7>.
- Borst, Katharina, Anaëlle Aurelie Dumas, et Marco Prinz. 2021. « Microglia: Immune and Non-Immune Functions ». *Immunity* 54 (10): 2194-2208. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.09.014>.
- Boström, I., et A.-M. Landtblom. 2015. « Does the Changing Sex Ratio of Multiple Sclerosis Give Opportunities for Intervention? » *Acta Neurologica Scandinavica* 132 (S199): 42-45. <https://doi.org/10.1111/ane.12430>.
- Boulay, Anne-Cécile, Aurélien Mazeraud, Salvatore Cisternino, Bruno Saubaméa, Phillippe Mailly, Laurent Jourdain, Corinne Blugeon, et al. 2015. « Immune Quiescence of the Brain Is Set by Astroglial Connexin 43 ». *Journal of Neuroscience* 35 (10): 4427-39. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2575-14.2015>.
- Brambilla, Roberta, Jessica Jopek Ashbaugh, Roberta Magliozzi, Anna Dellarole, Shaffiat Karmally, David E. Szymkowski, et John R. Bethea. 2011. « Inhibition of Soluble Tumour Necrosis Factor Is Therapeutic in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Promotes Axon Preservation and Remyelination ». *Brain: A Journal of Neurology* 134 (Pt 9): 2736-54. <https://doi.org/10.1093/brain/awr199>.
- Brambilla, Roberta, Trikaladarshi Persaud, Xianchen Hu, Shaffiat Karmally, Valery I. Shestopalov, Galina Dvorianchikova, Dmitry Ivanov, Lubov Nathanson, Scott R. Barnum, et John R. Bethea. 2009. « Transgenic Inhibition of Astroglial NF- κ B Improves Functional Outcome in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Suppressing Chronic Central Nervous System Inflammation1 ». *The Journal of Immunology* 182 (5): 2628-40. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802954>.
- Bray, Sarah J. 2006. « Notch Signalling: A Simple Pathway Becomes Complex ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (9): 678-89. <https://doi.org/10.1038/nrm2009>.
- Brix, Britta, Jeroen R. Mesters, Luc Pellerin, et Olaf Jöhren. 2012. « Endothelial Cell-Derived Nitric Oxide Enhances Aerobic Glycolysis in Astrocytes via HIF-1 α -Mediated Target Gene Activation ». *Journal of Neuroscience* 32 (28): 9727-35. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0879-12.2012>.
- Burns, Kevin A., Brian Murphy, Steve C. Danzer, et Chia-Yi Kuan. 2009. « Developmental and Post-Injury Cortical Gliogenesis: A Genetic Fate-Mapping Study with Nestin-CreER Mice ». *Glia* 57 (10): 1115-29. <https://doi.org/10.1002/glia.20835>.
- Carswell, Sir Robert. 1838. *Pathological Anatomy: Illustrations of the Elementary Forms of Disease*. Longman, Orme, Brown, Green and Longman.
- Castro Dias, Mariana, Caroline Coisne, Ivana Lazarevic, Pascale Baden, Masaki Hata, Noriko Iwamoto, David Miguel Ferreira Francisco, et al. 2019. « Claudin-3-Deficient C57BL/6J Mice Display Intact Brain Barriers ». *Scientific Reports* 9 (1): 203. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36731-3>.
- Chambers, C. B., Y. Peng, H. Nguyen, N. Gaiano, G. Fishell, et J. S. Nye. 2001. « Spatiotemporal Selectivity of Response to Notch1 Signals in Mammalian Forebrain Precursors ». *Development (Cambridge, England)* 128 (5): 689-702. <https://doi.org/10.1242/dev.128.5.689>.
- Chang, Jie, Zhanyang Qian, Binyu Wang, Jiang Cao, Sheng Zhang, Fan Jiang, Renyi Kong, et al. 2023. « Transplantation of A2 Type Astrocytes Promotes Neural Repair and Remyelination after Spinal Cord Injury ». *Cell Communication and Signaling* 21 (1): 1-20. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-01036-6>.
- Chapouly, Candice, Azeb Tadesse Argaw, Sam Horng, Kamilah Castro, Jingya Zhang, Linnea Asp, Hannah Loo, et al. 2015. « Astrocytic TYMP and VEGFA Drive Blood-Brain Barrier Opening in Inflammatory Central Nervous System Lesions ». *Brain: A Journal of Neurology* 138 (Pt 6): 1548-67. <https://doi.org/10.1093/brain/awv077>.

- Charcot, Jean-Martin (1825-1893) Auteur du texte. 1869. *Histologie de la sclérose en plaques, leçon faite à l'hospice de la Salpêtrière par M. Charcot et recueillie par M. Bourneville*.
- Chen, H., Y. Sun, L. Lai, H. Wu, Y. Xiao, B. Ming, M. Gao, et al. 2015. « Interleukin-33 Is Released in Spinal Cord and Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice ». *Neuroscience* 308 (novembre): 157-68. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.09.019>.
- Cheng, Yi-Lin, Jong-Sung Park, Silvia Manzanero, Yuri Choi, Sang-Ha Baik, Eitan Okun, Mathias Gelderblom, et al. 2014. « Evidence That Collaboration between HIF-1 α and Notch-1 Promotes Neuronal Cell Death in Ischemic Stroke ». *Neurobiology of Disease* 62 (février): 286-95. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.10.009>.
- Chi, Zhikai, Jianmin Zhang, Akinori Tokunaga, Maged M. Harraz, Sean T. Byrne, Andrew Dolinko, Jing Xu, et al. 2012. « Botch Promotes Neurogenesis by Antagonizing Notch ». *Developmental Cell* 22 (4): 707-20. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.02.011>.
- Chiorean, Elena Gabriela, Patricia LoRusso, Robert Matthew Strother, Jennifer R. Diamond, Anne Younger, Wells A. Messersmith, Lieve Adriaens, et al. 2015. « A Phase I First-in-Human Study of Enoticumab (REGN421), a Fully Human Delta-like Ligand 4 (Dll4) Monoclonal Antibody in Patients with Advanced Solid Tumors ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 21 (12): 2695-2703. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2797>.
- Christophi, George P., Ross C. Gruber, Michael Panos, Rebecca L. Christophi, Burk Jubelt, et Paul T. Massa. 2012. « Interleukin-33 Upregulation in Peripheral Leukocytes and CNS of Multiple Sclerosis Patients ». *Clinical Immunology* 142 (3): 308-19. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2011.11.007>.
- Clarke, Laura E., Shane A. Liddelow, Chandrani Chakraborty, Alexandra E. Münch, Myriam Heiman, et Ben A. Barres. 2018. « Normal Aging Induces A1-like Astrocyte Reactivity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (8): E1896-1905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800165115>.
- Claudio, Luz, Cedric S. Raine, et Celia F. Brosnan. 1995. « Evidence of Persistent Blood-Brain Barrier Abnormalities in Chronic-Progressive Multiple Sclerosis ». *Acta Neuropathologica* 90 (3): 228-38. <https://doi.org/10.1007/BF00296505>.
- Clavreul, Solène, Lamiae Abdeladim, Edwin Hernández-Garzón, Dragos Niculescu, Jason Durand, Sio-Hoï Ieng, Raphaëlle Barry, et al. 2019. « Cortical Astrocytes Develop in a Plastic Manner at Both Clonal and Cellular Levels ». *Nature Communications* 10 (1): 4884. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12791-5>.
- Clavreul, Solène, Laura Dumas, et Karine Loulier. 2022. « Astrocyte development in the cerebral cortex: Complexity of their origin, genesis, and maturation ». *Frontiers in Neuroscience* 16. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2022.916055>.
- Coleman, Robert L., Katelyn F. Handley, Robert Burger, Graziela Zibetti Dal Molin, Robert Stagg, Anil K. Sood, et Kathleen N. Moore. 2020. « Demcizumab Combined with Paclitaxel for Platinum-Resistant Ovarian, Primary Peritoneal, and Fallopian Tube Cancer: The SIERRA Open-Label Phase Ib Trial ». *Gynecologic Oncology* 157 (2): 386-91. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2020.01.042>.
- Conner, Sean D. 2016. « Chapter Four - Regulation of Notch Signaling Through Intracellular Transport ». In *International Review of Cell and Molecular Biology*, édité par Kwang W. Jeon, 323:107-27. International Review of Cell and Molecular Biology. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.12.002>.
- Cruveilhier, Jean (1791-1874) Auteur. 1829. *Anatomie pathologique du corps humain : ou descriptions, avec figures lithographiées et coloriées, des diverses altérations morbides dont le corps humain est susceptible*. J.B. Baillière. Paris.
- Daneman, Richard, Lu Zhou, Amanuel A. Kebede, et Ben A. Barres. 2010. « Pericytes Are Required for Blood-Brain Barrier Integrity during Embryogenesis ». *Nature* 468 (7323): 562-66. <https://doi.org/10.1038/nature09513>.

- Das Sarma, Jayasri, Bogoljub Ciric, Ryan Marek, Sanjoy Sadhukhan, Michael L. Caruso, Jasmine Shafagh, Denise C. Fitzgerald, Kenneth S. Shindler, et Am Rostami. 2009. « Functional Interleukin-17 Receptor A Is Expressed in Central Nervous System Glia and Upregulated in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Journal of Neuroinflammation* 6 (avril): 14. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-6-14>.
- Davies, Andrew L., Roshni A. Desai, Peter S. Bloomfield, Peter R. McIntosh, Katie J. Chapple, Christopher Linington, Richard Fairless, et al. 2013. « Neurological Deficits Caused by Tissue Hypoxia in Neuroinflammatory Disease ». *Annals of Neurology* 74 (6): 815-25. <https://doi.org/10.1002/ana.24006>.
- Deneen, Benjamin, Ritchie Ho, Agnes Lukaszewicz, Christian J. Hochstim, Richard M. Gronostajski, et David J. Anderson. 2006. « The Transcription Factor NFIA Controls the Onset of Gliogenesis in the Developing Spinal Cord ». *Neuron* 52 (6): 953-68. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.11.019>.
- Derk, Julia, Hannah E. Jones, Christina Como, Bradley Pawlikowski, et Julie A. Siegenthaler. 2021. « Living on the Edge of the CNS: Meninges Cell Diversity in Health and Disease ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 15. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2021.703944>.
- Dore-Duffy, Paula, Walter Newman, Roumen Balabanov, Robert P. Lisak, Elizabeth Mainolfi, Robert Rothlein, et Margaret Peterson. 1995. « Circulating, Soluble Adhesion Proteins in Cerebrospinal Fluid and Serum of Patients with Multiple Sclerosis: Correlation with Clinical Activity ». *Annals of Neurology* 37 (1): 55-62. <https://doi.org/10.1002/ana.410370111>.
- Dorsky, Richard I, David H Rapaport, et William A Harris. 1995. « Xotch Inhibits Cell Differentiation in the Xenopus Retina ». *Neuron* 14 (3): 487-96. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90305-4](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90305-4).
- Dreval, Kostiantyn, Robert J. Lake, et Hua-Ying Fan. 2019. « HDAC1 Negatively Regulates Selective Mitotic Chromatin Binding of the Notch Effector RBPJ in a KDM5A-Dependent Manner ». *Nucleic Acids Research* 47 (9): 4521-38. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz178>.
- Elain, Gaëlle, Karine Jeanneau, Aleksandra Rutkowska, Anis K. Mir, et Kumlesh K. Dev. 2014. « The Selective Anti-IL17A Monoclonal Antibody Secukinumab (AIN457) Attenuates IL17A-Induced Levels of IL6 in Human Astrocytes ». *Glia* 62 (5): 725-35. <https://doi.org/10.1002/glia.22637>.
- Engelhardt, Britta, Roxana O. Carare, Ingo Bechmann, Alexander Flügel, Jon D. Laman, et Roy O. Weller. 2016. « Vascular, Glial, and Lymphatic Immune Gateways of the Central Nervous System ». *Acta Neuropathologica* 132 (3): 317-38. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1606-5>.
- Engelhardt, Britta, et Caroline Coisne. 2011. « Fluids and Barriers of the CNS Establish Immune Privilege by Confining Immune Surveillance to a Two-Walled Castle Moat Surrounding the CNS Castle ». *Fluids and Barriers of the CNS* 8 (1): 4. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-8-4>.
- Engelhardt, Britta, et Hartwig Wolburg. 2004. « Mini-Review: Transendothelial Migration of Leukocytes: Through the Front Door or around the Side of the House? » *European Journal of Immunology* 34 (11): 2955-63. <https://doi.org/10.1002/eji.200425327>.
- Engels, K., S. B. Fox, R. M. Whitehouse, K. C. Gatter, et A. L. Harris. 1997. « Up-regulation of thymidine phosphorylase expression is associated with a discrete pattern of angiogenesis in ductal carcinomas in situ of the breast ». *The Journal of Pathology* 182 (4): 414-20. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199708\)182:4<414::AID-PATH897>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199708)182:4<414::AID-PATH897>3.0.CO;2-Q).
- Erta, Maria, Mercedes Giralto, Silvia Jiménez, Amalia Molinero, Gemma Comes, et Juan Hidalgo. 2016. « Astrocytic IL-6 Influences the Clinical Symptoms of EAE in Mice ». *Brain Sciences* 6 (2): 15. <https://doi.org/10.3390/brainsci6020015>.
- Escartin, Carole, Elena Galea, Andrés Lakatos, James P. O'Callaghan, Gabor C. Petzold, Alberto Serrano-Pozo, Christian Steinhäuser, et al. 2021. « Reactive Astrocyte Nomenclature, Definitions, and Future Directions ». *Nature Neuroscience* 24 (3): 312-25. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>.

- Esiri, M.M., et D. Gay. 1990. « Immunological and Neuropathological Significance of the Virchow-Robin Space ». *Journal of the Neurological Sciences* 100 (1-2): 3-8. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(90\)90004-7](https://doi.org/10.1016/0022-510X(90)90004-7).
- Fabis, Marzena J., Gwen S. Scott, Rhonda B. Kean, Hilary Koprowski, et D. Craig Hooper. 2007. « Loss of blood–brain barrier integrity in the spinal cord is common to experimental allergic encephalomyelitis in knockout mouse models ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (13): 5656-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701252104>.
- Ferrarotto, R., G. Eckhardt, A. Patnaik, P. LoRusso, L. Faoro, J. V. Heymach, A. M. Kapoun, L. Xu, et P. Munster. 2018. « A Phase I Dose-Escalation and Dose-Expansion Study of Brontictuzumab in Subjects with Selected Solid Tumors ». *Annals of Oncology, Systemic treatment of melanoma brain metastases*, 29 (7): 1561-68. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy171>.
- Figueres-Oñate, María, Mario Sánchez-Villalón, Rebeca Sánchez-González, et Laura López-Mascaraque. 2019. « Lineage Tracing and Cell Potential of Postnatal Single Progenitor Cells In Vivo ». *Stem Cell Reports* 13 (4): 700-712. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.08.010>.
- Filosa, Jessica A., Adrian D. Bonev, Stephen V. Straub, Andrea L. Meredith, M. Keith Wilkerson, Richard W. Aldrich, et Mark T. Nelson. 2006. « Local Potassium Signaling Couples Neuronal Activity to Vasodilation in the Brain ». *Nature Neuroscience* 9 (11): 1397-1403. <https://doi.org/10.1038/nn1779>.
- Fischer, Marie Therese, Isabella Wimmer, Romana Höftberger, Susanna Gerlach, Lukas Haider, Tobias Zrzavy, Simon Hametner, et al. 2013. « Disease-Specific Molecular Events in Cortical Multiple Sclerosis Lesions ». *Brain* 136 (6): 1799-1815. <https://doi.org/10.1093/brain/awt110>.
- Fleischer, Vinzenz, Gabriel Gonzalez-Escamilla, Dumitru Ciolac, Philipp Albrecht, Patrick Küry, Joel Gruchot, Michael Dietrich, et al. 2021. « Translational Value of Choroid Plexus Imaging for Tracking Neuroinflammation in Mice and Humans ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (36): e2025000118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025000118>.
- Flügel, Alexander, Tomasz Berkowicz, Thomas Ritter, Marta Labeur, Dieter E Jenne, Zhaoxia Li, Joachim W Ellwart, Michael Willem, Hans Lassmann, et Hartmut Wekerle. 2001. « Migratory Activity and Functional Changes of Green Fluorescent Effector Cells before and during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Immunity* 14 (5): 547-60. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00143-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00143-1).
- Fortini, Mark E., Ilaria Rebay, Laurent A. Caron, et Spyros Artavanis-Tsakonas. 1993. « An Activated Notch Receptor Blocks Cell-Fate Commitment in the Developing Drosophila Eye ». *Nature* 365 (6446): 555-57. <https://doi.org/10.1038/365555a0>.
- Fox, J. W., U. Mayer, R. Nischt, M. Aumailley, D. Reinhardt, H. Wiedemann, K. Mann, R. Timpl, T. Krieg, et J. Engel. 1991. « Recombinant Nidogen Consists of Three Globular Domains and Mediates Binding of Laminin to Collagen Type IV ». *The EMBO Journal* 10 (11): 3137-46. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04875.x>.
- Freund, Jules, et Katherine McDermott. 1942. « Sensitization to Horse Serum by Means of Adjuvants ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 49 (4): 548-53. <https://doi.org/10.3181/00379727-49-13625>.
- Freund, Jules, E. R. Stern, et T. M. Pisani. 1947. « Isoallergic Encephalomyelitis and Radiculitis in Guinea Pigs After One Injection of Brain and Mycobacteria in Water-in-Oil Emulsion ». *The Journal of Immunology* 57 (2): 179-94. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.57.2.179>.
- Frisullo, Giovanni, Domenico Plantone, Alessandro Marti, Raffaele Iorio, Viviana Nociti, Agata Katia Patanella, et Anna Paola Batocchi. 2011. « Circulating CD8+CD56–perforin+ T Cells Are Increased in Multiple Sclerosis Patients ». *Journal of Neuroimmunology* 240-241 (décembre): 137-41. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.09.002>.
- Furuse, M, T Hirase, M Itoh, A Nagafuchi, S Yonemura, S Tsukita, et S Tsukita. 1993. « Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. » *Journal of Cell Biology* 123 (6): 1777-88. <https://doi.org/10.1083/jcb.123.6.1777>.

- Gaiano, Nicholas, Jeffrey S. Nye, et Gord Fishell. 2000. « Radial Glial Identity Is Promoted by Notch1 Signaling in the Murine Forebrain ». *Neuron* 26 (2): 395-404. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81172-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81172-1).
- Gao, Fang, Qi Zhang, Min-Hua Zheng, Hui-Ling Liu, Yi-Yang Hu, Ping Zhang, Zheng-Ping Zhang, et al. 2009. « Transcription Factor RBP-J-Mediated Signaling Represses the Differentiation of Neural Stem Cells into Intermediate Neural Progenitors ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 40 (4): 442-50. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.12.008>.
- Ge, Woo-Ping, Atsushi Miyawaki, Fred H. Gage, Yuh Nung Jan, et Lily Yeh Jan. 2012. « Local Generation of Glia Is a Major Astrocyte Source in Postnatal Cortex ». *Nature* 484 (7394): 376-80. <https://doi.org/10.1038/nature10959>.
- Ghadirian, P., B. Dadgostar, R. Azani, et P. Maisonneuve. 2001. « A Case-Control Study of the Association between Socio-Demographic, Lifestyle and Medical History Factors and Multiple Sclerosis ». *Canadian Journal of Public Health = Revue Canadienne De Sante Publique* 92 (4): 281-85. <https://doi.org/10.1007/BF03404961>.
- Giraud, Sébastien N., Cécile M. Caron, Danielle Pham-Dinh, Patrick Kitabgi, et Arnaud B. Nicot. 2010. « Estradiol inhibits ongoing autoimmune neuroinflammation and NFκB-dependent CCL2 expression in reactive astrocytes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (18): 8416-21. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910627107>.
- Glezer, I., A. R. Simard, et S. Rivest. 2007. « Neuroprotective Role of the Innate Immune System by Microglia ». *Neuroscience* 147 (4): 867-83. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.02.055>.
- Goldmann, Tobias, Peter Wieghofer, Marta Joana Costa Jordão, Fabiola Prutek, Nora Hagemeyer, Kathrin Frenzel, Lukas Amann, et al. 2016. « Origin, Fate and Dynamics of Macrophages at Central Nervous System Interfaces ». *Nature Immunology* 17 (7): 797-805. <https://doi.org/10.1038/ni.3423>.
- Gómez-Pinedo, Ulises, Lucía Galán, Jordi A. Matías-Guiu, Vanesa Pytel, Teresa Moreno, Antonio Guerrero-Sola, et Jorge Matías-Guiu. 2019. « Notch Signalling in the Hippocampus of Patients With Motor Neuron Disease ». *Frontiers in Neuroscience* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.00302>.
- Götz, Magdalena, et Wieland B. Huttner. 2005. « The Cell Biology of Neurogenesis ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (10): 777-88. <https://doi.org/10.1038/nrm1739>.
- Greenwood, J, Y Wang, et V L Calder. 1995. « Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. off. ». *Immunology* 86 (3): 408-15.
- Greter, Melanie, Frank L. Heppner, Maria P. Lemos, Bernhard M. Odermatt, Norbert Goebels, Terri Laufer, Randolph J. Noelle, et Burkhard Becher. 2005. « Dendritic Cells Permit Immune Invasion of the CNS in an Animal Model of Multiple Sclerosis ». *Nature Medicine* 11 (3): 328-34. <https://doi.org/10.1038/nm1197>.
- Gu, Chunfang, Ling Wu, et Xiaoxia Li. 2013. « IL-17 Family: Cytokines, Receptors and Signaling ». *Cytokine* 64 (2): 477-85. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.07.022>.
- Gudi, Viktoria, Stefan Gingele, Thomas Skripuletz, et Martin Stangel. 2014. « Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2014.00073>.
- Haghighat Jahromi, Neda, Luca Marchetti, Federica Moalli, Donovan Duc, Camilla Basso, Heidi Tardent, Elisa Kaba, et al. 2020. « Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) and ICAM-2 Differentially Contribute to Peripheral Activation and CNS Entry of Autoaggressive Th1 and Th17 Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Frontiers in Immunology* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.03056>.
- Hallmann, Rupert, Melanie-Jane Hannocks, Jian Song, Xueli Zhang, Jacopo Di Russo, Anna-Liisa Luik, Miriam Burmeister, Hanna Gerwien, et Lydia Sorokin. 2020. « The Role of Basement

- Membrane Laminins in Vascular Function ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 127 (octobre): 105823. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105823>.
- Han, Hua, Kenji Tanigaki, Norio Yamamoto, Kazuki Kuroda, Momoko Yoshimoto, Tatsutoshi Nakahata, Koichi Ikuta, et Tasuku Honjo. 2002. « Inducible Gene Knockout of Transcription Factor Recombination Signal Binding Protein-J Reveals Its Essential Role in T versus B Lineage Decision ». *International Immunology* 14 (6): 637-45. <https://doi.org/10.1093/intimm/14.6.637>.
- Han, Xiaoning, Michael Chen, Fushun Wang, Martha Windrem, Su Wang, Steven Shanz, Qiwu Xu, et al. 2013. « Forebrain Engraftment by Human Glial Progenitor Cells Enhances Synaptic Plasticity and Learning in Adult Mice ». *Cell Stem Cell* 12 (3): 342-53. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.015>.
- Handel, Adam E., Alexander J. Williamson, Giulio Disanto, Ruth Dobson, Gavin Giovannoni, et Sreeram V. Ramagopalan. 2011. « Smoking and Multiple Sclerosis: An Updated Meta-Analysis ». *PLOS ONE* 6 (1): e16149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016149>.
- Hann, Christine L., Timothy F. Burns, Afshin Dowlati, Daniel Morgensztern, Patrick J. Ward, Martina M. Koch, Chris Chen, et al. 2021. « A Phase 1 Study Evaluating Rovalpituzumab Tesirine in Frontline Treatment of Patients With Extensive-Stage SCLC ». *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 16 (9): 1582-88. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.06.022>.
- Hasel, Philip, et Shane A. Liddelow. 2021. « Astrocytes ». *Current Biology* 31 (7): R326-27. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.056>.
- Hasel, Philip, Indigo V. L. Rose, Jessica S. Sadick, Rachel D. Kim, et Shane A. Liddelow. 2021. « Neuroinflammatory Astrocyte Subtypes in the Mouse Brain ». *Nature Neuroscience* 24 (10): 1475-87. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00905-6>.
- Hawkes, C. H. 2007. « Smoking Is a Risk Factor for Multiple Sclerosis: A Meta-analysis ». *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 13 (5): 610-15. <https://doi.org/10.1177/1352458506073501>.
- Hayes, Genevieve, Joana Pinto, Sierra N. Sparks, Congxiyu Wang, Sana Suri, et Daniel P. Bulte. 2022. « Vascular smooth muscle cell dysfunction in neurodegeneration ». *Frontiers in Neuroscience* 16. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2022.1010164>.
- Hedström, AK, M Bäärnhielm, T Olsson, et L Alfredsson. 2011. « Exposure to Environmental Tobacco Smoke Is Associated with Increased Risk for Multiple Sclerosis ». *Multiple Sclerosis Journal* 17 (7): 788-93. <https://doi.org/10.1177/1352458511399610>.
- Hellström, Mats, Li-Kun Phng, Jennifer J. Hofmann, Elisabet Wallgard, Leigh Coultas, Per Lindblom, Jackelyn Alva, et al. 2007. « Dll4 Signalling through Notch1 Regulates Formation of Tip Cells during Angiogenesis ». *Nature* 445 (7129): 776-80. <https://doi.org/10.1038/nature05571>.
- Hill, Robert A., Lei Tong, Peng Yuan, Sasidhar Murikinati, Shobhana Gupta, et Jaime Grutzendler. 2015. « Regional Blood Flow in the Normal and Ischemic Brain Is Controlled by Arteriolar Smooth Muscle Cell Contractility and Not by Capillary Pericytes ». *Neuron* 87 (1): 95-110. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.001>.
- Hojjat, Seyed-Parsa, Charles Grady Cantrell, Rita Vitorino, Anthony Feinstein, Zahra Shirzadi, Bradley J. MacIntosh, David E. Crane, et al. 2016. « Regional Reduction in Cortical Blood Flow among Cognitively Impaired Adults with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients ». *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 22 (11): 1421-28. <https://doi.org/10.1177/1352458515622696>.
- Hollier, Pierre-Louis, Candice Chapouly, Aissata Diop, Sarah Guimbal, Lauriane Cornuault, Alain-Pierre Gadeau, et Marie-Ange Renault. 2021. « Full-length Dhh and N-terminal Shh act as competitive antagonists to regulate angiogenesis and vascular permeability ». *Cardiovascular Research* 117 (12): 2489-2501. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa285>.
- Hori, Kazuya, Anindya Sen, et Spyros Artavanis-Tsakonas. 2013. « Notch signaling at a glance ». *Journal of Cell Science* 126 (10): 2135-40. <https://doi.org/10.1242/jcs.127308>.

- Hornig, Sam, Anthony Therattil, Sarah Moyon, Alexandra Gordon, Karla Kim, Azeb Tadesse Argaw, Yuko Hara, et al. 2017. « Astrocytic Tight Junctions Control Inflammatory CNS Lesion Pathogenesis ». *The Journal of Clinical Investigation* 127 (8): 3136-51. <https://doi.org/10.1172/JCI91301>.
- Horsssen, Jack van, Bianca P. Brink, Helga E. de Vries, Paul van der Valk, et Lars Bø. 2007. « The Blood-Brain Barrier in Cortical Multiple Sclerosis Lesions ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 66 (4): 321-28. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e318040b2de>.
- Hu, Zishuo Ian, Johanna C. Bendell, Andrea Bullock, Noelle K. LoConte, Hassan Hatoum, Paul Ritch, Hugo Hool, et al. 2019. « A Randomized Phase II Trial of Nab-Paclitaxel and Gemcitabine with Tarextumab or Placebo in Patients with Untreated Metastatic Pancreatic Cancer ». *Cancer Medicine* 8 (11): 5148-57. <https://doi.org/10.1002/cam4.2425>.
- Huppert, Jula, Dorothea Closhen, Andrew Croxford, Robin White, Paulina Kulig, Ewelina Pietrowski, Ingo Bechmann, et al. 2010. « Cellular Mechanisms of IL-17-Induced Blood-Brain Barrier Disruption ». *The FASEB Journal* 24 (4): 1023-34. <https://doi.org/10.1096/fj.09-141978>.
- Huseby, Eric S., Denny Liggitt, Thea Brabb, Bryan Schnabel, Claes Öhlén, et Joan Goverman. 2001. « A Pathogenic Role for Myelin-Specific Cd8+ T Cells in a Model for Multiple Sclerosis ». *Journal of Experimental Medicine* 194 (5): 669-76. <https://doi.org/10.1084/jem.194.5.669>.
- Ifergan, I., H. Kebir, J. I. Alvarez, G. Marceau, M. Bernard, L. Bourbonniere, J. Poirier, et al. 2011. « Central Nervous System Recruitment of Effector Memory CD8+ T Lymphocytes during Neuroinflammation Is Dependent on α 4 Integrin ». *Brain* 134 (12): 3560-77. <https://doi.org/10.1093/brain/awr268>.
- Igarashi, M., D. K. Dhar, H. Kubota, A. Yamamoto, O. El-Assal, et N. Nagasue. 1998. « The Prognostic Significance of Microvessel Density and Thymidine Phosphorylase Expression in Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus ». *Cancer* 82 (7): 1225-32. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19980401\)82:7<1225::aid-cnrc3>3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19980401)82:7<1225::aid-cnrc3>3.0.co;2-e).
- Ijichi, A., S. Sakuma, et P. J. Tofilon. 1995. « Hypoxia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Normal Rat Astrocyte Cultures ». *Glia* 14 (2): 87-93. <https://doi.org/10.1002/glia.440140203>.
- Ikenouchi, Junichi, Mikio Furuse, Kyoko Furuse, Hiroyuki Sasaki, Sachiko Tsukita, et Shoichiro Tsukita. 2005. « Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells ». *Journal of Cell Biology* 171 (6): 939-45. <https://doi.org/10.1083/jcb.200510043>.
- Ineichen, Benjamin V., Serhat V. Okar, Steven T. Proulx, Britta Engelhardt, Hans Lassmann, et Daniel S. Reich. 2022. « Perivascular Spaces and Their Role in Neuroinflammation ». *Neuron* 110 (21): 3566-81. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.024>.
- Ishibashi, M., K. Moriyoshi, Y. Sasai, K. Shiota, S. Nakanishi, et R. Kageyama. 1994. « Persistent Expression of Helix-Loop-Helix Factor HES-1 Prevents Mammalian Neural Differentiation in the Central Nervous System ». *The EMBO Journal* 13 (8): 1799-1805. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06448.x>.
- Jacobsen, Chad T., et Robert H. Miller. 2003. « Control of Astrocyte Migration in the Developing Cerebral Cortex ». *Developmental Neuroscience* 25 (2-4): 207-16. <https://doi.org/10.1159/000072269>.
- Jimeno, Antonio, Kathleen N. Moore, Michael Gordon, Rashmi Chugh, Jennifer R. Diamond, Raid Aljumaily, David Mendelson, et al. 2019. « A First-in-Human Phase 1a Study of the Bispecific Anti-DLL4/Anti-VEGF Antibody Navicixizumab (OMP-305B83) in Patients with Previously Treated Solid Tumors ». *Investigational New Drugs* 37 (3): 461-72. <https://doi.org/10.1007/s10637-018-0665-y>.
- Johe, K. K., T. G. Hazel, T. Muller, M. M. Dugich-Djordjevic, et R. D. McKay. 1996. « Single Factors Direct the Differentiation of Stem Cells from the Fetal and Adult Central Nervous System ». *Genes & Development* 10 (24): 3129-40. <https://doi.org/10.1101/gad.10.24.3129>.
- Johnson, Melissa L., Zanete Zvirbule, Konstantin Laktionov, Aslaug Helland, Byoung Chul Cho, Vanesa Gutierrez, Benoît Colinet, et al. 2021. « Rovalpituzumab Tesirine as a Maintenance Therapy

- After First-Line Platinum-Based Chemotherapy in Patients With Extensive-Stage-SCLC: Results From the Phase 3 MERU Study ». *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 16 (9): 1570-81.
<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.03.012>.
- Johnson, Thomas W., Ying Wu, Nabeela Nathoo, James A. Rogers, V. Wee Yong, et Jeff F. Dunn. 2016. « Gray Matter Hypoxia in the Brain of the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model of Multiple Sclerosis ». *PLOS ONE* 11 (12): e0167196.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167196>.
- Johnson-Léger, Caroline, et Beat A. Imhof. 2003. « Forging the Endothelium during Inflammation: Pushing at a Half-Open Door? ». *Cell and Tissue Research* 314 (1): 93-105.
<https://doi.org/10.1007/s00441-003-0775-4>.
- Kakuda, Shinako, et Robert S. Haltiwanger. 2017. « Deciphering the Fringe-Mediated Notch Code: Identification of Activating and Inhibiting Sites Allowing Discrimination between Ligands ». *Developmental Cell* 40 (2): 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.12.013>.
- Kang, Zizhen, Cengiz Zubeyir Altuntas, Muhammet Fatih Gulen, Caini Liu, Natalia Giltiyay, Hongwei Qin, Liping Liu, et al. 2010. « Astrocyte-Restricted Ablation of Interleukin-17-Induced Act1-Mediated Signaling Ameliorates Autoimmune Encephalomyelitis ». *Immunity* 32 (3): 414-25.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.03.004>.
- Kebir, Hania, Katharina Kreymborg, Igal Ifergan, Aurore Dodelet-Devillers, Romain Cayrol, Monique Bernard, Fabrizio Giuliani, Nathalie Arbour, Burkhard Becher, et Alexandre Prat. 2007. « Human TH17 Lymphocytes Promote Blood-Brain Barrier Disruption and Central Nervous System Inflammation ». *Nature Medicine* 13 (10): 1173-75. <https://doi.org/10.1038/nm1651>.
- Kerfoot, Steven M., M. Ursula Norman, Benoit M. Lapointe, Claudine S. Bonder, Lori Zbytnuik, et Paul Kubes. 2006. « Reevaluation of P-Selectin and $\alpha 4$ Integrin as Targets for the Treatment of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis1 ». *The Journal of Immunology* 176 (10): 6225-34. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.10.6225>.
- Kim, Hyunjin, Young-Min Lim, Geonwoo Kim, Eun-Jae Lee, Jeong Hyun Lee, Hye Weon Kim, et Kwang-Kuk Kim. 2020. « Choroid Plexus Changes on Magnetic Resonance Imaging in Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder ». *Journal of the Neurological Sciences* 415 (août): 116904. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.116904>.
- Kim, Roy Y., Alexandria S. Hoffman, Noriko Itoh, Yan Ao, Rory Spence, Michael V. Sofroniew, et Rhonda R. Voskuhl. 2014. « Astrocyte CCL2 Sustains Immune Cell Infiltration in Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Journal of Neuroimmunology* 274 (1-2): 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.06.009>.
- Kimberly, W. Taylor, Matthew J. LaVoie, Beth L. Ostaszewski, Wenjuan Ye, Michael S. Wolfe, et Dennis J. Selkoe. 2003. « γ -Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-1, and pen-2 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (11): 6382-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.1037392100>.
- Kirk, John, Jonnie Plumb, Meenakshi Mirakhur, et Stephen McQuaid. 2003. « Tight Junctional Abnormality in Multiple Sclerosis White Matter Affects All Calibres of Vessel and Is Associated with Blood-Brain Barrier Leakage and Active Demyelination ». *The Journal of Pathology* 201 (2): 319-27. <https://doi.org/10.1002/path.1434>.
- Kivisäkk, Pia, Don J. Mahad, Melissa K. Callahan, Corinna Trebst, Barbara Tucky, Tao Wei, Lijun Wu, et al. 2003. « Human Cerebrospinal Fluid Central Memory CD4+ T Cells: Evidence for Trafficking through Choroid Plexus and Meninges via P-Selectin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (14): 8389-94.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1433000100>.
- Klug, K.M., et M.A. Muskavitch. 1999. « Ligand-receptor interactions and trans-endocytosis of Delta, Serrate and Notch: members of the Notch signalling pathway in *Drosophila* ». *Journal of Cell Science* 112 (19): 3289-97. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.19.3289>.

- Knox, S. M., et J. M. Whitelock. 2006. « Perlecan: How Does One Molecule Do so Many Things? » *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 63 (21): 2435-45. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6162-z>.
- Koch-Henriksen, Nils, et Melinda Magyari. 2021. « Apparent Changes in the Epidemiology and Severity of Multiple Sclerosis ». *Nature Reviews Neurology* 17 (11): 676-88. <https://doi.org/10.1038/s41582-021-00556-y>.
- Koch-Henriksen, Nils, et Per Soelberg Sørensen. 2010. « The Changing Demographic Pattern of Multiple Sclerosis Epidemiology ». *The Lancet Neurology* 9 (5): 520-32. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70064-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70064-8).
- Kopan, Raphael, et Ma. Xenia G. Ilagan. 2009. « The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism ». *Cell* 137 (2): 216-33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.045>.
- Koukourakis, M. I., A. Giatromanolaki, K. J. O'Byrne, M. Comley, R. M. Whitehouse, D. C. Talbot, K. C. Gatter, et A. L. Harris. 1997. « Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor Expression Correlates with Tumour Angiogenesis and Prognosis in Non-Small-Cell Lung Cancer ». *British Journal of Cancer* 75 (4): 477-81. <https://doi.org/10.1038/bjc.1997.83>.
- Kratzer, Ingrid, Alexandre Vasiljevic, Catherine Rey, Michelle Fevre-Montange, Norman Saunders, Nathalie Strazielle, et Jean-François Ghersi-Egea. 2012. « Complexity and Developmental Changes in the Expression Pattern of Claudins at the Blood–CSF Barrier ». *Histochemistry and Cell Biology* 138 (6): 861-79. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-1001-9>.
- Krzysiek, Roman, Eric A. Lefevre, Jérôme Bernard, Arnaud Foussat, Pierre Galanaud, Fawzia Louache, et Yolande Richard. 2000. « Regulation of CCR6 Chemokine Receptor Expression and Responsiveness to Macrophage Inflammatory Protein-3 α /CCL20 in Human B Cells ». *Blood* 96 (7): 2338-45. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.7.2338>.
- Kuri, Ashvin, Nicola Vickaryous, Amine Awad, Benjamin Meir Jacobs, et Ruth Dobson. 2022. « Vitamin D Genetic Risk Scores in Multiple Sclerosis ». *Journal of Neurology*, novembre. <https://doi.org/10.1007/s00415-022-11466-4>.
- Kwon, E. E., et J. W. Prineas. 1994. « Blood-Brain Barrier Abnormalities in Longstanding Multiple Sclerosis Lesions. An Immunohistochemical Study ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 53 (6): 625-36. <https://doi.org/10.1097/00005072-199411000-00010>.
- Ladi, Ena, James T. Nichols, Weihong Ge, Alison Miyamoto, Christine Yao, Liang-Tung Yang, Jim Boulter, Yi E. Sun, Chris Kintner, et Gerry Weinmaster. 2005. « The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands ». *Journal of Cell Biology* 170 (6): 983-92. <https://doi.org/10.1083/jcb.200503113>.
- Lampugnani, Maria Grazia, Elisabetta Dejana, et Costanza Giampietro. 2018. « Vascular Endothelial (VE)-Cadherin, Endothelial Adherens Junctions, and Vascular Disease ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (10): a029322. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029322>.
- Larsson, Catharina, Michael Lardelli, Irene White, et Urban Lendahl. 1994. « The Human NOTCH1, 2, and 3 Genes Are Located at Chromosome Positions 9q34, 1p13-P11, and 19p13.2-P13.1 in Regions of Neoplasia-Associated Translocation ». *Genomics* 24 (2): 253-58. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1613>.
- Lassmann, Hans. 2018. « Multiple Sclerosis Pathology ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8 (3): a028936. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028936>.
- Lassmann, Hans, et Monika Bradl. 2017. « Multiple Sclerosis: Experimental Models and Reality ». *Acta Neuropathologica* 133 (2): 223-44. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1631-4>.
- Law, Meng, Amit M. Saindane, Yulin Ge, James S. Babb, Glyn Johnson, Lois J. Mannon, Joseph Herbert, et Robert I. Grossman. 2004. « Microvascular Abnormality in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: Perfusion MR Imaging Findings in Normal-appearing White Matter ». *Radiology* 231 (3): 645-52. <https://doi.org/10.1148/radiol.2313030996>.

- LeBon, Lauren, Tom V Lee, David Sprinzak, Hamed Jafar-Nejad, et Michael B Elowitz. 2014. « Fringe proteins modulate Notch-ligand cis and trans interactions to specify signaling states ». Édité par Helen McNeill. *eLife* 3 (septembre): e02950. <https://doi.org/10.7554/eLife.02950>.
- Lee, Meredith L., Zila Martinez-Lozada, Elizabeth N. Krizman, et Michael B. Robinson. 2017. « Brain Endothelial Cells Induce Astrocytic Expression of the Glutamate Transporter GLT-1 by a Notch-Dependent Mechanism ». *Journal of Neurochemistry* 143 (5): 489-506. <https://doi.org/10.1111/jnc.14135>.
- Levison, Steven W., et James E. Goldman. 1993. « Both Oligodendrocytes and Astrocytes Develop from Progenitors in the Subventricular Zone of Postnatal Rat Forebrain ». *Neuron* 10 (2): 201-12. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90311-E](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90311-E).
- Li, Lan, Guangjun Lin, Huizi Gu, Lei Yu, et Changwei Ni. 2019. « Effects of Srxn1 on growth and Notch signalling of astrocyte induced by hydrogen peroxide ». *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 47 (1): 1917-23. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1614016>.
- Li, Linheng, Guyang M. Huang, Amy B. Banta, Yu Deng, Todd Smith, Penny Dong, Cynthia Friedman, et al. 1998. « Cloning, Characterization, and the Complete 56.8-Kilobase DNA Sequence of the Human NOTCH4 Gene ». *Genomics* 51 (1): 45-58. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5330>.
- Li, Qingyun, et Ben A. Barres. 2018. « Microglia and Macrophages in Brain Homeostasis and Disease ». *Nature Reviews Immunology* 18 (4): 225-42. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.125>.
- Li, Qiong, Shanshan Yu, Jingxian Wu, Yanyang Zou, et Yong Zhao. 2013. « Sulfiredoxin-1 Protects PC12 Cells against Oxidative Stress Induced by Hydrogen Peroxide ». *Journal of Neuroscience Research* 91 (6): 861-70. <https://doi.org/10.1002/jnr.23218>.
- Li, Yue-Ming, Min Xu, Ming-Tain Lai, Qian Huang, José L. Castro, Jillian DiMuzio-Mower, Timothy Harrison, et al. 2000. « Photoactivated γ -Secretase Inhibitors Directed to the Active Site Covalently Label Presenilin 1 ». *Nature* 405 (6787): 689-94. <https://doi.org/10.1038/35015085>.
- Liddelow, Shane A., Kevin A. Guttenplan, Laura E. Clarke, Frederick C. Bennett, Christopher J. Bohlen, Lucas Schirmer, Mariko L. Bennett, et al. 2017. « Neurotoxic Reactive Astrocytes Are Induced by Activated Microglia ». *Nature* 541 (7638): 481-87. <https://doi.org/10.1038/nature21029>.
- Liddelow, Shane A., Sally Temple, Kjeld Møllgård, Renate Gehwolf, Andrea Wagner, Hannelore Bauer, Hans-Christian Bauer, Timothy N. Phoenix, Katarzyna M. Dziegielewska, et Norman R. Saunders. 2012. « Molecular Characterisation of Transport Mechanisms at the Developing Mouse Blood–CSF Interface: A Transcriptome Approach ». Édité par Maria A. Deli. *PLoS ONE* 7 (3): e33554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033554>.
- Limbourg, Florian P., Kyosuke Takeshita, Freddy Radtke, Roderick T. Bronson, Michael T. Chin, et James K. Liao. 2005. « Essential Role of Endothelial Notch1 in Angiogenesis ». *Circulation* 111 (14): 1826-32. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000160870.93058.DD>.
- Lindner, Volkhard, Christina Booth, Igor Prudovsky, Deena Small, Thomas Maciag, et Lucy Liaw. 2001. « Members of the Jagged/Notch Gene Families Are Expressed in Injured Arteries and Regulate Cell Phenotype via Alterations in Cell Matrix and Cell-Cell Interaction ». *The American Journal of Pathology* 159 (3): 875-83. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61763-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61763-4).
- Liu, Chong, Dongxiao Li, Cui Lv, Zhisong Gao, Yinkuang Qi, Hongran Wu, Yunyun Tian, et Yansu Guo. 2020. « Activation of the Notch Signaling Pathway and Cellular Localization of Notch Signaling Molecules in the Spinal Cord of SOD1-G93A ALS Model Mice ». *Neuroscience* 432 (avril): 84-93. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.02.034>.
- Liu, Hua, Simone Kennard, et Brenda Lilly. 2009. « NOTCH3 Expression Is Induced in Mural Cells through an Autoregulatory Loop That Requires Endothelial-Expressed JAGGED1 ». *Circulation Research* 104 (4): 466-75. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.184846>.
- Liu, Tingyan, Caiyan Zhang, Jiayun Ying, Yaodong Wang, Gangfeng Yan, Yufeng Zhou, et Guoping Lu. 2023. « Inhibition of the intracellular domain of Notch1 results in vascular endothelial cell

- dysfunction in sepsis ». *Frontiers in Immunology* 14.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1134556>.
- Liu, Xiaomei, Feng Zhou, Weixiao Wang, Guofang Chen, Qingxiu Zhang, Ruixue Lv, Zijun Zhao, et al. 2021. « IL-9-Triggered LncRNA Gm13568 Regulates Notch1 in Astrocytes through Interaction with CBP/P300: Contribute to the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Journal of Neuroinflammation* 18 (1): 1-15.
<https://doi.org/10.1186/s12974-021-02156-5>.
- Louvi, Angeliki, et Spyros Artavanis-Tsakonas. 2006. « Notch Signalling in Vertebrate Neural Development ». *Nature Reviews Neuroscience* 7 (2): 93-102.
<https://doi.org/10.1038/nrn1847>.
- Lu, Pengfei, Yidong Wang, Yang Liu, Yifeng Wang, Bingruo Wu, Deyou Zheng, Richard P. Harvey, et Bin Zhou. 2021. « Perinatal Angiogenesis from Pre-Existing Coronary Vessels via DLL4-NOTCH1 Signalling ». *Nature Cell Biology* 23 (9): 967-77. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00747-1>.
- Lublin, Fred D., Timothy Coetzee, Jeffrey A. Cohen, Ruth A. Marrie, Alan J. Thompson, et on behalf of the International Advisory Committee on Clinical Trials in Ms. 2020. « The 2013 Clinical Course Descriptors for Multiple Sclerosis: A Clarification ». *Neurology* 94 (24): 1088-92.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000009636>.
- Lublin, Fred D., et Stephen C. Reingold. 1996. « Defining the Clinical Course of Multiple Sclerosis: Results of an International Survey ». *Neurology* 46 (4): 907-11.
<https://doi.org/10.1212/WNL.46.4.907>.
- Lublin, Fred D., Stephen C. Reingold, Jeffrey A. Cohen, Gary R. Cutter, Per Soelberg Sørensen, Alan J. Thompson, Jerry S. Wolinsky, et al. 2014. « Defining the Clinical Course of Multiple Sclerosis: The 2013 Revisions ». *Neurology* 83 (3): 278-86.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000560>.
- Luissint, Anny-Claude, Cédric Artus, Fabienne Glacial, Kayathiri Ganeshamoorthy, et Pierre-Olivier Couraud. 2012. « Tight Junctions at the Blood Brain Barrier: Physiological Architecture and Disease-Associated Dysregulation ». *Fluids and Barriers of the CNS* 9 (1): 23.
<https://doi.org/10.1186/2045-8118-9-23>.
- Luscinskas, Francis W, Shuo Ma, Asma Nusrat, Charles A Parkos, et Sunil K Shaw. 2002. « Leukocyte Transendothelial Migration: A Junctional Affair ». *Seminars in Immunology* 14 (2): 105-13.
<https://doi.org/10.1006/smim.2001.0347>.
- Ma, Shang, Hyo Jun Kwon, Heidi Johng, Keling Zang, et Zhen Huang. 2013. « Radial Glial Neural Progenitors Regulate Nascent Brain Vascular Network Stabilization via Inhibition of Wnt Signaling ». *PLoS Biology* 11 (1): e1001469. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001469>.
- Ma, Xiaoxing, Anna Drannik, Fan Jiang, Randy Peterson, et John Turnbull. 2017. « Crosstalk between Notch and Sonic Hedgehog Signaling in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *NeuroReport* 28 (3): 141. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000725>.
- Mabie, P. C., M. F. Mehler, R. Marmur, A. Papavasiliou, Q. Song, et J. A. Kessler. 1997. « Bone Morphogenetic Proteins Induce Astroglial Differentiation of Oligodendroglial–Astroglial Progenitor Cells ». *Journal of Neuroscience* 17 (11): 4112-20.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-11-04112.1997>.
- Machado-Santos, Joana, Etsuji Saji, Anna R. Tröscher, Manuela Paunovic, Roland Liblau, Galina Gabriely, Christian G. Bien, Jan Bauer, et Hans Lassmann. 2018. « The Compartmentalized Inflammatory Response in the Multiple Sclerosis Brain Is Composed of Tissue-Resident CD8+ T Lymphocytes and B Cells ». *Brain: A Journal of Neurology* 141 (7): 2066-82.
<https://doi.org/10.1093/brain/awy151>.
- Machuca-Parra, Arturo I., Alexander A. Bigger-Allen, Angie V. Sanchez, Anissa Boutabla, Jonathan Cardona-Vélez, Dhanesh Amarnani, Magali Saint-Geniez, et al. 2017. « Therapeutic Antibody Targeting of Notch3 Signaling Prevents Mural Cell Loss in CADASIL ». *The Journal of Experimental Medicine* 214 (8): 2271-82. <https://doi.org/10.1084/jem.20161715>.

- Maeda, K., Y.-S. Chung, Y. Ogawa, S. Takatsuka, S.-M. Kang, M. Ogawa, T. Sawada, N. Onoda, Y. Kato, et M. Sowa. 1996. « Thymidine Phosphorylase/Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor Expression Associated with Hepatic Metastasis in Gastric Carcinoma ». *British Journal of Cancer* 73 (8): 884-88. <https://doi.org/10.1038/bjc.1996.177>.
- Magnusson, Jens P., Christian Göritz, Jemal Tatarishvili, David O. Dias, Emma M. K. Smith, Olle Lindvall, Zaal Kokaia, et Jonas Frisén. 2014. « A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse ». *Science* 346 (6206): 237-41. <https://doi.org/10.1126/science.346.6206.237>.
- Maillard, Ivan, Ute Koch, Alexis Dumortier, Olga Shestova, Lanwei Xu, Hong Sai, Seth E. Pross, et al. 2008. « Canonical Notch Signaling Is Dispensable for the Maintenance of Adult Hematopoietic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 2 (4): 356-66. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.02.011>.
- Maimone, Davide, Gian Carlo Guazzi, et Pasquale Annunziata. 1997. « IL-6 Detection in Multiple Sclerosis Brain ». *Journal of the Neurological Sciences* 146 (1): 59-65. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(96\)00283-3](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(96)00283-3).
- Maki, Wusi, Romeo E. Morales, Virginia A. Carroll, William G. Telford, Randall N. Knibbs, Lloyd M. Stoolman, et Sam T. Hwang. 2002. « CCR6 Colocalizes with CD18 and Enhances Adhesion to Activated Endothelial Cells in CCR6-Transduced Jurkat T Cells ». *The Journal of Immunology* 169 (5): 2346-53. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.5.2346>.
- Mancini, Stéphane J. C., Ned Mantei, Alexis Dumortier, Ueli Suter, H. Robson MacDonald, et Freddy Radtke. 2005. « Jagged1-Dependent Notch Signaling Is Dispensable for Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation ». *Blood* 105 (6): 2340-42. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3207>.
- Margadant, Coert. 2020. « Positive and Negative Feedback Mechanisms Controlling Tip/Stalk Cell Identity during Sprouting Angiogenesis ». *Angiogenesis* 23 (2): 75-77. <https://doi.org/10.1007/s10456-020-09706-0>.
- Martin-Padura, Inés, Susan Lostaglio, Markus Schneemann, Lisa Williams, Maria Romano, Paolo Fruscella, Carla Panzeri, et al. 1998. « Junctional Adhesion Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily That Distributes at Intercellular Junctions and Modulates Monocyte Transmigration ». *Journal of Cell Biology* 142 (1): 117-27. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.1.117>.
- Mathewson, Alen James, et Martin Berry. 1985. « Observations on the Astrocyte Response to a Cerebral Stab Wound in Adult Rats ». *Brain Research* 327 (1): 61-69. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)91499-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)91499-4).
- Mathiisen, Thomas Misje, Knut Petter Lehre, Niels Christian Danbolt, et Ole Petter Ottersen. 2010. « The Perivascular Astroglial Sheath Provides a Complete Covering of the Brain Microvessels: An Electron Microscopic 3D Reconstruction ». *Glia* 58 (9): 1094-1103. <https://doi.org/10.1002/glia.20990>.
- Mazaré, Noémie, Marc Oudart, et Martine Cohen-Salmon. 2021. « Local translation in perisynaptic and perivascular astrocytic processes – a means to ensure astrocyte molecular and functional polarity? » *Journal of Cell Science* 134 (2): jcs251629. <https://doi.org/10.1242/jcs.251629>.
- McDonnell, G. V., S. A. McMillan, J. P. Douglas, A. G. Droogan, et S. A. Hawkins. 1999. « Serum Soluble Adhesion Molecules in Multiple Sclerosis: Raised SVCAM-1, SICAM-1 and SE-Selectin in Primary Progressive Disease ». *Journal of Neurology* 246 (2): 87-92. <https://doi.org/10.1007/s004150050313>.
- Meares, Gordon P., Xiangyu Ma, Hongwei Qin, et Etty N. Benveniste. 2012. « Regulation of CCL20 Expression in Astrocytes by IL-6 and IL-17 ». *Glia* 60 (5): 771-81. <https://doi.org/10.1002/glia.22307>.
- Medaer, R. 1979. « Does the History of Multiple Sclerosis Go Back as Far as the 14th Century? » *Acta Neurologica Scandinavica* 60 (3): 189-92. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1979.tb02968.x>.

- Meiron, Moran, Yaniv Zohar, Rachel Anunu, Gizi Wildbaum, et Nathan Karin. 2008. « CXCL12 (SDF-1 α) Suppresses Ongoing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Selecting Antigen-Specific Regulatory T Cells ». *Journal of Experimental Medicine* 205 (11): 2643-55. <https://doi.org/10.1084/jem.20080730>.
- Meng, Lingzhong, Wugang Hou, Jason Chui, Ruquan Han, et Adrian W. Gelb. 2015. « Cardiac Output and Cerebral Blood Flow: The Integrated Regulation of Brain Perfusion in Adult Humans ». *Anesthesiology* 123 (5): 1198-1208. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000872>.
- Miller, R. H., et M. C. Raff. 1984. « Fibrous and Protoplasmic Astrocytes Are Biochemically and Developmentally Distinct ». *Journal of Neuroscience* 4 (2): 585-92. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.04-02-00585.1984>.
- Mills Ko, Emily, Joyce H. Ma, Fuzheng Guo, Laird Miers, Eunyoung Lee, Peter Bannerman, Travis Burns, et al. 2014. « Deletion of Astroglial CXCL10 Delays Clinical Onset but Does Not Affect Progressive Axon Loss in a Murine Autoimmune Multiple Sclerosis Model ». *Journal of Neuroinflammation* 11 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-105>.
- Mineta, Katsuhiko, Yasuko Yamamoto, Yuji Yamazaki, Hiroo Tanaka, Yukiyo Tada, Kuniaki Saito, Atsushi Tamura, et al. 2011. « Predicted Expansion of the Claudin Multigene Family ». *FEBS Letters* 585 (4): 606-12. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.01.028>.
- Mohr, O. L. 1919. « Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila* ». *Genetics* 4 (3): 275-82. <https://doi.org/10.1093/genetics/4.3.275>.
- Molofsky, Anna Victoria, et Benjamin Deneen. 2015. « Astrocyte Development: A Guide for the Perplexed ». *Glia* 63 (8): 1320-29. <https://doi.org/10.1002/glia.22836>.
- Mora, Pierre, Pierre-Louis Hollier, Sarah Guimbal, Alice Abelanet, Aïssata Diop, Lauriane Cornuault, Thierry Couffinhal, et al. 2020. « Blood–Brain Barrier Genetic Disruption Leads to Protective Barrier Formation at the Glia Limitans ». Édité par Richard Daneman. *PLOS Biology* 18 (11): e3000946. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000946>.
- Mues, Marsilius, Ingo Bartholomäus, Thomas Thestrup, Oliver Griesbeck, Hartmut Wekerle, Naoto Kawakami, et Gurumoorthy Krishnamoorthy. 2013. « Real-Time in Vivo Analysis of T Cell Activation in the Central Nervous System Using a Genetically Encoded Calcium Indicator ». *Nature Medicine* 19 (6): 778-83. <https://doi.org/10.1038/nm.3180>.
- Mulligan, Sean J., et Brian A. MacVicar. 2004. « Calcium Transients in Astrocyte Endfeet Cause Cerebrovascular Constrictions ». *Nature* 431 (7005): 195-99. <https://doi.org/10.1038/nature02827>.
- Mundt, Sarah, Melanie Greter, Alexander Flügel, et Burkhard Becher. 2019. « The CNS Immune Landscape from the Viewpoint of a T Cell ». *Trends in Neurosciences* 42 (10): 667-79. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.07.008>.
- Munoz, J. J., C. C. A. Bernard, et I. R. Mackay. 1984. « Elicitation of Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) in Mice with the Aid of Pertussigen ». *Cellular Immunology* 83 (1): 92-100. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(84\)90228-4](https://doi.org/10.1016/0008-8749(84)90228-4).
- Murphy, Áine C., Stephen J. Lalor, Marina A. Lynch, et Kingston H. G. Mills. 2010. « Infiltration of Th1 and Th17 Cells and Activation of Microglia in the CNS during the Course of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Brain, Behavior, and Immunity* 24 (4): 641-51. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.01.014>.
- Murphy, Patrick A., Michael T. Y. Lam, Xiaoqing Wu, Tyson N. Kim, Shant M. Vartanian, Andrew W. Bollen, Timothy R. Carlson, et Rong A. Wang. 2008. « Endothelial Notch4 Signaling Induces Hallmarks of Brain Arteriovenous Malformations in Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (31): 10901-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802743105>.
- Nabeshima, S., T. S. Reese, D. M. Landis, et M. W. Brightman. 1975. « Junctions in the Meninges and Marginal Glia ». *The Journal of Comparative Neurology* 164 (2): 127-69. <https://doi.org/10.1002/cne.901640202>.

- Nadeem, Taliha, Wil Bogue, Bianca Bigit, et Henar Cuervo. 2020. « Deficiency of Notch Signaling in Pericytes Results in Arteriovenous Malformations ». *JCI Insight* 5 (21). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.125940>.
- Nemeth, Daniel, Numana Luqman, Loretta Chen, et Ning Quan. 2023. « Aldh1l1-Cre/ER T2 Is Expressed in Unintended Cell Types of the Salivary Gland, Pancreas, and Spleen ». *MicroPublication Biology* 2023. <https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000832>.
- Nielsen, Corinne M., Xuetao Zhang, Kunal Raygor, Shaoxun Wang, Andrew W. Bollen, et Rong A. Wang. 2023. « Endothelial Rbpj Deletion Normalizes Notch4-Induced Brain Arteriovenous Malformation in Mice ». *The Journal of Experimental Medicine* 220 (2): e20211390. <https://doi.org/10.1084/jem.20211390>.
- Nonneman, Annelies, Nathan Criem, Sebastian A. Lewandowski, Rik Nuyts, Dietmar R. Thal, Frank W. Pfrieger, John Ravits, et al. 2018. « Astrocyte-Derived Jagged-1 Mitigates Deleterious Notch Signaling in Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *Neurobiology of Disease* 119 (novembre): 26-40. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.07.012>.
- Ohtsuka, Toshiyuki, Masami Sakamoto, François Guillemot, et Ryoichiro Kageyama. 2001. « Roles of the Basic Helix-Loop-Helix Genes Hes1 and Hes5 in Expansion of Neural Stem Cells of the Developing Brain* ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (32): 30467-74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102420200>.
- Ohuchi, Kazuki, Michinori Funato, Zenichiro Kato, Junko Seki, Chizuru Kawase, Yuya Tamai, Yoko Ono, et al. 2016. « Established Stem Cell Model of Spinal Muscular Atrophy Is Applicable in the Evaluation of the Efficacy of Thyrotropin-Releasing Hormone Analog ». *Stem Cells Translational Medicine* 5 (2): 152-63. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0059>.
- Ohuchi, Kazuki, Michinori Funato, Yuta Yoshino, Shiori Ando, Satoshi Inagaki, Arisu Sato, Chizuru Kawase, et al. 2019. « Notch Signaling Mediates Astrocyte Abnormality in Spinal Muscular Atrophy Model Systems ». *Scientific Reports* 9 (1): 3701. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39788-w>.
- Okuda, Y., S. Sakoda, C. C. Bernard, H. Fujimura, Y. Saeki, T. Kishimoto, et T. Yanagihara. 1998. « IL-6-Deficient Mice Are Resistant to the Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Provoked by Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein ». *International Immunology* 10 (5): 703-8. <https://doi.org/10.1093/intimm/10.5.703>.
- Olerup, O., et J. Hillert. 1991. « HLA Class II-Associated Genetic Susceptibility in Multiple Sclerosis: A Critical Evaluation ». *Tissue Antigens* 38 (1): 1-15. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1991.tb02029.x>.
- Palmeri, Diana, Annemieke van Zante, Chiao-Chain Huang, Stefan Hemmerich, et Steven D. Rosen. 2000. « Vascular Endothelial Junction-Associated Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily, Is Localized to Intercellular Boundaries of Endothelial Cells* ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (25): 19139-45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003189200>.
- Park, Calvin, Gerald Ponath, Maya Levine-Ritterman, Edward Bull, Eric C. Swanson, Philip L. De Jager, Benjamin M. Segal, et David Pitt. 2019. « The landscape of myeloid and astrocyte phenotypes in acute multiple sclerosis lesions ». *Acta Neuropathologica Communications* 7 (1): 130. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0779-2>.
- Parnell, Grant P., et David R. Booth. 2017. « The Multiple Sclerosis (MS) Genetic Risk Factors Indicate Both Acquired and Innate Immune Cell Subsets Contribute to MS Pathogenesis and Identify Novel Therapeutic Opportunities ». *Frontiers in Immunology* 8 (avril). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00425>.
- Patel, Anant B., James CK Lai, Golam M. I. Chowdhury, Fahmeed Hyder, Douglas L. Rothman, Robert G. Shulman, et Kevin L. Behar. 2014. « Direct Evidence for Activity-Dependent Glucose Phosphorylation in Neurons with Implications for the Astrocyte-to-Neuron Lactate Shuttle ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (14): 5385-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403576111>.

- Patel, Jigisha R., Jessica L. Williams, Megan M. Muccigrosso, Lainya Liu, Tao Sun, Joshua B. Rubin, et Robyn S. Klein. 2012. « Astrocyte TNFR2 Is Required for CXCL12-Mediated Regulation of Oligodendrocyte Progenitor Proliferation and Differentiation within the Adult CNS ». *Acta Neuropathologica* 124 (6): 847-60. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1034-0>.
- Paterson, Philip Y. 1960. « Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells ». *Journal of Experimental Medicine* 111 (1): 119-36. <https://doi.org/10.1084/jem.111.1.119>.
- Paul, Debayon, Shujun Ge, Yen Lemire, Evan R. Jellison, David R. Serwanski, Nancy H. Ruddle, et Joel S. Pachter. 2014. « Cell-Selective Knockout and 3D Confocal Image Analysis Reveals Separate Roles for Astrocyte-and Endothelial-Derived CCL2 in Neuroinflammation ». *Journal of Neuroinflammation* 11 (1): 1-16. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-10>.
- Pellerin, L., et P. J. Magistretti. 1994. « Glutamate Uptake into Astrocytes Stimulates Aerobic Glycolysis: A Mechanism Coupling Neuronal Activity to Glucose Utilization ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (22): 10625-29. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10625>.
- Peruzzo, Denis, Marco Castellaro, Massimiliano Calabrese, Elisa Veronese, Francesca Rinaldi, Valentina Bernardi, Alice Favaretto, Paolo Gallo, et Alessandra Bertoldo. 2013. « Heterogeneity of Cortical Lesions in Multiple Sclerosis: An MRI Perfusion Study ». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 33 (3): 457-63. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.192>.
- Peters, Alan, Sanford L. Palay, et Henry deF Webster. 1976. *The Fine Structure of the Nervous System: The Neurons and Supporting Cells*. Saunders.
- Peterson, John W., Lars Bö, Sverre Mörk, Ansi Chang, et Bruce D. Trapp. 2001. « Transected Neurites, Apoptotic Neurons, and Reduced Inflammation in Cortical Multiple Sclerosis Lesions ». *Annals of Neurology* 50 (3): 389-400. <https://doi.org/10.1002/ana.1123>.
- Pierson, Emily, Sarah B. Simmons, Luca Castelli, et Joan M. Goverman. 2012. « Mechanisms Regulating Regional Localization of Inflammation during CNS Autoimmunity ». *Immunological Reviews* 248 (1): 205-15. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01126.x>.
- Pigott, R., L.P. Dillon, I.H. Hemingway, et A.J.H. Gearing. 1992. « Soluble Forms of E-Selectin, ICAM-1 and VCAM-1 Are Present in the Supernatants of Cytokine Activated Cultured Endothelial Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 187 (2): 584-89. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(92\)91234-H](https://doi.org/10.1016/0006-291X(92)91234-H).
- Pitman, M., B. Emery, M. Binder, S. Wang, H. Butzkueven, et T. J. Kilpatrick. 2004. « LIF Receptor Signaling Modulates Neural Stem Cell Renewal ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 27 (3): 255-66. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.07.004>.
- Plumb, J, S McQuaid, A K Cross, J Surr, G Haddock, R AD Bunning, et M N Woodroffe. 2006. « Upregulation of ADAM-17 Expression in Active Lesions in Multiple Sclerosis ». *Multiple Sclerosis Journal* 12 (4): 375-85. <https://doi.org/10.1191/135248506ms1276oa>.
- Prajeeth, Chittappen K., Julius Kronisch, Reza Khorooshi, Benjamin Knier, Henrik Toft-Hansen, Viktoria Gudi, Stefan Floess, et al. 2017. « Effectors of Th1 and Th17 Cells Act on Astrocytes and Augment Their Neuroinflammatory Properties ». *Journal of Neuroinflammation* 14 (1): 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0978-3>.
- Proctor, John M., Keling Zang, Denan Wang, Rong Wang, et Louis F. Reichardt. 2005. « Vascular Development of the Brain Requires B8 Integrin Expression in the Neuroepithelium ». *The Journal of Neuroscience* 25 (43): 9940-48. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3467-05.2005>.
- Proebstl, Doris, Mathieu-Benoît Voisin, Abigail Woodfin, James Whiteford, Fulvio D'Acquisto, Gareth E. Jones, David Rowe, et Sussan Nourshargh. 2012. « Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo ». *Journal of Experimental Medicine* 209 (6): 1219-34. <https://doi.org/10.1084/jem.20111622>.
- Proescholdt, M. A., J. D. Heiss, S. Walbridge, J. Mühlhauser, M. C. Capogrossi, E. H. Oldfield, et M. J. Merrill. 1999. « Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Modulates Vascular Permeability

- and Inflammation in Rat Brain ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 58 (6): 613-27. <https://doi.org/10.1097/00005072-199906000-00006>.
- Proescholdt, Martin A., Steven Jacobson, Nancy Tresser, Edward H. Oldfield, et Marsha J. Merrill. 2002. « Vascular Endothelial Growth Factor Is Expressed in Multiple Sclerosis Plaques and Can Induce Inflammatory Lesions in Experimental Allergic Encephalomyelitis Rats ». *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 61 (10): 914-25. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.10.914>.
- Pui, J. C., D. Allman, L. Xu, S. DeRocco, F. G. Karnell, S. Bakkour, J. Y. Lee, et al. 1999. « Notch1 Expression in Early Lymphopoiesis Influences B versus T Lineage Determination ». *Immunity* 11 (3): 299-308. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80105-3](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80105-3).
- Qian, Dingfei, Linwei Li, Yuluo Rong, Wei Liu, Qian Wang, Zheng Zhou, Changjiang Gu, et al. 2019. « Blocking Notch signal pathway suppresses the activation of neurotoxic A1 astrocytes after spinal cord injury ». *Cell Cycle* 18 (21): 3010-29. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1667189>.
- Radtke, Freddy, Anne Wilson, Gerlinde Stark, Michelle Bauer, Joost van Meerwijk, H. Robson MacDonald, et Michel Aguet. 1999. « Deficient T Cell Fate Specification in Mice with an Induced Inactivation of Notch1 ». *Immunity* 10 (5): 547-58. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80054-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80054-0).
- Ramón y Cajal, Santiago, et Raoul M. May. 1928. *Degeneration & Regeneration of the Nervous System*. London: Oxford University Press, Humphrey Milford.
- Reboldi, Andrea, Caroline Coisne, Dirk Baumjohann, Federica Benvenuto, Denise Bottinelli, Sergio Lira, Antonio Uccelli, Antonio Lanzavecchia, Britta Engelhardt, et Federica Sallusto. 2009. « C-C Chemokine Receptor 6–Regulated Entry of TH-17 Cells into the CNS through the Choroid Plexus Is Required for the Initiation of EAE ». *Nature Immunology* 10 (5): 514-23. <https://doi.org/10.1038/ni.1716>.
- Ribeiro, Tais Novaki, Lina Maria Delgado-García, et Marimelia A. Porcionatto. 2021. « Notch1 and Galectin-3 Modulate Cortical Reactive Astrocyte Response After Brain Injury ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.649854>.
- Ricigliano, Vito A. G., Emanuele Morena, Annalisa Colombi, Matteo Tonietto, Mariem Hamzaoui, Emilie Poirion, Michel Bottlaender, et al. 2021. « Choroid Plexus Enlargement in Inflammatory Multiple Sclerosis: 3.0-T MRI and Translocator Protein PET Evaluation ». *Radiology* 301 (1): 166-77. <https://doi.org/10.1148/radiol.2021204426>.
- Rivers, Thomas M., et Francis F. Schwentker. 1935. « Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys ». *The Journal of Experimental Medicine* 61 (5): 689-702.
- Rodríguez-Lorenzo, Sabela, Julia Konings, Susanne van der Pol, Alwin Kamermans, Sandra Amor, Jack van Horssen, Maarten E. Witte, Gijs Kooij, et Helga E. de Vries. 2020. « Inflammation of the choroid plexus in progressive multiple sclerosis: accumulation of granulocytes and T cells ». *Acta Neuropathologica Communications* 8 (1): 9. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-0885-1>.
- Rosen, Lee S., Robert Wesolowski, Raffaele Baffa, Kai-Hsin Liao, Steven Y. Hua, Brenda L. Gibson, Steven Pirie-Shepherd, et Anthony W. Tolcher. 2020. « A Phase I, Dose-Escalation Study of PF-06650808, an Anti-Notch3 Antibody–Drug Conjugate, in Patients with Breast Cancer and Other Advanced Solid Tumors ». *Investigational New Drugs* 38 (1): 120-30. <https://doi.org/10.1007/s10637-019-00754-y>.
- Saade, C., R. Bou-Fakhredin, D. M. Yousem, K. Asmar, L. Naffaa, et F. El-Merhi. 2018. « Gadolinium and Multiple Sclerosis: Vessels, Barriers of the Brain, and Glymphatics ». *American Journal of Neuroradiology* 39 (12): 2168-76. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A5773>.
- Sadick, Jessica S., Michael R. O’Dea, Philip Hasel, Taitea Dykstra, Arline Faustin, et Shane A. Liddel. 2022. « Astrocytes and Oligodendrocytes Undergo Subtype-Specific Transcriptional Changes

- in Alzheimer's Disease ». *Neuron* 110 (11): 1788-1805.e10.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.03.008>.
- Sado, Y., M. Kagawa, I. Naito, Y. Ueki, T. Seki, R. Momota, T. Oohashi, et Y. Ninomiya. 1998.
 « Organization and Expression of Basement Membrane Collagen IV Genes and Their Roles in Human Disorders ». *Journal of Biochemistry* 123 (5): 767-76.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022003>.
- Saeki, Toshiaki, Minoru Tanada, Shigemitsu Takashima, Hideyuki Saeki, Wataru Takiyama, Naoki Nishimoto, et Shosuke Moriwaki. 1997. « Correlation between Expression of Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor (Thymidine Phosphorylase) and Microvessel Density in Early-stage Human Colon Carcinomas ». *Japanese Journal of Clinical Oncology* 27 (4): 227-30.
<https://doi.org/10.1093/jjco/27.4.227>.
- Saikali, Philippe, Jack P. Antel, Camille L. Pittet, Jia Newcombe, et Nathalie Arbour. 2010.
 « Contribution of Astrocyte-Derived IL-15 to CD8 T Cell Effector Functions in Multiple Sclerosis ». *The Journal of Immunology* 185 (10): 5693-5703.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002188>.
- Sakamoto, Masami, Hiromi Hirata, Toshiyuki Ohtsuka, Yasumasa Bessho, et Ryoichiro Kageyama. 2003. « The Basic Helix-Loop-Helix Genes *Hesr1/Hey1* and *Hesr2/Hey2* Regulate Maintenance of Neural Precursor Cells in the Brain* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (45): 44808-15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300448200>.
- Sanmarco, Liliana M., Michael A. Wheeler, Cristina Gutiérrez-Vázquez, Carolina Manganeli Polonio, Mathias Linnerbauer, Felipe A. Pinho-Ribeiro, Zhaorong Li, et al. 2021. « Gut-Licensed IFN γ + NK Cells Drive LAMP1+TRAIL+ Anti-Inflammatory Astrocytes ». *Nature* 590 (7846): 473-79.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-03116-4>.
- Sathiyandan, Karthik, Caroline Coisne, Gaby Enzmann, Urban Deutsch, et Britta Engelhardt. 2014.
 « PSGL-1 and E/P-Selectins Are Essential for T-Cell Rolling in Inflamed CNS Microvessels but Dispensable for Initiation of EAE ». *European Journal of Immunology* 44 (8): 2287-94.
<https://doi.org/10.1002/eji.201344214>.
- Saxena, Amit, Jan Bauer, Tanja Scheickl, Jacques Zappulla, Marc Audebert, Sabine Desbois, Ari Waisman, Hans Lassmann, Roland S. Liblau, et Lennart T. Mars. 2008. « Cutting Edge: Multiple Sclerosis-Like Lesions Induced by Effector CD8 T Cells Recognizing a Sequestered Antigen on Oligodendrocytes ». *The Journal of Immunology* 181 (3): 1617-21.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.1617>.
- Schönrock, Lisa M, Gregor Gawlowski, et Wolfgang Brück. 2000. « Interleukin-6 Expression in Human Multiple Sclerosis Lesions ». *Neuroscience Letters* 294 (1): 45-48.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01543-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01543-3).
- Selmaj, K., C. S. Raine, B. Cannella, et C. F. Brosnan. 1991. « Identification of Lymphotoxin and Tumor Necrosis Factor in Multiple Sclerosis Lesions ». *The Journal of Clinical Investigation* 87 (3): 949-54. <https://doi.org/10.1172/JCI115102>.
- Sengupta, Shiladitya, Lynda A. Sellers, Hugh B. Matheson, et Tai-Ping D. Fan. 2003. « Thymidine Phosphorylase Induces Angiogenesis in Vivo and in Vitro: An Evaluation of Possible Mechanisms ». *British Journal of Pharmacology* 139 (2): 219-31.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705216>.
- Shimada, Issei S., Alyssa Borders, Alexander Aronshtam, et Jeffrey L. Spees. 2011. « Proliferating Reactive Astrocytes Are Regulated by Notch-1 in the Peri-Infarct Area After Stroke ». *Stroke* 42 (11): 3231-37. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.623280>.
- Shrestha, Bandana, Shujun Ge, et Joel S. Pachter. 2014. « Resolution of Central Nervous System Astrocytic and Endothelial Sources of CCL2 Gene Expression during Evolving Neuroinflammation ». *Fluids and Barriers of the CNS* 11 (1): 1-6.
<https://doi.org/10.1186/2045-8118-11-6>.

- Siebel, Chris, et Urban Lendahl. 2017. « Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease ». *Physiological Reviews* 97 (4): 1235-94.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2017>.
- Simpson, J. E., J. Newcombe, M. L. Cuzner, et M. N. Woodroffe. 2000. « Expression of the Interferon- γ -Inducible Chemokines IP-10 and Mig and Their Receptor, CXCR3, in Multiple Sclerosis Lesions ». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 26 (2): 133-42.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.2000.026002133.x>.
- Siqueira, Michele, Daniel Francis, Diego Gisbert, Flávia Carvalho Alcantara Gomes, et Joice Stipursky. 2018. « Radial Glia Cells Control Angiogenesis in the Developing Cerebral Cortex Through TGF- β 1 Signaling ». *Molecular Neurobiology* 55 (5): 3660-75.
<https://doi.org/10.1007/s12035-017-0557-8>.
- Smith, David C., Rashmi Chugh, Amita Patnaik, Kyriakos P. Papadopoulos, Min Wang, Ann M. Kapoun, Lu Xu, Jakob Dupont, Robert J. Stagg, et Anthony Tolcher. 2019. « A Phase 1 Dose Escalation and Expansion Study of Tarextumab (OMP-59R5) in Patients with Solid Tumors ». *Investigational New Drugs* 37 (4): 722-30. <https://doi.org/10.1007/s10637-018-0714-6>.
- Smith, David C., Peter D. Eisenberg, Georgy Manikhas, Rashmi Chugh, Matthew A. Gubens, Robert J. Stagg, Ann M. Kapoun, Lu Xu, Jakob Dupont, et Branimir Sikic. 2014. « A Phase I Dose Escalation and Expansion Study of the Anticancer Stem Cell Agent Demcizumab (Anti-DLL4) in Patients with Previously Treated Solid Tumors ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20 (24): 6295-6303.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1373>.
- Smith, Emma, Stéphanie Claudinot, Rajwinder Lehal, Luca Pellegrinet, Yann Barrandon, et Freddy Radtke. 2012. « Generation and Characterization of a Notch1 Signaling-Specific Reporter Mouse Line ». *Genesis* 50 (9): 700-710. <https://doi.org/10.1002/dvg.22030>.
- Sofroniew, Michael V. 2009. « Molecular Dissection of Reactive Astroglia and Glial Scar Formation ». *Trends in Neurosciences* 32 (12): 638-47.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>.
- Sofroniew, Michael V., et Harry V. Vinters. 2010. « Astrocytes: Biology and Pathology ». *Acta Neuropathologica* 119 (1): 7-35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>.
- Song, Jian, Chuan Wu, Eva Korpos, Xueli Zhang, Smriti M. Agrawal, Ying Wang, Cornelius Faber, et al. 2015. « Focal MMP-2 and MMP-9 Activity at the Blood-Brain Barrier Promotes Chemokine-Induced Leukocyte Migration ». *Cell Reports* 10 (7): 1040-54.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.037>.
- Song, L. L., Y. Peng, J. Yun, P. Rizzo, V. Chaturvedi, S. Weijzen, W. M. Kast, et al. 2008. « Notch-1 Associates with IKK α and Regulates IKK Activity in Cervical Cancer Cells ». *Oncogene* 27 (44): 5833-44. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.190>.
- Stark, Konstantin, Annkathrin Eckart, Selgai Haidari, Anca Tirniceriu, Michael Lorenz, Marie-Luise von Brühl, Florian Gärtner, et al. 2013. « Capillary and Arteriolar Pericytes Attract Innate Leukocytes Exiting through Venules and “instruct” Them with Pattern-Recognition and Motility Programs ». *Nature Immunology* 14 (1): 41-51. <https://doi.org/10.1038/ni.2477>.
- Steed, Emily, Nelio TL Rodrigues, Maria S. Balda, et Karl Matter. 2009. « Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family ». *BMC Cell Biology* 10 (1): 95. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-95>.
- Steffen, B. J., E. C. Butcher, et B. Engelhardt. 1994. « Evidence for involvement of ICAM-1 and VCAM-1 in lymphocyte interaction with endothelium in experimental autoimmune encephalomyelitis in the central nervous system in the SJL/J mouse. » *The American Journal of Pathology* 145 (1): 189-201.
- Steinbuck, Martin Peter, Ksenia Arakcheeva, et Susan Winandy. 2018. « Novel TCR-Mediated Mechanisms of Notch Activation and Signaling ». *The Journal of Immunology* 200 (3): 997-1007. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700070>.

- Stephenson, Natalie L., et Johanna M. Avis. 2012. « Direct Observation of Proteolytic Cleavage at the S2 Site upon Forced Unfolding of the Notch Negative Regulatory Region ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (41): E2757-2765. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205788109>.
- Stogsdill, Jeff A., Juan Ramirez, Di Liu, Yong Ho Kim, Katherine T. Baldwin, Eray Enustun, Tiffany Ejikeme, Ru-Rong Ji, et Cagla Eroglu. 2017. « Astrocytic Neuroligins Control Astrocyte Morphogenesis and Synaptogenesis ». *Nature* 551 (7679): 192-97. <https://doi.org/10.1038/nature24638>.
- Stone, J., A. Itin, T. Alon, J. Pe'er, H. Gnessin, T. Chan-Ling, et E. Keshet. 1995. « Development of Retinal Vasculature Is Mediated by Hypoxia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression by Neuroglia ». *Journal of Neuroscience* 15 (7): 4738-47. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-07-04738.1995>.
- Stuart, G., et K. S. Krikorian. 1928. « The Neuro-Paralytic Accidents of Anti-Rabies Treatment ». *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 22 (3): 327-77. <https://doi.org/10.1080/00034983.1928.11684582>.
- Stuart, G, et K. S Krikorian. 1930. « A Fatal Neuro-Paralytic Accident of Antirabies Treatment. » *The Lancet*, Originally published as Volume 1, Issue 5569, 215 (5569): 1123-25. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)70779-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)70779-3).
- Suchting, Steven, Catarina Freitas, Ferdinand le Noble, Rui Benedito, Christiane Bréant, Antonio Duarte, et Anne Eichmann. 2007. « The Notch Ligand Delta-like 4 Negatively Regulates Endothelial Tip Cell Formation and Vessel Branching ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (9): 3225-30. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611177104>.
- Sweeney, Melanie D., Shiva Ayyadurai, et Berislav V. Zlokovic. 2016. « Pericytes of the Neurovascular Unit: Key Functions and Signaling Pathways ». *Nature Neuroscience* 19 (6): 771-83. <https://doi.org/10.1038/nn.4288>.
- Tabata, Hidenori. 2015. « Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis ». *Frontiers in Neuroscience* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2015.00114>.
- Takao, S., Y. Takebayashi, X. Che, H. Shinchi, S. Natsugoe, K. Miyadera, Y. Yamada, S. Akiyama, et T. Aikou. 1998. « Expression of Thymidine Phosphorylase Is Associated with a Poor Prognosis in Patients with Ductal Adenocarcinoma of the Pancreas ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 4 (7): 1619-24.
- Tanigaki, Kenji, et Tasuku Honjo. 2007. « Regulation of Lymphocyte Development by Notch Signaling ». *Nature Immunology* 8 (5): 451-56. <https://doi.org/10.1038/ni1453>.
- Tanuma, Naoyuki, Hiroshi Sakuma, Atsushi Sasaki, et Yoh Matsumoto. 2006. « Chemokine Expression by Astrocytes Plays a Role in Microglia/Macrophage Activation and Subsequent Neurodegeneration in Secondary Progressive Multiple Sclerosis ». *Acta Neuropathologica* 112 (2): 195-204. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0083-7>.
- Taylor, Merritt K., Kelly Yeager, et Sean J. Morrison. 2007. « Physiological Notch signaling promotes gliogenesis in the developing peripheral and central nervous systems ». *Development* 134 (13): 2435-47. <https://doi.org/10.1242/dev.005520>.
- Taylor, Paul, Hideyuki Takeuchi, Devon Sheppard, Chandramouli Chillakuri, Susan M. Lea, Robert S. Haltiwanger, et Penny A. Handford. 2014. « Fringe-Mediated Extension of O-Linked Fucose in the Ligand-Binding Region of Notch1 Increases Binding to Mammalian Notch Ligands ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (20): 7290-95. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319683111>.
- Thompson, Alan J., Brenda L. Banwell, Frederik Barkhof, William M. Carroll, Timothy Coetzee, Giancarlo Comi, Jorge Correale, et al. 2018. « Diagnosis of Multiple Sclerosis: 2017 Revisions of the McDonald Criteria ». *The Lancet. Neurology* 17 (2): 162-73. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2).

- Thomsen, Maj S, Lisa J Routhe, et Torben Moos. 2017. « The Vascular Basement Membrane in the Healthy and Pathological Brain ». *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 37 (10): 3300-3317. <https://doi.org/10.1177/0271678X17722436>.
- Tietz, Silvia, et Britta Engelhardt. 2015. « Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions ». *Journal of Cell Biology* 209 (4): 493-506. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412147>.
- Tourdias, Thomas, et Vincent Dousset. 2013. « Neuroinflammatory Imaging Biomarkers: Relevance to Multiple Sclerosis and Its Therapy ». *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 10 (1): 111-23. <https://doi.org/10.1007/s13311-012-0155-4>.
- Toy, Dean, David Kugler, Martin Wolfson, Tim Vanden Bos, Jesse Gurgel, Jonathan Derry, Joel Tocker, et Jacques Peschon. 2006. « Cutting Edge: Interleukin 17 Signals through a Heteromeric Receptor Complex ». *The Journal of Immunology* 177 (1): 36-39. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.36>.
- Tveriakhina, Lena, Karin Schuster-Gossler, Sanchez M Jarrett, Marie B Andrawes, Meike Rohrbach, Stephen C Blacklow, et Achim Gossler. 2018. « The ectodomains determine ligand function in vivo and selectivity of DLL1 and DLL4 toward NOTCH1 and NOTCH2 in vitro ». Édité par Urban Lendahl et Didier YR Stainier. *eLife* 7 (octobre): e40045. <https://doi.org/10.7554/eLife.40045>.
- Uchida, Yasuo, Tomohito Sumiya, Masanori Tachikawa, Tatsuya Yamakawa, Sho Murata, Yuta Yagi, Kazuki Sato, et al. 2019. « Involvement of Claudin-11 in Disruption of Blood-Brain, -Spinal Cord, and -Arachnoid Barriers in Multiple Sclerosis ». *Molecular Neurobiology* 56 (3): 2039-56. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1207-5>.
- Uchida, Yasuo, Hina Takeuchi, Ryohei Goto, Clemens Braun, Holger Fuchs, Naoki Ishiguro, Masaki Takao, Mitsutoshi Tano, et Tetsuya Terasaki. 2022. « A Human Blood-Arachnoid Barrier Atlas of Transporters, Receptors, Enzymes, and Tight Junction and Marker Proteins: Comparison with Dog and Pig in Absolute Abundance ». *Journal of Neurochemistry* 161 (2): 187-208. <https://doi.org/10.1111/jnc.15599>.
- Varga, Andrew W., Glyn Johnson, James S. Babb, Joseph Herbert, Robert I. Grossman, et Matilde Inglese. 2009. « White Matter Hemodynamic Abnormalities Precede Sub-Cortical Gray Matter Changes in Multiple Sclerosis ». *Journal of the Neurological Sciences, Evidence for Gray Matter Pathology in Multiple Sclerosis: A Neuroimaging Approach*, 282 (1): 28-33. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2008.12.036>.
- Varona, Rosa, Angel Zaballos, Julio Gutiérrez, Pilar Martín, Fernando Roncal, Juan Pablo Albar, Carlos Ardaín, et Gabriel Márquez. 1998. « Molecular Cloning, Functional Characterization and MRNA Expression Analysis of the Murine Chemokine Receptor CCR6 and Its Specific Ligand MIP-3 α 1 ». *FEBS Letters* 440 (1-2): 188-94. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01450-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01450-1).
- Wang, Marie Xun, Lori Ray, Kenji F. Tanaka, Jeffrey J. Iliff, et Jeffrey Heys. 2021. « Varying Perivascular Astroglial Endfoot Dimensions along the Vascular Tree Maintain Perivascular-Interstitial Flux through the Cortical Mantle ». *Glia* 69 (3): 715-28. <https://doi.org/10.1002/glia.23923>.
- Wang, S. -Y., M. Ren, H. -Z. Jiang, J. Wang, H. -Q. Jiang, X. Yin, Y. Qi, et al. 2015. « Notch Pathway Is Activated in Cell Culture and Mouse Models of Mutant SOD1-Related Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis, with Suppression of Its Activation as an Additional Mechanism of Neuroprotection for Lithium and Valproate ». *Neuroscience* 301 (août): 276-88. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.002>.
- Wang, Songli, Andrei D Sdrulla, Guy diSibio, Gay Bush, Donna Nofziger, Carol Hicks, Gerry Weinmaster, et Ben A Barres. 1998. « Notch Receptor Activation Inhibits Oligodendrocyte Differentiation ». *Neuron* 21 (1): 63-75. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80515-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80515-2).
- Wang, Xueying, Huihui Yang, Chunyu Liu, et Kefu Liu. 2023. « A new diagnostic tool for brain disorders: extracellular vesicles derived from neuron, astrocyte, and oligodendrocyte ».

- Frontiers in Molecular Neuroscience* 16.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2023.1194210>.
- Wanner, I. B., M. A. Anderson, B. Song, J. Levine, A. Fernandez, Z. Gray-Thompson, Y. Ao, et M. V. Sofroniew. 2013. « Glial Scar Borders Are Formed by Newly Proliferated, Elongated Astrocytes That Interact to Corral Inflammatory and Fibrotic Cells via STAT3-Dependent Mechanisms after Spinal Cord Injury ». *Journal of Neuroscience* 33 (31): 12870-86.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2121-13.2013>.
- Washington, Ruth, Jeffrey Burton, Robert F. Todd III, Walter Newman, Ljubisa Dragovic, et Paula Dore-Duffy. 1994. « Expression of Immunologically Relevant Endothelial Cell Activation Antigens on Isolated Central Nervous System Microvessels from Patients with Multiple Sclerosis ». *Annals of Neurology* 35 (1): 89-97. <https://doi.org/10.1002/ana.410350114>.
- Wattjes, Mike P, Olga Ciccarelli, Daniel S Reich, Brenda Banwell, Nicola de Stefano, Christian Enzinger, Franz Fazekas, et al. 2021. « 2021 MAGNIMS–CMSC–NAIMS Consensus Recommendations on the Use of MRI in Patients with Multiple Sclerosis ». *The Lancet Neurology* 20 (8): 653-70. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00095-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00095-8).
- Weller, Roy O., Matthew M. Sharp, Myron Christodoulides, Roxana O. Carare, et Kjeld Møllgård. 2018. « The Meninges as Barriers and Facilitators for the Movement of Fluid, Cells and Pathogens Related to the Rodent and Human CNS ». *Acta Neuropathologica* 135 (3): 363-85.
<https://doi.org/10.1007/s00401-018-1809-z>.
- Weng, Andrew P., Adolfo A. Ferrando, Woojoong Lee, John P. Morris, Lewis B. Silverman, Cheryll Sanchez-Irizarry, Stephen C. Blacklow, A. Thomas Look, et Jon C. Aster. 2004. « Activating Mutations of NOTCH1 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia ». *Science (New York, N.Y.)* 306 (5694): 269-71. <https://doi.org/10.1126/science.1102160>.
- Wheeler, Michael A., Iain C. Clark, Emily C. Tjon, Zhaorong Li, Stephanie E. J. Zandee, Charles P. Couturier, Brianna R. Watson, et al. 2020. « MAFG-Driven Astrocytes Promote CNS Inflammation ». *Nature* 578 (7796): 593-99. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1999-0>.
- Wilson, Anne, H. Robson MacDonald, et Freddy Radtke. 2001. « Notch 1–Deficient Common Lymphoid Precursors Adopt a B Cell Fate in the Thymus ». *Journal of Experimental Medicine* 194 (7): 1003-12. <https://doi.org/10.1084/jem.194.7.1003>.
- Wimmer, Isabella, Silvia Tietz, Hideaki Nishihara, Urban Deutsch, Federica Sallusto, Fabien Gosselet, Ruth Lyck, William A. Muller, Hans Lassmann, et Britta Engelhardt. 2019. « PECAM-1 Stabilizes Blood-Brain Barrier Integrity and Favors Paracellular T-Cell Diapedesis Across the Blood-Brain Barrier During Neuroinflammation ». *Frontiers in Immunology* 10.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00711>.
- Wolburg, H., K. Wolburg-Buchholz, S. Liebner, et B. Engelhardt. 2001. « Claudin-1, Claudin-2 and Claudin-11 Are Present in Tight Junctions of Choroid Plexus Epithelium of the Mouse ». *Neuroscience Letters* 307 (2): 77-80. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)01927-9](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)01927-9).
- Wongchana, Wipawee, et Tanapat Palaga. 2012. « Direct Regulation of Interleukin-6 Expression by Notch Signaling in Macrophages ». *Cellular & Molecular Immunology* 9 (2): 155-62.
<https://doi.org/10.1038/cmi.2011.36>.
- Xiao, Yifan, Lin Lai, Huoying Chen, Junyu Shi, FanFan Zeng, Jun Li, Huiting Feng, et al. 2018. « Interleukin-33 Deficiency Exacerbated Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with an Influence on Immune Cells and Glia Cells ». *Molecular Immunology* 101 (septembre): 550-63. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.08.026>.
- Xing, Chang-Yang, Takashi Tarumi, Jie Liu, Yinan Zhang, Marcel Turner, Jonathan Riley, Cynthia Duron Tinajero, Li-Jun Yuan, et Rong Zhang. 2017. « Distribution of Cardiac Output to the Brain across the Adult Lifespan ». *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 37 (8): 2848-56.
<https://doi.org/10.1177/0271678X16676826>.
- Xu, Lingling, Abhijit Nirwane, et Yao Yao. 2019. « Basement Membrane and Blood–Brain Barrier ». *Stroke and Vascular Neurology* 4 (2). <https://doi.org/10.1136/svn-2018-000198>.

- Yang, Jee Myung, Chan Soon Park, Soo Hyun Kim, Tae Wook Noh, Ju-Hee Kim, Seongyeol Park, Jingu Lee, et al. 2020. « Dll4 Suppresses Transcytosis for Arterial Blood-Retinal Barrier Homeostasis ». *Circulation Research* 126 (6): 767-83. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316476>.
- Yang, R., et J.F. Dunn. 2015. « Reduced Cortical Microvascular Oxygenation in Multiple Sclerosis: A Blinded, Case-Controlled Study Using a Novel Quantitative near-Infrared Spectroscopy Method ». *Scientific Reports* 5. <https://doi.org/10.1038/srep16477>.
- Yao, Yao, Zu-Lin Chen, Erin H. Norris, et Sidney Strickland. 2014. « Astrocytic Laminin Regulates Pericyte Differentiation and Maintains Blood Brain Barrier Integrity ». *Nature Communications* 5 (1): 3413. <https://doi.org/10.1038/ncomms4413>.
- Yousif, Lema F., Jacopo Di Russo, et Lydia Sorokin. 2013. « Laminin Isoforms in Endothelial and Perivascular Basement Membranes ». *Cell Adhesion & Migration* 7 (1): 101-10. <https://doi.org/10.4161/cam.22680>.
- Yun, Seung Pil, Tae-In Kam, Nikhil Panicker, SangMin Kim, Yumin Oh, Jong-Sung Park, Seung-Hwan Kwon, et al. 2018. « Block of A1 Astrocyte Conversion by Microglia Is Neuroprotective in Models of Parkinson's Disease ». *Nature Medicine* 24 (7): 931-38. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0051-5>.
- Yvon, Eric S., Stephane Vigouroux, Raphael F. Rousseau, Ettore Biagi, Persis Amrolia, Gianpietro Dotti, Hans-Joachim Wagner, et Malcolm K. Brenner. 2003. « Overexpression of the Notch ligand, Jagged-1, induces alloantigen-specific human regulatory T cells ». *Blood* 102 (10): 3815-21. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-12-3826>.
- Zang, Ying C. Q., Sufang Li, Victor M. Rivera, Jian Hong, Rachel R. Robinson, Wini T. Breitbart, James Killian, et Jingwu Z. Zhang. 2004. « Increased CD8+ Cytotoxic T Cell Responses to Myelin Basic Protein in Multiple Sclerosis1 ». *The Journal of Immunology* 172 (8): 5120-27. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.8.5120>.
- Zhang, Xue, Xi Guo, Ningnannan Zhang, Huanhuan Cai, Jie Sun, Qihui Wang, Yuan Qi, et al. 2018. « Cerebral Blood Flow Changes in Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica and Their Correlations With Clinical Disability ». *Frontiers in Neurology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2018.00305>.
- Zhang, Yanmin, Kun He, Fuwu Wang, Xian Li, et Dejie Liu. 2015. « Notch-1 Signaling Regulates Astrocytic Proliferation and Activation after Hypoxia Exposure ». *Neuroscience Letters* 603 (août): 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.07.009>.
- Zhao, Daidi, Fuqiang Feng, Cong Zhao, Fang Wu, Chao Ma, Yanan Bai, Jun Guo, et Hongzeng Li. 2018. « Role of Perforin Secretion from CD8+ T-Cells in Neuronal Cytotoxicity in Multiple Sclerosis ». *Neurological Research* 40 (1): 62-67. <https://doi.org/10.1080/01616412.2017.1398371>.
- Zhou, Binghan, Wanling Lin, Yaling Long, Yunkai Yang, Huan Zhang, Kongming Wu, et Qian Chu. 2022. « Notch Signaling Pathway: Architecture, Disease, and Therapeutics ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 7 (1): 1-33. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00934-y>.
- Zonta, Micaela, María Cecilia Angulo, Sara Gobbo, Bernhard Rosengarten, Konstantin-A. Hossmann, Tullio Pozzan, et Giorgio Carmignoto. 2003. « Neuron-to-Astrocyte Signaling Is Central to the Dynamic Control of Brain Microcirculation ». *Nature Neuroscience* 6 (1): 43-50. <https://doi.org/10.1038/nn980>.
- Zonta, Micaela, Annalisa Sebelin, Sara Gobbo, Tommaso Fellin, Tullio Pozzan, et Giorgio Carmignoto. 2003. « Glutamate-Mediated Cytosolic Calcium Oscillations Regulate a Pulsatile Prostaglandin Release from Cultured Rat Astrocytes ». *The Journal of Physiology* 553 (2): 407-14. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.046706>.

Communications et vulgarisation scientifiques

Articles publiés dans des journaux internationaux avec comité de relecture

Mora, P., Hollier, P. L., Guimbal, S., Abelanet, A., Diop, A., Cornuault, L., Couffinhal, T., Horng, S., Gadeau, A. P., Renault, M. A., & Chapouly, C. (2020). Blood-brain barrier genetic disruption leads to protective barrier formation at the Glia Limitans. *PLoS biology*, 18(11), e3000946. <https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1371/journal.pbio.3000946> (impact factor : 8,029)

Communications orales dans des congrès internationaux

Mora, P., Rouault, P., Cornuault, L., Gadeau, A. P., Renault, M. A., Chapouly, C. Delta like 4 at the Glia Limitans, a key player of neuro-inflammation pathophysiology. Cold Spring Harbor Brain Barriers 2021 en virtuel

Mora, P., Bourguignon, C., Laisne, M., Rouault, P., Gadeau, A. P., Renault, M. A., Chapouly, C. Delta like 4 at the Glia Limitans, a key player of neuro-inflammation pathophysiology. Société d'étude de l'interface sang cerveaux 2023 à Arras

Communications orales dans des congrès nationaux

Mora, P., Rouault, P., Cornuault, L., Gadeau, A. P., Renault, M. A., Chapouly, C. Delta like 4 at the Glia Limitans, a key player of neuro-inflammation pathophysiology. Journées du département Sciences biologiques et médicales 2021 à Bordeaux

Communications affichées dans des congrès internationaux

Mora, P., Bourguignon, C., Laisne, M., Rouault, P., Gadeau, A. P., Renault, M. A., Chapouly, C. Delta like 4 at the Glia Limitans, a key player of neuro-inflammation pathophysiology. Blood Brain Barrier Bari 2022 à Bari

Communications affichées dans des congrès nationaux

Mora, P., Rouault, P., Cornuault, L., Gadeau, A. P., Renault, M. A., Chapouly, C. Delta like 4 at the Glia Limitans, a key player of neuro-inflammation pathophysiology. Société Française d'Angiogenèse 2021 en distanciel

Mora, P., Bourguignon, C., Laisne, M., Rouault, P., Gadeau, A. P., Renault, M. A., Chapouly, C. Delta like 4 at the Glia Limitans, a key player of neuro-inflammation pathophysiology. Journée de l'école doctorale 2022 à Bordeaux

Mora, P., Bourguignon, C., Laisne, M., Rouault, P., Gadeau, A. P., Renault, M. A., Chapouly, C. Delta like 4 at the Glia Limitans, a key player of neuro-inflammation pathophysiology. Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose 2022 à Biarritz

Mora, P., Bourguignon, C., Laisne, M., Rouault, P., Gadeau, A. P., Renault, M. A., Chapouly, C. Delta like 4 at the Glia Limitans, a key player of neuro-inflammation pathophysiology. Journées du département Sciences biologiques et médicales 2022 à Bordeaux

Mora, P., Bourguignon, C., Laisne, M., Rouault, P., Gadeau, A. P., Renault, M. A., Chapouly, C. Delta like 4 at the Glia Limitans, a key player of neuro-inflammation pathophysiology. French Club of Glial Cells 2023 à Lyon

Prix de la meilleure short communication dans un congrès national

Mora, P., Rouault, P., Cornuault, L., Gadeau, A. P., Renault, M. A., Chapouly, C. Delta like 4 at the Glia Limitans, a key player of neuro-inflammation pathophysiology. Journées du département Sciences biologiques et médicales 2021 à Bordeaux

Activités de vulgarisation scientifique

Participation à l'Happy Hour de la recherche organisée à l'initiative de la commission « prospective et recherche » de l'UFR Sciences Pharmaceutiques dans le but de promouvoir les métiers de la recherche auprès des étudiants de pharmacie (2022)

Participation aux Journée portes ouvertes dans les laboratoires de recherche sur la sclérose en plaque organisées par la Fondation pour l'aide à la recherche sur la sclérose en plaques afin de rendre accessible les laboratoires de recherche aux personnes atteints de sclérose en plaque (2021)

Annexes

A. Annexe 1 : Mora P, Hollier PL, Guimbal S, et al. Blood-brain barrier genetic disruption leads to protective barrier formation at the Glia Limitans. PLoS Biol. 2020;18(11):e3000946. Published 2020 Nov 30. doi:10.1371/journal.pbio.3000946

B. Annexe2 : Mora P, Chapouly C. Astrogliosis in multiple sclerosis and neuro-inflammation: what role for the notch pathway?. *Front Immunol.* 2023;14:1254586. Published 2023 Oct 23. doi:10.3389/fimmu.2023.1254586

RESEARCH ARTICLE

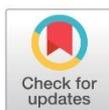
Blood–brain barrier genetic disruption leads to protective barrier formation at the Glia Limitans

Pierre Mora¹✉, Pierre-Louis Hollier¹✉, Sarah Guimbal¹✉, Alice Abelanet¹✉, Aïssata Diop¹, Lauriane Cornuault¹, Thierry Couffinhal¹✉, Sam Horng², Alain-Pierre Gadeau¹✉, Marie-Ange Renault¹✉, Candice Chapouly¹*✉

1 Univ. Bordeaux, INSERM, Biology of Cardiovascular Diseases, Pessac, France, **2** Department of Neurology and Neuroscience, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York City, New York, United States of America

✉ These authors contributed equally to this work.

* candice.chapouly@inserm.fr



OPEN ACCESS

Citation: Mora P, Hollier P-L, Guimbal S, Abelanet A, Diop A, Cornuault L, et al. (2020) Blood–brain barrier genetic disruption leads to protective barrier formation at the Glia Limitans. *PLoS Biol* 18(11): e3000946. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000946>

Academic Editor: Richard Daneman, UCSD, UNITED STATES

Received: March 31, 2020

Accepted: October 22, 2020

Published: November 30, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000946>

Copyright: © 2020 Mora et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its [Supporting Information](#) files. All S1 Data and S2 Data files are available from the Figshare public repository database. The

Abstract

Inflammation of the central nervous system (CNS) induces endothelial blood–brain barrier (BBB) opening as well as the formation of a tight junction barrier between reactive astrocytes at the Glia Limitans. We hypothesized that the CNS parenchyma may acquire protection from the reactive astrocytic Glia Limitans not only during neuroinflammation but also when BBB integrity is compromised in the resting state. Previous studies found that astrocyte-derived Sonic hedgehog (SHH) stabilizes the BBB during CNS inflammatory disease, while endothelial-derived desert hedgehog (DHH) is expressed at the BBB under resting conditions. Here, we investigated the effects of endothelial Dhh on the integrity of the BBB and Glia Limitans. We first characterized DHH expression within endothelial cells at the BBB, then demonstrated that DHH is down-regulated during experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Using a mouse model in which endothelial Dhh is inducibly deleted, we found that endothelial Dhh both opens the BBB via the modulation of forkhead box O1 (FoxO1) transcriptional activity and induces a tight junctional barrier at the Glia Limitans. We confirmed the relevance of this glial barrier system in human multiple sclerosis active lesions. These results provide evidence for the novel concept of “chronic neuroinflammatory tolerance” in which BBB opening in the resting state is sufficient to stimulate a protective barrier at the Glia Limitans that limits the severity of subsequent neuroinflammatory disease. In summary, genetic disruption of the BBB generates endothelial signals that drive the formation under resting conditions of a secondary barrier at the Glia Limitans with protective effects against subsequent CNS inflammation. The concept of a reciprocally regulated CNS double barrier system has implications for treatment strategies in both the acute and chronic phases of multiple sclerosis pathophysiology.

S1 Data DOI link is <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12625034.v6> The S2 Data DOI link is <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12625085.v7>.

Funding: This study was supported by grants from the European Council (Marie Skłodowska-Curie Actions, Individual fellowship 2019 (MSCA-IF-2019)) (grant number GA794726) and the Fondation ARSEP (Fondation pour la Recherche sur la Sclérose En Plaques (<https://www.arsep.org/>)) (grant number ARSEP 2019/R19083GG). This study was also co-funded by the "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale" (project U103420G, grant number U10345E20GA). Grant number GA794726 was received by CC, grant number ARSEP 2019/R19083GG was received by CC and grant number U10345E20GA was received by CC. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. CC received a salary for 2 years (2019 and 2020) from the European Council as part of the grant GA794726.

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

Abbreviations: Aldh111, *aldehyde dehydrogenase 1 family, member 11*; ALB, albumin; AQP4, aquaporin 4; ABM, astrocyte basal medium; BBB, blood-brain barrier; BSA, bovine serum albumin; CD45, cluster of differentiation 45; CDH5, cadherin5; CLDN4, Claudin4; Cldn5, *claudin5*; CNS, central nervous system; CTNNT1, catenin 1; DHH, desert hedgehog; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; EBM-2, endothelial basal medium-2; FBS, fetal bovine serum; FGB, fibrinogen; FITC, fluorescein isothiocyanate; FoxO1, forkhead box O1; GFAP, glial fibrillary acidic protein; HBMEC, human brain microvascular endothelial cell; HH, Hedgehog; IBA1, ionized calcium binding adaptor molecule 1; IgG, immunoglobulin G; Icam1, *intercellular adhesion molecule 1*; IHH, Indian hedgehog; IL-1 β , interleukin-1 β ; IMPC, International Mouse Phenotyping Consortium; LAM, laminin; LPS, lipopolysaccharide; MEC, microvascular endothelial cell; MMP, matrix metalloproteinase; MOG₃₅₋₅₅, myelin oligodendrocyte glycoprotein-35-55; NG2, neural/glia antigen 2; NHA, normal human astrocytes; PDGFR β , platelet-derived growth factor subunit b; PDGFR β , platelet-derived growth factor receptor beta; PECAM1, platelet/endothelial cell adhesion molecule 1; PTCH1, Patched-1; PTX, pertussis toxin; PVS, perivascular space; qRT-PCR, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; RIPA, radioimmunoprecipitation assay; SHH, Sonic hedgehog; SMA, smooth muscle actin; SMO, Smoothed; Vcam1, *vascular cell adhesion*

Introduction

In a healthy individual, the central nervous system (CNS) parenchyma is protected from the peripheral circulation by the blood-brain barrier (BBB), which tightly regulates the entry and exit of soluble factors and immune cells [1]. Importantly, during multiple sclerosis, the abnormal permeability of the BBB allows penetration into the CNS parenchyma of inflammatory cells and soluble factors such as autoantibodies, cytokines, and toxic plasma proteins, which drive lesion formation and acute disease exacerbation [2,3]. Therefore, identifying key mechanisms that promote BBB tightness is currently considered to be a main strategy for controlling leukocyte and humoral entry, preventing acute relapse and disability progression in multiple sclerosis.

Previous studies have identified the Hedgehog (HH) pathway as a regulator of BBB integrity in multiple sclerosis, HIV, and stroke [4–7]. Desert hedgehog (DHH) is expressed constitutively at the BBB in adults [8] and belongs, together with Sonic hedgehog (SHH) and Indian hedgehog (IHH), to the HH family of morphogens, identified nearly 4 decades ago in *Drosophila* as crucial regulators of cell fate determination during embryogenesis [9]. The interaction of HH proteins with their specific receptor Patched-1 (PTCH1) derepresses the transmembrane protein Smoothened (SMO), which activates downstream pathways including the canonical HH pathway leading to the activation of Gli family zinc finger (Gli) transcription factors, and the so-called noncanonical HH pathways, which are independent of SMO and/or Gli [10].

Interestingly, a wealth of literature published during the last decades has enabled a change in the vision of BBB structure and integrity, which has expanded to include contributions from both barrier properties of the vascular endothelial cells and the astrocytic end feet of the neurovascular unit. Within the neurovascular unit, substantial intercellular communication network involves the vascular endothelial cells and astrocytic end feet, as well as the pericytes and basement membranes within the perivascular space (PVS) [11–13]. How these signals regulate the passage of soluble factors and cells into and out of the CNS is not completely understood and is of considerable translational interest to the field of neuroimmunology. Regulatory mechanisms at the BBB include solute transporters and receptor-mediated transcytosis, and immune cells are actively prevented from crossing the BBB by low levels of immune receptors that normally permit immune trafficking. Once soluble factors and immune cells penetrate the BBB, they circulate within the PVS, a region between the basal basement membrane of the endothelial cell wall and the parenchymal basement membrane abutting the astrocyte end feet [14,15]. While it is now well established that BBB breakdown leads to soluble factor and inflammatory cell infiltration into the PVS during neuropathology, the role of the Glia Limitans is more complex. Indeed, astrocytes, described as reactive, may demonstrate opposing roles in both recruiting and restricting neuroinflammatory infiltration depending on the context [16]. Specific reactive astrocyte behaviors are likely determined by signaling events that vary with the nature and severity of CNS injury or disease. Specifically, in multiple sclerosis as well as Alzheimer's and Parkinson diseases, it has been shown that reactive astrocytes, on one hand, produce pro-inflammatory and pro-permeability factors and on the other hand, neuro-protective factors [17–19].

Astrocyte barrier properties are not as well characterized as those of the BBB. However, several groups have highlighted barrier properties at the Glia Limitans [20–22]. Notably, endfoot-endfoot clefts, similar to those observed between endothelial cells at the BBB, have been described at the Glia Limitans and shown to be responsible for the sieving effect observed between the distribution of small and large Dextran [23]. Moreover, under neuroinflammatory conditions, immune cell trafficking across the Glia Limitans is necessary for clinical

molecule 1; VEGFA, vascular endothelial growth factor A; Vim, *vimentin*; WMA, World Medical Association; ZO1, zonula occludens 1.

experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [21]; indeed, matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 proteolytically cleave dystroglycan, which anchors astrocyte end feet to the Glia Limitans basement membrane via binding to extracellular matrix molecules, allowing infiltrating leukocytes to penetrate the parenchyma [24]. Additionally, it has been shown that the scavenger receptor CXCR7 is up-regulated on the inflamed BBB endothelium, facilitating mobilization of T cells from the PVS into the CNS parenchyma [25]. Altogether, these data demonstrate that both the endothelial BBB and its basement membrane, along with the Glia Limitans and the parenchymal basement membrane, are required for immune cell trafficking across the neurovascular unit. Strikingly, our recent work has given considerable attention to a new property of reactive astrocytes: the expression of tight junction proteins (notably Claudin4 (CLDN4)) under inflammatory conditions [26]. This result provides yet another argument in favor of astrocytic barrier properties.

The first objective of our study was to decipher the role of the morphogen DHH in maintaining BBB tightness. The second objective was to demonstrate that a double barrier system comprising both the BBB and Glia Limitans is implemented in the CNS and regulated by a crosstalk going from endothelial cell to astrocytes using endothelial Dhh knockdown as a model of permeable BBB.

Here, we first demonstrate that endothelial DHH expression is down-regulated during neuroinflammation and is necessary to maintain BBB tightness. We then show that BBB opening, induced by Dhh knockdown, drives astrocyte CLDN4 expression, conferring barrier properties to the Glia Limitans, which results in the PVS entrapment of plasma proteins and inflammatory cells, both under physiological conditions and during pathology. Together, these data identify the neurovascular unit as a double barrier system whose function is controlled by the crosstalk between endothelial cells and astrocytes.

In conclusion, this work strengthens the concept of CNS double barrier system, unveiling how signals at the endothelium drive astrocyte barrier properties to protect the parenchyma during neuropathology. Consequently, taking into account both components of the neurovascular unit is of translational interest and could open the way for new therapeutic strategies notably to limit progressive multiple sclerosis pathology.

Results

DHH, but not SHH or IHH, is expressed by CNS microvascular endothelial cells and down-regulated during chronic neuroinflammation

First, we showed that DHH is expressed at the BBB in vitro using mouse CNS MECs* (Fig 1A). CNS MEC purity was assessed using platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM1) and zonula occludens 1 (ZO1) as positive endothelial markers and smooth muscle actin (SMA), neural/glia antigen 2 (NG2), cluster of differentiation 45 (CD45), ionized calcium binding adaptor molecule 1 (IBA1), and glial fibrillary acidic protein (GFAP) as markers of contamination by smooth muscle cells, pericytes, leukocytes, microglia, and astrocytes, respectively (Fig 1A and S1A Fig). DHH expression at the BBB was verified in vivo using human cortical sections from healthy donors (Fig 1B) and brain sections from C57BL/6 mice (S1B Fig). SHH and IHH are not expressed in the healthy BBB, and DHH is known to be stored intracellularly as well as being secreted [7]. Therefore, we here infer the CNS endothelial cells as the source of DHH within the neurovascular unit. Next, we demonstrated that *Dhh* is severely down-regulated at the BBB under inflammatory conditions both in vitro using human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) treated with interleukin-1 β (IL-1 β) (one of the main pro-inflammatory cytokine implicated in multiple sclerosis pathophysiology) (Fig 1C and S1 Data) and in vivo (Fig 1F and S1 Data) using a preclinical model of multiple sclerosis

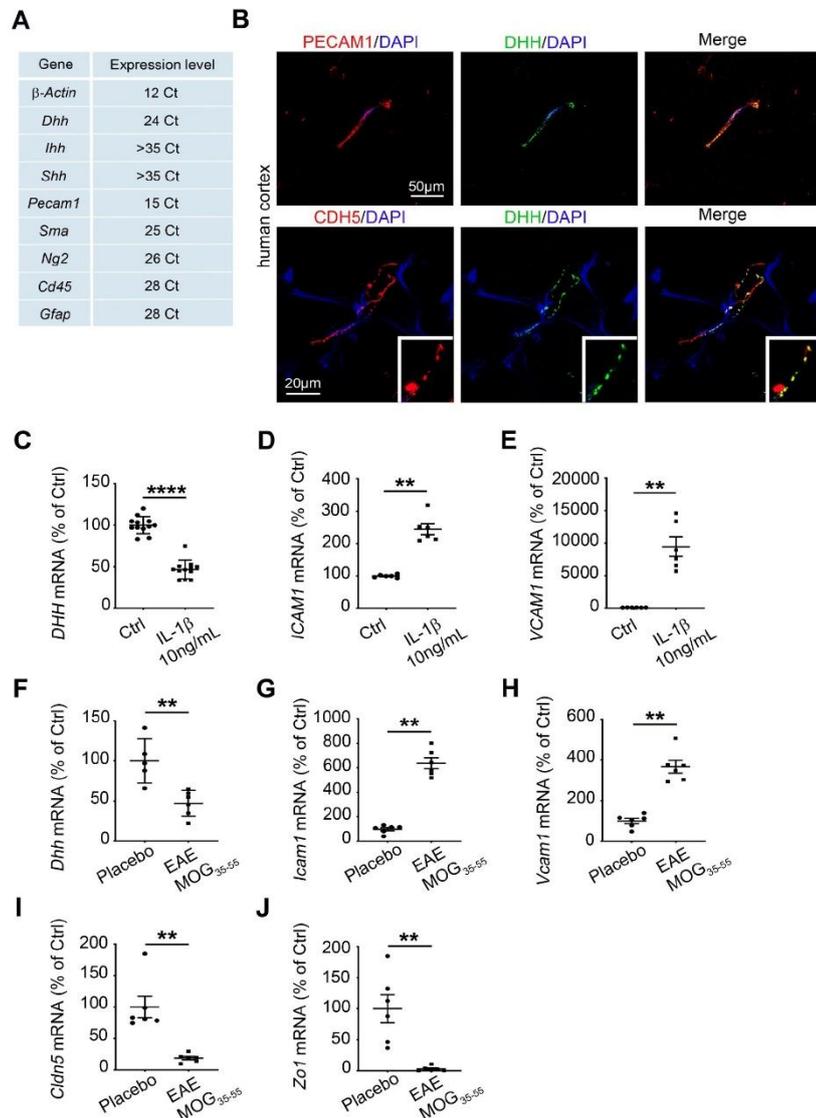


Fig 1. DHH is expressed by CNS MECs and down-regulated during chronic neuroinflammation. (A) Primary BMECs were isolated from 12-week-old C57Bl/6 mice, and *Dhh*, *Ihh*, *Shh*, *Pecam1*, *Sma*, *Ng2*, *Cd45*, and *Gfap* expressions were quantified by qRT-PCR (cycle threshold mean values). β -actin is used as a reference. (B) Human cortical sections from healthy donors were obtain from the NeuroCEB biobank and immunostained with anti-CDH5 (in red), anti-PECAM1 (in red), and anti-DHH (in green) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (in blue). (C-E) HBMECs were cultured until confluency and starved for 24 h. HBMECs were then treated with PBS (control condition) or IL-1 β 10 ng/mL for 24 h and (C) *DHH*, (D) *ICAM1*, and (E)

VCAM1 expression were quantified by qRT-PCR. (F–H) Twelve-week-old C57BL/6 females (6 animals per group) were induced with MOG_{35–55} EAE versus placebo. At day 13 post induction, mice were humanely killed, and spinal cord microvascular endothelial cells were isolated. (F) *Dhh*, (G) *Icam1*, (H) *Vcam1*, (I) *Cldn5*, and (J) *Zo1* expression were measured via qRT-PCR in both groups (MOG_{35–55} versus placebo). ** $P \leq 0.01$, **** $P \leq 0.0001$ Mann-Whitney U test. The underlying data for Fig 1 can be found in S1 Data (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12625034.v6>). It is important to note that CNS endothelial cells are from a pooled source including both brain and spinal cord tissues. Therefore, the resulting cell cultures/lysates may be heterogeneous in their use of DHH. This remark applies to Figs 1–4. BMECs, brain microvascular endothelial cells; CD45, cluster of differentiation 45; CDH5, cadherin5; Cldn5, claudin5; CNS, central nervous system; Ctrl, control; DHH, desert hedgehog; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; GFAP, glial fibrillary acidic protein; HBMECs, human brain microvascular endothelial cells; IHH, Indian hedgehog; cam1, intercellular adhesion molecule 1; IL-1 β , interleukin 1 beta; MEC, microvascular endothelial cell; MOG_{35–55}, myelin oligodendrocyte glycoprotein-35-55; NS, non-significant; NG2, neural/glia antigen 2; qRT-PCR, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; PECAM1, platelet/endothelial cell adhesion molecule 1; SMA, smooth muscle actin; SHH, Sonic hedgehog; Vcam1, vascular cell adhesion molecule 1; ZO1, zonula occludens 1.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000946.g001>

(MOG_{35–55}) to induce chronic neuroinflammation in C57BL/6 mice. For this experiment, isolated spinal cord microvessels underwent a digestion step followed by a CD45⁺ T cell depletion step to discard inflammatory cell contamination induced by EAE (S1C and S1D Fig). *Dhh* down-regulation at the BBB is associated with the up-regulation of endothelial activation markers *intercellular adhesion molecule 1 (Icam1)* (Fig 1D–1G and S1 Data) and *vascular cell adhesion molecule 1 (Vcam1)* (Fig 1E–1H and S1 Data) and with down-regulation of mRNA markers of tight junctions (*claudin5 (Cldn5)* and *Zo1*) (Fig 1I, 1J and S1 Data).

Together, these data identify DHH as the only HH expressed in adults at the endothelial BBB. Moreover, they highlight the fact that DHH expression is down-regulated at the BBB during neuroinflammatory pathology.

Endothelial-specific *Dhh* inactivation induces down-regulation of adherens junction CDH5 and tight junction CLDN5 ex vivo

To test the importance of endothelial DHH expression at the BBB, we conditionally disrupted DHH expression in endothelial cells and examined the consequences on BBB integrity. To do so, we used CNS MEC cultures isolated from *Cdh5-Cre^{ERT2}, Dhh^{Flox/Flox}* mice (*Dhh^{ECKO}* mice), and *Dhh^{Flox/Flox}* control littermates, 2 weeks after inducing knockdown by intraperitoneal injection of tamoxifen. There is no difference between *Dhh^{ECKO}* and control mouse cell culture viability (S1E, S1F Fig and S2 Data).

We first verified the efficiency of the knockout by measuring *Dhh* expression in primary CNS MEC cultures obtained from *Dhh^{ECKO}* and littermate controls and showed that *Dhh* expression is strongly down-regulated in the knockout mice (Fig 2A and S1 Data). Moreover, CDH5, CLDN5, and ZO1 junctions are disorganized in *Dhh^{ECKO}* endothelial cells: In controls, CDH5, CLDN5, and ZO1 display a well-defined pattern of sharp contours at endothelial cell–cell contacts. In contrast, in *Dhh^{ECKO}* cultures, a broader, more irregular pattern is detected at endothelial cell–cell contacts (Fig 2D–2F). This result is consistent with the previously documented phenotype using small interfering RNA (siRNA) for DHH [8]. CDH5 and CLDN5 but not ZO1 are down-regulated in *Dhh^{ECKO}* CNS MECs compared to controls (Fig 2B, 2C and 2G–2I and S1 Data).

We concluded that endothelial DHH expression is necessary to maintain endothelial adherens and tight junction mRNA and protein expression level at the BBB and to maintain a well-defined CDH5, ZO1, and CLDN5 pattern of sharp contours at endothelial cell–cell contacts.

DHH induces CLDN5 up regulation through the inhibition of FOXO1 transcriptional activity in vitro

We previously identified DHH as a factor facilitating the interaction between CDH5 and catenin β 1 (CTNN β 1) in endothelial cells [8], and others have shown that CDH5 interacts with

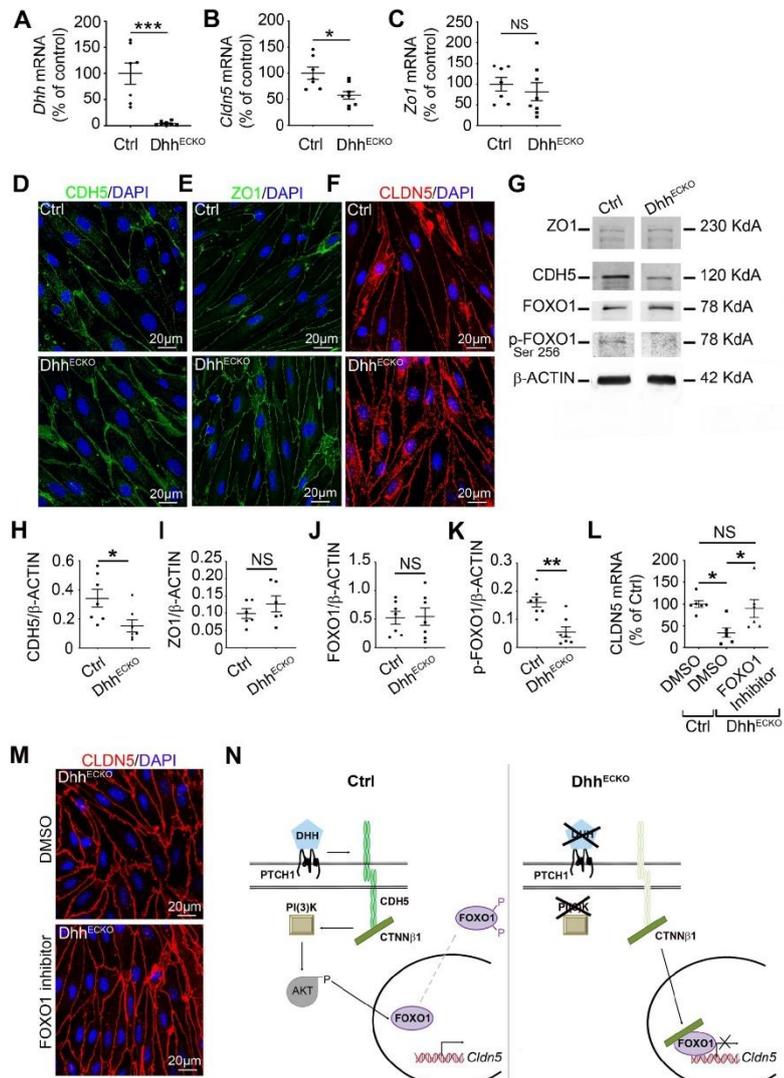


Fig 2. Endothelial-specific *Dhh* inactivation induces adherens and tight junction down-regulation through stimulation of FOXO1 transcriptional activity. (A–C) CNS MECs were isolated from *Dhh*^{ECKO} and control mice, and (A) *Dhh*, (B) *Cldn5*, and (C) *Zo1* expressions were quantified by qRT-PCR. (D–F) Primary BMECs from *Dhh*^{ECKO} and control mice were isolated and cultured on Lab-Tek. (D) CDH5 (in green), (E) ZO1 (in green), and (F) CLDN5 (in red) localizations were evaluated by immunofluorescent staining of a confluent cell monolayer. Nuclei were stained with DAPI (in blue). The experiment was repeated 3×. (G–L) CNS MECs were isolated from *Dhh*^{ECKO} and control mice, seeded and cultured until confluency, and (G, H) CDH5, (G, I) ZO1, (G, J) FOXO1, (G, K) and p-FOXO1 expression were quantified by western blot. (L) BMECs were isolated from *Dhh*^{ECKO} mice and control mice, seeded and cultured until confluency and starved for 24 h.

Control BMECs were then treated with DMSO and Dhh^{ECKO} BMECs with DMSO versus an inhibitor of FOXO1 (AS1842856). (I) CLDN5 expression was then quantified by qRT-PCR and (M) CLDN5 (in red) localization was evaluated by immunofluorescent staining of a confluent cell monolayer in Dhh^{ECKO} BMECs treated with DMSO versus an inhibitor of FOXO1 (AS1842856). Nuclei were stained with DAPI (in blue). The experiment was repeated 3 \times . (N) Summary outline of the up-regulation of endothelial junctions by the morphogen DHH through inhibition of FOXO1 transcriptional activity. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ Mann-Whitney U test. * $P \leq 0.05$ Kruskal-Wallis test. The underlying data for Fig 2 can be found in S1 Data (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12625034.v6>). *It is important to note that CNS endothelial cells are from a pooled source including both brain and spinal cord tissues. Therefore, the resulting cell cultures/lysates may be heterogeneous in their use of DHH. This remark applies to Figs 1–4. AKT, serine/threonine kinase 1; BMEC, brain microvascular endothelial cell; CDH5, cadherin5; Cldn5, claudin5; CNS, central nervous system; CTNN β 1, catenin beta 1; Ctrl, control; DHH desert hedgehog; FOXO1, forkhead box O1; MEC, microvascular endothelial cells; NS, non-significant; PTCH1, Patched-1; qRT-PCR, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; ZO1, zonula occludens 1.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000946.g002>

CTNN β 1 to inhibit transcription factor forkhead box O1 (FOXO1) [27] via PI(3)K–AKT-dependent phosphorylation, which thereby up-regulates the expression of the endothelial tight junction protein CLDN5 [27]. Therefore, we next measured the expression level of the phosphorylated form of FOXO1 (p-FOXO1) in CNS MEC cultures from Dhh^{ECKO} and control ($Dhh^{Fllox/Fllox}$) mice and demonstrated that p-FOXO1 is down-regulated in Dhh^{ECKO} mice compared to controls (Fig 2G, 2J–2K). We then treated CNS MEC cultures from Dhh^{ECKO} mice with a cell permeable inhibitor of the transcription factor FOXO1 (AS1842856), which blocks the transcription activity of FOXO1, and measured *Cldn5* mRNA expression. We demonstrated that *Cldn5* mRNA expression, in Dhh^{ECKO} CNS MEC cultures treated with the inhibitor of FOXO1, returns to the expression level of control CNS MEC cultures, unlike the Dhh^{ECKO} CNS MEC cultures treated with DMSO (Fig 2L and S1 Data). Additionally, in Dhh^{ECKO} CNS MEC cultures treated with the inhibitor of FOXO1, CLDN5 displays a well-defined pattern of sharp contours at endothelial cell–cell contacts. In contrast, in Dhh^{ECKO} CNS MEC cultures treated with DMSO, a broader, more irregular pattern is detected at endothelial cell–cell contacts (Fig 2M).

We concluded that endothelial autocrine DHH expression at the BBB maintains the pool of CDH5–CTNN β 1 signaling in endothelial cells, which promotes *Cldn5* mRNA expression and maintains a well-defined CLDN5 pattern of sharp contours at endothelial cell–cell contacts through the inhibitory phosphorylation of the transcription factor FOXO1 (Fig 2N).

In the white matter, endothelial-specific Dhh inactivation induces BBB permeability associated with endothelial and astrocytic activation in vivo

In vivo, on spinal cord sections from control and Dhh^{ECKO} mice, we confirmed that the expression of adherens junction CDH5 and tight junction CLDN5, when normalized for the number and length of blood vessels, is down-regulated under resting conditions (Fig 3A–3D, S1 Data and S3A Fig) and demonstrated that it is associated with an increase accumulation of serum proteins (fibrinogen (FGB) and albumin (ALB)) [28] (Fig 3B, 3E, 3F, S1 Data, S3B and S3C Fig) around the vessels, suggesting BBB opening.

We then analyzed the activation status of both the spinal cord endothelium and Glia Limitans in Dhh^{ECKO} and control littermates. We chose ICAM1 as a marker of endothelial activation and GFAP as a marker of astrocyte reactivity because they are both widely published in the context of inflamed CNS tissues and represent a strong indicator of a reactive response of the CNS endothelium and Glia Limitans.

Using spinal cord sections, we revealed that ICAM1 is up-regulated at the endothelium in Dhh^{ECKO} mice compared to littermate controls (Fig 3G, 3I and S1 Data) and associated with a regionalized up-regulation of GFAP, a marker of astrocyte activation, in white matter (Fig 3H, 3J and S1 Data) but not gray matter (Fig 3H, 3K and S1 Data).

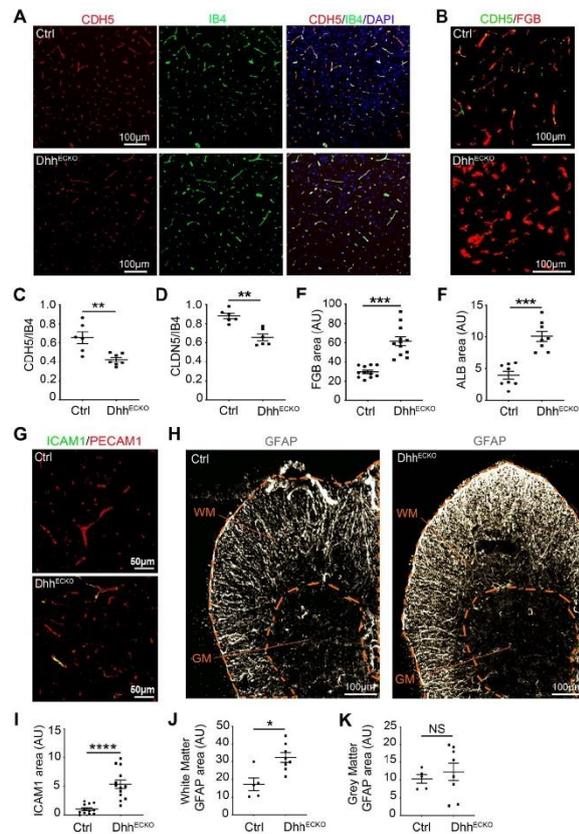


Fig 3. Endothelial-specific *Dhh* inactivation induces BBB permeability associated with endothelial and astrocytic activation in vivo: (A–F) Spinal cord sections were harvested from Dhh^{ECKO} mice and littermate controls and immunostained with anti-IB4 (in green), anti-CDH5 (in red or green), anti-CLDN5 (in red), anti-FGB (in red), and anti-ALB (in red) antibodies. (A) Representative IB4/CDH5 and (B) CDH5/FGB staining are shown. (C) CDH5/IB4, (D) CLDN5/IB4, (E) FGB, and (F) ALB positive areas were quantified (Dhh^{ECKO} *n* = 6 to 12, WT *n* = 6 to 11). (G–K) Spinal cord sections were harvested from Dhh^{ECKO} mice and littermate controls and immunostained with anti-PECAM1 (in red), anti-ICAM1 (in green), and anti-GFAP (in gray) antibodies. (G, H) Representative PECAM1, ICAM1, and GFAP staining are shown. (H) GFAP staining regionalization (WM and GM) is highlighted by orange dotted lines on the images. (I) ICAM1 and (J, K) GFAP positive areas in the WM (J) and GM (K) were quantified (Dhh^{ECKO} *n* = 8 to 13, WT *n* = 5 to 12). **P* ≤ 0.05, ***P* ≤ 0.01, ****P* ≤ 0.001, *****P* ≤ 0.0001 Mann–Whitney U test. The underlying data for Fig 3 can be found in S1 Data (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12625034.v6>). *It is important to note that CNS endothelial cells are from a pooled source including both brain and spinal cord tissues. Therefore, the resulting cell cultures/lysates may be heterogeneous in their use of DHH. This remark applies to Figs 1–4. ALB, albumin; AU, arbitrary units; BBB, blood–brain barrier; CDH5, cadherin5; CLDN5, claudin5; Ctrl, control; DHH, desert hedgehog; FGB, fibrinogen; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GM, gray matter; IB4, isolectin B4; ICAM1, intercellular adhesion molecule 1; NS, non-significant; PECAM1, platelet/endothelial cell adhesion molecule 1; WM, white matter; WT, wild type.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000946.g003>

Here, we detected that, in the white matter, DHH expression at the endothelium controls BBB tightness and demonstrated that endothelial-specific Dhh inactivation at the BBB drives endothelial and astrocyte activation.

Dhh^{ECKO}-induced BBB breakdown is sufficient to induce a secondary CNS protective barrier at the Glia Limitans

As we already demonstrated in Fig 3, Dhh^{ECKO} mice display BBB leakage, whereas control littermates feature a tight BBB.

Although we demonstrated BBB leakage in Dhh^{ECKO} mice (Fig 3B, 3E, 3F and S1 Data), we noticed that infiltrating plasmatic proteins are concentrated around the vascular area in arterioles and venules and not seamlessly distributed within the parenchyma**. To verify this observation, we quantified the distribution of immunoglobulin G (IgG) and a smaller sized dye (70 kDa fluorescein isothiocyanate (FITC) Dextran) in the 3 compartments (lumen, PVS, and parenchyma). Specifically, in control mice, there is no significant endothelial permeability, with more than 95% of IgG and 97% of 70 kDa FITC Dextran contained in the lumen of blood vessels and 5% of IgG and 3% of 70 kDa FITC Dextran segregated in the PVS area limited by the astrocytic end feet (aquaporin 4 (AQP4) or laminin (LAM) antigen) on 1 side and the vessel wall (PECAM1 or LAM antigen) on the other side, and none found in the parenchyma (S1 Data, S4A–S4E Fig and S2 Data). The quantification protocol of IgG and 70 kDa FITC Dextran distribution within the lumen, PVS, and parenchyma is described in S4 Fig. In Dhh^{ECKO} mice, vascular leakage is significant, but strikingly, 50% of IgG and 50% of 70 kDa FITC Dextran is contained into the PVS, while none is found in the parenchyma, indicating the presence of a secondary barrier at the Glia Limitans (S1 Data, S4A–S4E Fig and S2 Data). Interestingly, some overlap is observed between the IgG signal and the AQP4 signal, concentrated within the internal surface of the Glia Limitans (Fig 4A). Thus might reflect a potential interaction between the inner face of astrocyte end feet and IgG accumulated in the PVS, as astrocytes express Fc receptors (cell surface receptors for IgG), which play a role in both CNS health and disease [29,30]. The perivascular trapping of IgG in Dhh^{ECKO} mouse CNS was confirmed using co-immunostaining of IgG and LAM antigen, which mark the endothelial and astrocytic basement membranes (S5A and S5B Fig).

We have previously found that reactive astrocytes express tight junctions, notably CLDN4, under inflammatory conditions in a mouse model of multiple sclerosis (EAE) [26]. Here, we found that these data are relevant to human disease since CLDN4 is also expressed by reactive astrocytes, with stronger CLDN4 labeling intensity at the Glia Limitans, in active cortical lesions from multiple sclerosis patients (Fig 4D). Based on the above results, we investigated whether the PVS entrapment of plasmatic proteins observed in Dhh^{ECKO} mice is linked to the expression of the tight junction CLDN4 at the Glia Limitans in response to BBB permeability (Fig 4E–4H and S1 Data). We showed that CLDN4 is expressed at the Glia Limitans in Dhh^{ECKO} mice but not control littermates (Fig 4E–4H and S1 Data) using isolated neurovascular enriched fractions. Small intestine samples were used as a positive control for the quantification of CLDN4 by western blot (S6A Fig).

Altogether, these results suggest that, in Dhh^{ECKO} mice, spontaneous BBB permeability leads to the establishment of a physical barrier at the Glia Limitans, characterized by the expression of the tight junction protein CLDN4. Therefore, in Dhh^{ECKO} mice, astrocytic end feet at the Glia Limitans are “preconditioned” to form a secondary barrier protecting the parenchyma. (**It is important to note that this study focuses on arterioles and venules but not capillaries. Indeed, CLDN4 is only up-regulated in Dhh^{ECKO}-enriched neurovascular fractions, which are 100 μ m and larger in diameter (Fig 4F–4H and S1 Data). In the lysates obtained with enriched

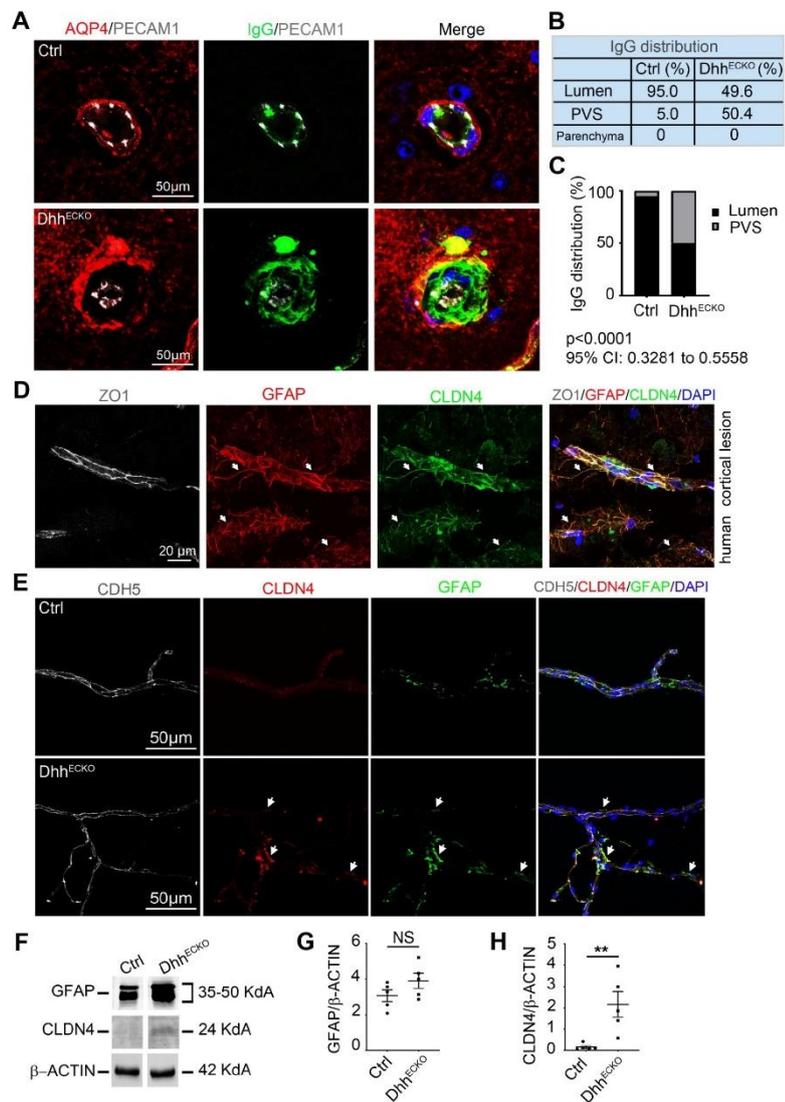


Fig 4. Dhh^{ECKO}-induced BBB breakdown is sufficient to induce a secondary CNS protective barrier at the Glia Limitans. (A–C) Spinal cord sections were harvested from Dhh^{ECKO} mice and littermate controls and (A) immunostained with anti-PECAM1 (in gray), anti-AQP4 (in green), and anti-IgG (in red) antibodies (nuclei were stained with DAPI (in blue)), and (B, C) the distribution of IgG within the lumen, PVS, and parenchyma was quantified. We quantified the amount of IgG in the PVS and parenchyma and inferred from it the amount of IgG contained in the lumen. (Dhh^{ECKO} *n* = 6, WT *n* = 6). *P* < 0.0001, 95% CI: 0.3281 to 0.5558, chi-squared test. (D) Human active multiple sclerosis cortical lesions were obtained from the NeuroCEB biobank and immunostained with anti-ZO1 (in gray), anti-GFAP (in red), and

anti-CLDN4 (in green) antibodies. Strong CLDN4 signal at the Glia Limitans is indicated by white arrows. Nuclei were stained with DAPI (in blue). (E–H) Enriched neurovascular fractions were isolated from Dhh^{ECKO} and control mouse CNS and (E) immunostained with anti-CDH5 (in gray), anti-CLDN4 (in red), and anti-GFAP (in green) antibodies (nuclei were stained with DAPI (in blue)). (F) Representative blots of GFAP and CLDN4 expression levels on Dhh^{ECKO} and control mouse enriched neurovascular fractions were shown, and (G, H) GFAP and CLDN4 expression levels were quantified by western blot of Dhh^{ECKO} and control mouse enriched neurovascular fractions. ($Dhh^{ECKO} n = 5$, WT $n = 5$). ** $P \leq 0.01$, Mann–Whitney U test. The underlying data for Fig 4 can be found in S1 Data (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12625034.v6>). *It is important to note that CNS endothelial cells are from a pooled source including both brain and spinal cord tissues. Therefore, the resulting cell cultures/lysates may be heterogeneous in their use of DHH. This remark applies to Figs 1–4. AQP4, aquaporin 4; BBB, blood–brain barrier; CDH5, cadherin5; CI, confidence interval; CLDN4, Claudin4; CNS, central nervous system; Ctrl, control; DHH desert hedgehog; GFAP, glial fibrillary acidic protein; IgG, immunoglobulin G; NS, non-significant; PECAM1, platelet/endothelial cell adhesion molecule 1; PVS, perivascular space; WT, wild type; ZO1, zonula occludens 1.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000946.g004>

neurovascular fractions, which are 20 μm and larger, CLDN4 expression level is not different between the Dhh^{ECKO} and control group (S6B–S6D Fig and S2 Data). In this condition, CLDN4 expression in arterioles and venules might have been lost in the crowd of capillaries.)

Endothelial signals can drive astrocyte barrier properties at the Glia Limitans

Given the above results, we wanted to determine if astrocyte barrier formation requires signals from the endothelial BBB or from the plasmatic protein perivascular infiltrate. To do so, we first studied in vitro the response of normal human astrocytes (NHAs) to HBMEC conditioned media versus plasmatic proteins from healthy donors. HBMECs used to produce the conditioned media were treated with either the osmotic agent Mannitol or the pro-permeability factor vascular endothelial growth factor A (VEGFA) to induce BBB breakdown (S7A Fig and S2 Data) through various methods.

We demonstrated that *Gfap* (Fig 5A, 5E–5I and S1 Data), *aldehyde dehydrogenase 1 family, member 11* (*Aldh11l1*) (Fig 5B and S1 Data) (markers of astrocyte reactivity), and *Cldn4* mRNA expression (Fig 5D, 5A–5H, 5J and S1 Data) are up-regulated in the NHA treated with HBMEC-conditioned media but not in the NHA treated with plasma from healthy donors. *vimentin* (*Vim*) (marker of astrocyte reactivity) mRNA expression level was not modulated in any condition (Fig 5C and S1 Data).

To confirm this observation in vivo, we delivered murine VEGFA or murine plasmatic proteins into the left cerebral cortex of adult mice and evaluated the consequences on CLDN4 expression by astrocytes. PBS stereotactic administration was used as a control. Importantly, VEGFA cortical stereotactic injection has already been shown to efficiently induce BBB breakdown in mice [17,31].

In vivo, GFAP (Fig 5K–5N and S1 Data) and CLDN4 (Fig 5K–5M, 5O and S1 Data) are induced in mouse cortex after murine VEGFA and murine plasmatic protein treatments, with VEGFA having a much stronger effect than plasmatic proteins.

We concluded that permeable endothelial monolayers produce signals that can drive astrocyte reactivity and tight junction expression. Plasmatic protein involvement in controlling astrocyte barrier behavior is, however, less clear as astrocyte reactivity and tight junction expression are up-regulated in vivo but not in vitro when treated with plasma; further investigations will be necessary to identify the mechanisms involved.

Mice with endothelial *Dhh* inactivation display reduced disability in a model of multiple sclerosis during the onset of the disease

To examine the impact of these findings on disease severity, we investigated the phenotype of induced experimental multiple sclerosis (EAE) in Dhh^{ECKO} and control mice.

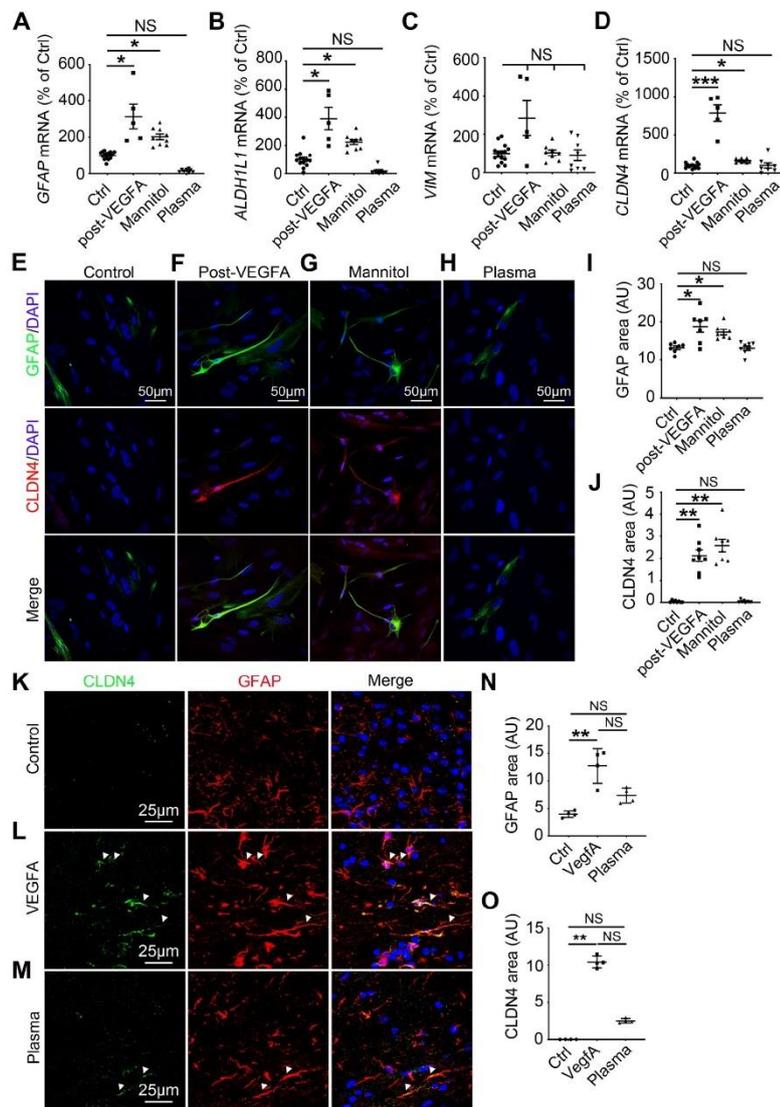


Fig 5. Endothelial signals can drive astrocyte barrier properties at the Glia Limitans. (A–K) NHA were cultured until confluency and starved for 24 h. NHA were then treated for 24 h with HBMEC medium from untreated cells (control condition), conditioned media from HBMECs treated with VEGFA, conditioned media from HBMECs treated with Mannitol, or HBMEC medium with 20% plasma from healthy donors (Mannitol and VEGFA were washed out of the HBMEC cultures before the medium was used to treat the NHA cultures). (A) *Gfap*, (B) *Aldh1l1*, (C) *Vim*, and (D) *Cldn4* mRNA expression was quantified by qRT-PCR. (Post-VEGFA $n = 5$, Mannitol $n = 8$ to 9, Plasma $n = 7$ to 8, Vehicle control $n = 14$ to 15). (E–H) GFAP (in green) and (E) CLDN4 (in red) localizations were evaluated by immunofluorescent

staining of a confluent NHA monolayer. Nuclei were stained with DAPI (in blue). The experiment was repeated 3 times. (I, J) GFAP and CLDN4 positive areas were then quantified. (Post-VEGFA $n = 7$ to 8, Mannitol $n = 7$ to 8, Plasma $n = 8$, Vehicle control $n = 7$ to 8). (K–O) Cerebral cortices of 10-week-old C57BL/6 mice were harvested 24 h following stereotactic microinjection of murine VEGFA (60 ng in 3 μ L PBS), healthy C57BL/6 mouse plasma (3 μ L), or vehicle control (3 μ L PBS). (K–M) Cortical lesions were immunostained with anti-GFAP and anti-CLDN4 antibodies. (N) GFAP positive areas and (O) CLDN4 positive areas were quantified (VEGFA $n = 4$, healthy C57BL/6 mouse plasma $n = 4$, Vehicle control $n = 4$). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ Kruskal–Wallis test. The underlying data for Fig 5 can be found in S1 Data (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12625034.v6>). Aldh1l1, aldehyde dehydrogenase 1 family, member 11; AU, arbitrary units; CLDN4, Claudin4; Ctrl, control; GFAP, glial fibrillary acidic protein; HBMEC, human brain microvascular endothelial cells; NHA, normal human astrocytes; NS, non-significant; qRT-PCR, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; VEGFA, vascular endothelial growth factor A; Vim, vimentin.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000946.g005>

We observed that in control mice, neurologic deficits were observed from day 9 and increased in severity until day 18, when clinical score stabilized at a mean of 3.2, representing hind limb paralysis. In contrast, the onset of clinical signs in Dhh^{ECKO} mice was first seen 4 days later, and the clinical course was much milder. In Dhh^{ECKO} mice, disease reached a plateau at day 21 at a mean of 2.3, indicating hind limb weakness and unsteady gait, a mild phenotype (Fig 6A and S1 Data). The EAE peak score (Fig 6B and S1 Data) and average score during the time of disability (Fig 6C and S1 Data) were both decreased in Dhh^{ECKO} mice, but there were no significant changes in survival and mortality rates (Fig 6D and S1 Data).

Interestingly, the reduced clinical course of EAE in Dhh^{ECKO} mice was much more marked during the onset of the disease (between day 12 and day 20 post EAE induction). However, when the plateau phase was reached (after day 21 post EAE induction), the clinical score difference between the Dhh^{ECKO} and the control group was greatly reduced and coincided with an acceleration of the mortality rate in both groups (Fig 6A–6D and S1 Data). One explanation for this observation is that, in the Dhh^{ECKO} group, inflammatory cells, accumulated in the PVS, end up degrading astrocytic tight junctions by secreting proteases. This previously described phenomenon [26] explains how inflammatory cells trapped in the PVS can eventually pass through the astrocytic barrier at the Glia Limitans and thereby enter the CNS, thus inactivating Dhh at the BBB. This in turn slows disease progression until the perivascular accumulation of inflammatory cells causes the degradation of the astrocyte secondary barrier, leading to the deterioration of the clinical course of EAE in the Dhh^{ECKO} mice.

Importantly, the clinical course in the Dhh^{ECKO} mice is correlated with strikingly decreased areas of demyelination as compared to the control cohort (Fig 6E, 6F and S1 Data). Critically, these studies reveal that the clinical course and pathology of EAE are strongly reduced in Dhh^{ECKO} mice during the onset of the disease.

We concluded that endothelial Dhh knockdown-induced BBB opening is associated with a clinical protective effect during the onset of the disease in a model of multiple sclerosis.

Mice with endothelial Dhh inactivation display a reinforced barrier at the Glia Limitans, restraining access to the parenchyma to inflammatory infiltrate in a model of multiple sclerosis

Although Dhh^{ECKO} mice display equivalent FGB densities (Fig 7A and S1 Data) as well as numbers of CD45+ leukocytes (Fig 7B and S1 Data) in lesions compared to those in control mice, neuropathology in both cohorts appeared very different.

We found that while the BBB is permeable in both groups, with plasmatic protein extravasation associated with equivalent CDH5 densities, astrocyte reactivity in EAE lesions in Dhh^{ECKO} mice is greatly increased with GFAP immunoreactivity strongest at the Glia Limitans (Fig 7C, 7E and S1 Data). Moreover, infiltrating plasmatic proteins in Dhh^{ECKO} mice show less CNS parenchymal dispersion (Fig 7E, 7F and S1 Data), with 68.0% of FGB trapped into the

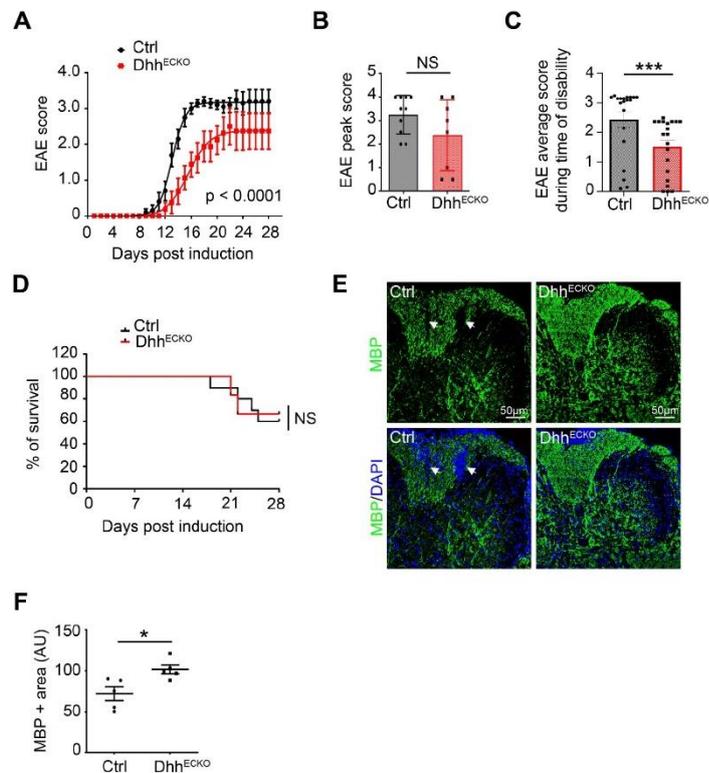


Fig 6. Dhh^{ECKO} mice display reduced disability in a model of multiple sclerosis during the onset of the disease. (A) Dhh^{ECKO} and control mice induced with EAE were scored daily on a standard 5-point scale, nonlinear regression (Boltzmann sigmoidal). (Dhh^{ECKO} $n = 8$, WT $n = 10$). (B) Dhh^{ECKO} and control mice EAE peak score, (C) EAE average score during time of disability, and (D) mortality rate were quantified other the course of the disease. (E, F) Spinal cord EAE lesions from Dhh^{ECKO} mice and littermate controls were harvested at 28 days post induction or at the time of euthanasia. (E) Dhh^{ECKO} and control lesions were immunostained with an anti-MBP (in green) antibody; arrows indicate white matter loss areas. Nuclei were stained with DAPI (in blue). (F) MBP positive areas were quantified (Dhh^{ECKO} $n = 5$, WT $n = 5$). * $P \leq 0.01$, Mann-Whitney U test. The underlying data for Fig 6 can be found in S1 Data (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12625034.v6>). AU, arbitrary units; Ctrl, control; DHH desert hedgehog; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; MBP, myelin basic protein; NS, non-significant; WT, wild type.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000946.g006>

Glia Limitans in the Dhh^{ECKO} cohort versus 32% in the control cohort (Fig 7E, S7B Fig and S1 Data).

In previous work from our laboratory [8], we showed that endothelial-specific deletion of Dhh in the peripheral vasculature is associated with vascular permeability and endothelial activation, notably in the lung, and that lipopolysaccharide (LPS) injection increased pulmonary neutrophil infiltration in Dhh^{ECKO} mice compared to control littermates. Therefore, we can hypothesize that endothelial Dhh knockdown increases the peripheral recruitment and activation of inflammatory cells that need to travel to the CNS. However, in our study, we do not

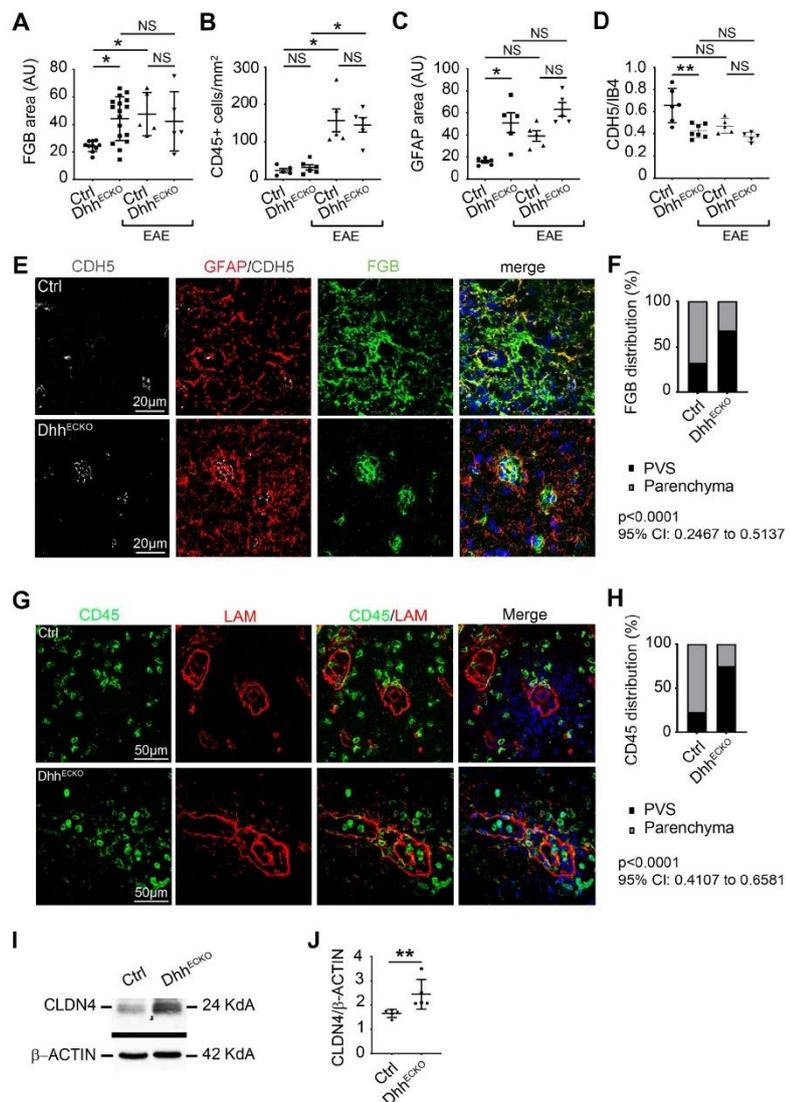


Fig 7. Mice with endothelial Dhh knockdown display a reinforced barrier at the Glia Limitans restraining access to the parenchyma to inflammation in a model of multiple sclerosis. (A–H) Spinal cord from Dhh^{ECKO} mice and littermate controls under resting condition and after EAE induction were harvested. (A–D) Dhh^{ECKO} and control sections were immunostained with anti-FGB, anti-CD45, anti-GFAP, anti-IB4, and anti-CDH5 antibodies. (A) FGB positive areas, (B) the number of CD45+ T cells per mm², (C) GFAP positive areas, and (D) CDH5/IB4 positive area were quantified (Dhh^{ECKO} n = 5 to 17, WT n = 5 to 10). (E) Dhh^{ECKO} and control EAE lesions were immunostained with anti-CDH5 (in gray), anti-FGB (in green), and anti-GFAP (in red) antibodies (Nuclei were stained with DAPI (in blue)), and (F) the

distribution of FGB within the Glia Limitans and the parenchyma was quantified. ($Dhh^{ECKO} n = 6, WT n = 5$). $P < 0.0001$, 95% CI: 0.2467 to 0.5137, chi-squared test. (G) Dhh^{ECKO} and control lesions were immunostained with anti-LAM (in red) and anti-CD45 (in green) antibodies (Nuclei were stained with DAPI (in blue)), and (H) the distribution of CD45+ T lymphocytes within the Glia Limitans and the parenchyma was quantified. $P < 0.0001$, 95% CI: 0.4107 to 0.6581, chi-squared test. (I) Representative blots of CLDN4 expression level on Dhh^{ECKO} and control spinal cord EAE lesion lysates were shown, and (J) CLDN4 expression level was quantified by western blot on Dhh^{ECKO} and control spinal cord EAE lesion lysates. ($Dhh^{ECKO} n = 5, WT n = 5$). $**P \leq 0.01$, Mann-Whitney U test. $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, Kruskal-Wallis test. The underlying data for Fig 7 can be found in S1 Data (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12625034.v6>). AU, arbitrary units; CD45, cluster of differentiation 45; CDH5, cadherin 5; CI, confidence interval; CLDN4, Claudin4; Ctrl, control; DHH desert hedgehog; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; FGB, fibrinogen; GFAP, glial fibrillary acidic protein; IB4, isolectin B4; LAM, laminin; NS, non-significant; PVS, perivascular space; WT, wild type.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000946.g007>

observe any difference in terms of CD45+ leukocyte populations in the spinal cord of Dhh^{ECKO} and control mice induced with EAE MOG₃₅₋₅₅. What we do observe is a significant difference in terms of the repartition of these CD45+ cell populations between both groups, with 77.1% of CD45+ cells trapped into the PVS in the Dhh^{ECKO} cohort versus 25.1% in the control cohort (Fig 7G, 7H, S1 Data and S7C Fig).

Altogether, these data suggest less access through the Glia Limitans in the Dhh^{ECKO} mice compared to the littermate control mice. Finally, we demonstrated that CLDN4 expression in spinal cord EAE lesion lysates is up-regulated in Dhh^{ECKO} mice as compared to control mice (Fig 7I, 7J and S1 Data).

Collectively, data from Fig 4 to Fig 7 reveal that conditional loss of a key structural component of endothelial integrity at the BBB in Dhh^{ECKO} mice leads to increased astrocyte reactivity and implementation of barrier properties at the Glia Limitans, allowing for less diffusion of plasmatic proteins and immune cells into the CNS parenchyma than in control mice. Therefore, in Dhh^{ECKO} mice, astrocytic end feet at the Glia Limitans are “preconditioned” to form a barrier, explaining their ability to protect the parenchyma more efficiently during neuropathology than in controls, leading to the protective effect observed clinically. Thus, we identify BBB leakage, induced by the down-regulation of Dhh endothelial expression, as an important mechanism controlling Glia Limitans reactivity and barrier properties, and subsequently, tissue damage and clinical deficits in a model of human disease (Fig 8).

Discussion

While it is now well established that BBB breakdown leads to soluble factor and inflammatory cell infiltration into the PVS during neuropathology [4], the function of the Glia Limitans barrier is just starting to be unraveled [15,20,24,26]. In the present study, we have enabled a different perspective on CNS barrier organization, unveiling the existence of 2 independent, dissociable states of the astrocyte and endothelial barriers in the neurovascular unit. Indeed, we confirmed that, just like the BBB, the Glia Limitans can form a protective barrier. For the first time, to our knowledge, we have demonstrated that BBB breakdown is sufficient to induce chronic barrier properties at the Glia Limitans, and we uncovered crosstalk from endothelial cells to astrocytes that restricts access to the parenchyma of plasmatic proteins and inflammatory cells during multiple sclerosis. Moreover, we showed that in Dhh^{ECKO} mice, which display an open BBB, astrocytes express the tight junction protein CLDN4 under resting conditions. Therefore, under neuroinflammatory conditions, Glia Limitans in Dhh^{ECKO} mice is primed with stronger barrier properties protecting against the onset and severity of EAE symptoms in the Dhh^{ECKO} mice compared to control littermates.

However, 2 questions remain regarding barrier properties at the Glia Limitans: (1) Is this a specific aspect of the Dhh^{ECKO} mouse model or more broadly applicable to any model of BBB breakdown; and (2) is it observed in other CNS pathologies than inflammation?

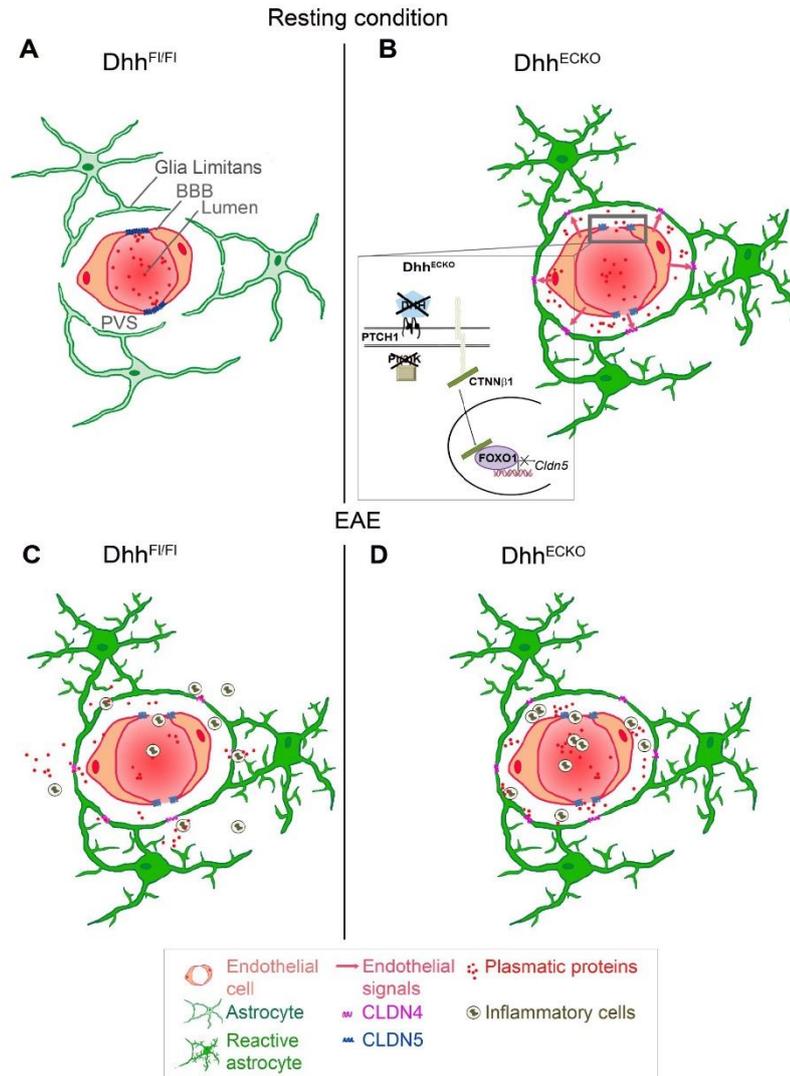


Fig 8. Schematic of the BBB and Glia Limitans in Dhh^{ECKO} versus control mice, in health and inflammatory disease. Under resting conditions, in control mice, ECs express CLDN5 and CDH5, which reinforce a closed BBB. In Dhh^{ECKO} mice, CLDN5 and CDH5 are disrupted leading to BBB permeability; in turn, astrocytes of the Glia Limitans up-regulate CLDN4, closing the Glia Limitans and restricting incoming plasmatic proteins to the PVS. Under inflammatory condition, in both control and Dhh^{ECKO} mice, CLDN5 and CDH5 are disrupted leading to BBB permeability, astrocyte reactivity, and up-regulation of CLDN4. However, in Dhh^{ECKO} mice, astrocytic end feet of the Glia Limitans have been “preconditioned” to form a barrier, explaining their ability to trap plasmatic proteins and inflammatory cells in the PVS, and thus protecting the parenchyma more efficiently than in the controls. BBB, blood-brain barrier; CDH5, cadherin 5; CLDN4, Claudin4; CLDN5, claudin5; CTNN β 1, catenin β 1; DHH desert hedgehog; EC, endothelial cells; FOXO1, forkhead box O1; PTCH1, Patched-1; PVS, perivascular space.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000946.g008>

A model of pericyte-deficient mice featuring BBB breakdown has been described; but, in this model, endothelial permeability is due to increased transcytosis and not junction degradation as in the Dhh^{ECKO} mouse model. Therefore, it would be interesting to study the behavior of astrocytes in this model, notably their capacity to express CLDN4 and to restrain parenchymal access to plasmatic proteins. Should astrocyte barrier properties be observed in the pericyte-deficient mouse model, this would be suggestive for a more generalized role of BBB breakdown in driving astrocyte barrier properties, either by parallel or convergent mechanisms.

The expression of CLDN4 by astrocytes has only been identified in mouse models of CNS inflammation (acute CNS inflammation model (stereotactic injection of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β and model of multiple sclerosis: EAE MOG₃₅₋₅₅) [26]). However, in the present study, we demonstrated that CLDN4 is expressed by astrocytes under resting conditions in response to BBB opening in the Dhh^{ECKO} mouse model and after cortical stereotactic injection of the pro-permeability factor VEGFA. The next step would be to examine astrocytic CLDN4 expression in other pathologies of the CNS, notably Alzheimer's disease, stroke, or amyotrophic lateral sclerosis in which BBB permeability has been identified as a critical pathophysiological player. This could implicate CLDN4-mediated barrier function in astrocytes as a more generalized defense against BBB opening in other chronic diseases of the CNS.

The critical role of Hh signaling in CNS neuroinflammation was first highlighted in 2011; this study revealed that during EAE, the morphogen SHH is expressed by reactive astrocytes and participates in the maintenance of BBB integrity [4]. Following this discovery, our group found that DHH is physiologically expressed at the BBB in adults [8]. Here, we demonstrated for the first time that DHH is down-regulated at the BBB during EAE and that DHH knock-down is sufficient to induce BBB permeability by inhibiting CDH5 and CLDN5 expression through the modulation of FOXO1 activity, strengthening the idea that HH signaling is essential to control BBB integrity both physiologically and under multiple sclerosis conditions. Based on our results and the literature, we hypothesize that DHH is necessary to maintain BBB tightness under physiological conditions and that DHH down-regulation under inflammatory conditions might be offset by astrocytic SHH secretion to maintain BBB homeostasis during disease progression.

Over the past years, the field has begun to acknowledge the fact that the BBB is not the sole line of defense of the CNS and that the astrocytic end feet of the Glia Limitans might play a role in restricting access to the parenchyma. Indeed, it was first described that in spinal cord injury, astrocyte scar borders corral inflammatory cells within areas of damaged tissue [32,33]. Moreover, we have found that during EAE, reactive astrocytes of the Glia Limitans form tight junctions of their own containing CLDN4 [26], a junction protein also expressed in tightly sealed epithelia [34,35]. Noteworthy is the fact that down-regulation or reorganization of CLDNs and other tight junction proteins has been implicated in permeability in various tissues, particularly the gut [19,36,37]; however, reports of dynamic tight junction protein induction resulting in functional barrier formation have been rare [38,39]. Here, we have shown for the first time that genetically induced disruption of endothelial junctions is sufficient to induce CLDN4 expression at the Glia Limitans under resting condition, identifying an inducible astrocyte barrier mediated fully by signals transmitted by the open BBB.

It has already been described, by our group and others, that astrocytes can send signals, notably VEGFA [18], thymidine phosphorylase (TYMP) [17], and SHH [4], to the BBB to modulate its state (tight versus permeable). In this study, we identify a reciprocal signaling pathway demonstrating that BBB endothelial junction disruption leads to CLDN4 expression at the Glia Limitans. Interestingly, endothelial cell capacity to send signals to neighboring cells has been previously identified, notably in the context of pericyte (mural cells associated with arterioles, capillaries, and venules) recruitment at the vascular wall [40]. Specifically, it has

been shown that platelet-derived growth factor subunit b (PDGFB) is secreted from angiogenic sprout endothelium where it serves as an attractant for co-migrating pericytes, which in turn express platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR β) [41]. Based on these arguments and our results, it appears highly likely that endothelial signals can be sent to astrocytes. Identifying such signals will be the aim of future studies by our group.

We then showed that in animals, which exhibit an open BBB (Dhh^{ECKO} mice), astrocytic end feet of the Glia Limitans form a barrier more efficiently than in the littermate controls, leading to the protective effect observed clinically in the model of multiple sclerosis. This is somehow reminiscent of what is observed in brain ischemic preconditioning where a mild nonlethal ischemic episode (preconditioning) can produce resistance to a subsequent more severe ischemic insult [42,43]. Here, inducing BBB opening and PVS plasmatic protein accumulation produces resistance to the subsequent massive inflammatory infiltration induced by multiple sclerosis development. This could account for the infrequency of recurrent multiple sclerosis relapse/lesion formation at the same location in the CNS. Interestingly, among neurons and nonneuronal cells, astrocytes are considered increasingly important in regulating cerebral ischemic tolerance [44], and a parallel can be easily drawn between these results and ours showing a major role for “preconditioned” astrocytes in the control of “chronic neuroinflammation tolerance” and protection against further relapse.

In light of the above observations, we may assume that the CNS has the ability to protect itself against isolated BBB leakage episodes through a secondary barrier at the Glia Limitans that takes over once the BBB is open. Moreover, it suggests that manipulation of the BBB and Glia Limitans in combination may have greater potential than either alone to control CNS entry of leukocytes and pro-inflammatory soluble factors in conditions such as multiple sclerosis and perhaps more widely. Indeed, taking into account both components of the neurovascular unit is of translational interest, notably to limit CNS parenchymal access to pathogenic agents by strengthening the Glia Limitans once the BBB is open in cardiovascular diseases such as brain ischemic strokes [45], neuroinfections [46], and neurodegeneration (Parkinson/Alzheimer’s diseases and vascular dementia) [47], or to facilitate parenchymal access to drugs, by opening the BBB and Glia Limitans together, in CNS tumor treatment [48]. Along similar lines, it is unknown how the barrier properties of the Glia Limitans may impact the pharmacokinetics of drugs that must enter the CNS parenchyma in conditions such as multiple sclerosis, which may account for treatment failure.

In summary, our study first demonstrates the critical role of DHH in maintaining BBB integrity. We find that DHH is down-regulated during the animal model of multiple sclerosis and that Dhh knockdown leads to BBB opening. Using Dhh knockdown as a tool to cause BBB opening, we then show that BBB permeability is sufficient to induce a secondary barrier at the Glia Limitans, mediated by CLDN4 and astrocyte reactivity. These findings not only highlight the capacity for bidirectional signaling between the endothelial BBB and the astrocytic Glia Limitans in modulating the double barriers of the CNS but also provide support for a novel concept of “chronic neuroinflammatory tolerance”, in which chronic induction of Glia Limitans barrier properties by BBB opening may lead to a protective effect against neuroinflammatory disease activity and progression.

Methods

Human tissues

Cortical sections from multiple sclerosis patients (active lesions) and healthy controls (frontal cortex) were obtained from the NeuroCEB bio bank (<https://www.neuroceb.org/fr>). The sections were 30 μ m thick and obtained from fresh frozen samples.

Mice

Dhh Floxed (*Dhh^{Flox}*) mice were generated at the “Institut Clinique de la Souris” through the International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC) from a vector generated by the European conditional mice mutagenesis program, EUCOMM, and described before [8].

The Cre recombinase in cadherin5 (*Cdh5-Cre^{ERT2}*) mice was activated by intraperitoneal injection of 1-mg tamoxifen (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, United States of America) for 5 consecutive days at 8 weeks of age. Mice were phenotyped 2 weeks later. Successful and specific activation of the Cre recombinase has been verified by measuring recombination efficacy in *Cdh5-Cre^{ERT2};Rosa26^{mTmG}* mice (S2A Fig). Importantly, *Dhh* endothelial knockdown does not impact CNS angiogenesis (S2 Data) nor angioarchitecture (S2D Fig). The *Cdh5-Cre^{ERT2}* mice and C57BL/6 mice were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA).

Ethical statement

Human samples: The NeuroCEB bio bank and the INSERM U1034 certify that all human sections utilized for this study are ethically obtained with documented, legal permission for research use (authorization number #AC-2018-3290 obtained from the Ministry of Higher Education and Research) and in the respect of the written given consent from the source person in accordance with applicable laws and the World Medical Association (WMA) Helsinki declaration of 2013.

Animal experiments were performed in accordance with the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes and approved by the local Animal Care and Use Committee of the Bordeaux University CEEA50 (IACUC protocol #16901).

Neurovascular fraction enrichment from mouse CNS

Mouse was humanely killed by cervical dislocation, and its head was cut and rinsed with 70% ethanol. Brain and spinal cord were then harvested, and cerebellum, olfactory bulb, and white matter were removed from the brain with sterile forceps. Additionally, meninges were eliminated by rolling a sterile cotton swab at the surface of the cortex. The cortex and spinal cord were then transferred in a potter containing 2 mL of buffer A (HBSS 1X w/o phenol red (Gibco, Waltham, Massachusetts, USA), 10-mM HEPES (Gibco), and 0.1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma Aldrich), and the CNS tissue was pounded to obtain an homogenate, which was collected in a 15-mL tube. The potter was rinsed with 1 mL of buffer A, which was added to the 2-mL homogenate. Cold 30% dextran solution was then added to the tube (V:V) to obtain a 15% dextran working solution centrifuged for 25 minutes at 3,000 g, 4°C without brakes. After centrifugation, the pellet (neurovascular components and red cells) was collected, and the supernatant (dextran solution and neural components) was centrifuged again to get the residual vessels. Neurovascular components were then pooled and resuspended in 4 mL of buffer B (HBSS 1X Ca²⁺/Mg²⁺ free with phenol red (Gibco), 10-mM HEPES (Gibco), and 0.1% BSA (Sigma Aldrich)).

Neurovascular fraction enrichment for RT-PCR, western blots, or immunohistochemistry

After centrifugation of the cell suspension, the pellet was washed 3 times with the buffer B and filtered through a 100- μ m nylon mesh (Millipore Corporation, Burlington, Massachusetts, USA). The nylon mesh was washed with 7 mL of buffer B to collect the retained enriched

neurovascular fractions. The suspension was then centrifuged for 10 minutes at 1,000 *g*, and the pellet suspended in 300 μ L of radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer for western blot analysis or 1,000 μ L of Tri-Reagent (MRC, Cincinnati, Ohio, USA) for quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis. For immunohistochemistry, the pellet was suspended in 3 mL of a solution of matrigel (Corning, Steuben, New York, USA)-Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 1 g/L glucose, Mg^{+} , Ca^{2+} (Gibco) 1:80, distributed on a labtek (Starstedt, Nümbrecht, Germany) (1 mouse brain is needed to seed 1 labtek) and incubated for 30 minutes at 37°C. Finally, the enriched neurovascular fraction embedded in the matrigel (Corning) solution was fixed with 10% formalin for 10 minutes.

Primary culture of mouse CNS micro vascular endothelial cells (CNS MECs)

After centrifugation of the cell suspension, the pellet was washed 3 times with the buffer B and transferred in an enzyme solution (2 mg/mL Collagenase/Dispase (Roche, Bale, Switzerland), 0.147 μ g/mL TLCK (Lonza, Bäle, Switzerland), and 10 μ g/mL DNase 1 (Roche)), prewarmed at 37°C, before being placed on a shaking table at maximum speed agitation at 37°C. After 30 minutes, the digestion was stopped by adding 10 mL of buffer B, the cell suspension centrifuged, and the digested neurovascular pellet washed 3 times with 3 mL of buffer B. After the 3 washing steps, the digested neurovascular pellet was resuspended in 1 mL of Mouse Brain Endothelial Cell Culture Medium (DMEM 1 g/L glucose, Mg^{+} , Ca^{2+} (Gibco), fetal bovine serum (FBS) 20% (Gibco), sodium pyruvate 2% (Gibco), nonessential amino acids 2% (Lonza), FGF 1 ng/mL (PeproTech, Rocky Hill, New Jersey, USA), and gentamycin 10 mg/mL (Gibco)), and plated on a labtek (Starstedt) (1 mouse brain is needed to seed 1 labtek) previously coated with 2% matrigel (Corning) diluted in DMEM 1 g/L glucose, Mg^{+} , Ca^{2+} (Gibco).

Cell culture

HBMECs (Alphabio Regen—CliniSciences, Nanterre, France) were cultured in endothelial basal medium-2 (EBM-2) supplemented with EGM-2 BulletKits (Lonza). Cells from passage 3 to passage 6 were used. Before any treatment, cells were serum starved in 0.5% FBS EGM-2 medium for 24 hours. NHAs (Lonza) were cultured in astrocyte basal medium (ABM) supplemented with AGM BulletKits (Lonza). Cells from passage 2 to passage 4 were used. Before any treatment, cells were serum starved in DMEM 1 g/L glucose, Mg^{+} , Ca^{2+} (Gibco) without serum for 24 hours.

Cytokines/growth factors/chemicals

Human IL-1 β was purchased from PeproTech (Rocky Hills, New Jersey, USA), and Human and mouse VEGF-165 (VEGFA) were purchased from CliniSciences (Nanterre, France). Based on previous studies, Human IL-1 β and Human VEGF-165 were routinely used at 10 ng/mL [19,49]. Mouse VEGF-165 was used at a concentration of 20 ng/ μ L. The inhibitor of FOXO1 total (AS1842856) was purchased from Merck (Kenilworth, New Jersey, USA) and was used at 100 nM [50]. D-Mannitol was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) and was used at 100 mM [51].

Antibodies

Anti-CLDN4 (mouse), anti-CLDN5 (mouse (tissues) and rabbit (cell culture)), anti-human ZO1 (rabbit), and anti-GFAP (rat) were from Invitrogen (Carlsbad, California, USA). Anti-CDH5 (goat) was from R&D systems (Minneapolis, Minnesota, USA). Anti-human CDH5 (mouse) and anti-human DHH (H-85) (rabbit) were from Santa Cruz Biotech (Santa Cruz,

California, USA). Anti-FGB (rabbit) and anti-human PECAM1 (mouse) were from Dako (Carpinteria, California, USA). Anti-ALB (sheep) and anti-MBP (rat) were from Abcam (Cambridge, Massachusetts, USA). Anti-CD45 (rat) was from eBioscience (San Diego, California, USA). Anti-RNA binding fox-1 homolog 3 also known as neuronal nuclei antigen (NEUN) (rabbit) and anti-AQP4 (rabbit) were from Millipore (Billerica, Massachusetts, USA). Anti-LAM (rabbit) was from Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Anti-ZO1 (rabbit) was from Life Technologies (Grand Island, New York, USA). Anti-FOXO1 (rabbit), anti-p-FOXO1 (rabbit), and anti- β -ACTIN (rabbit) were from cell signaling (Danvers, Massachusetts, USA).

Quantitative RT-PCR

RNA was isolated using Tri Reagent (Molecular Research Center) as instructed by the manufacturer, from 3×10^5 cells or from isolated mouse-enriched neurovascular fractions. For qRT-PCR analyses, total RNA was reverse transcribed with Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase (Promega, Madison, Wisconsin, USA), and amplification was performed on a DNA Engine Opticon2 (MJ Research, St. Bruno, Canada) using B-R SYBER Green SuperMix (Quanta Biosciences, Beverly, Massachusetts, USA). Primer sequences are reported in Table 1.

The relative expression of each mRNA was calculated by the comparative threshold cycle method and normalized to β -actin mRNA expression.

Western blots

Protein expression was evaluated by SDS-PAGE. Protein loading quantity was controlled using the rabbit monoclonal anti- β -actin antibody (cell signaling). Secondary antibodies were from Invitrogen. The signal was then revealed by using an Odyssey Infrared imager (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA). For quantification, the mean pixel density of each band was measured using Image J software (NIH, Bethesda, Maryland, USA), and data were standardized to β -actin, and fold change versus control calculated.

Stereotactic injection

Ten-week-old C57BL/6 mice (4 mice per condition) were anaesthetized using isoflurane (3% induction and 1% maintenance) (Virbac Schweiz, Glattbrugg, Germany) and placed into a stereotactic frame (Stoelting Co., Illinois, USA). To prevent eye dryness, an ophthalmic ointment was applied at the ocular surface to maintain eye hydration during the time of surgery. The skull was shaved, and the skin incised on 1 cm to expose the skullcap. Then, a hole was drilled into the skull, using a pneumatic station S001+TD783 Bien Air, until reaching the dura mater. A total of 3 μ l of murine VEGFA (20 ng/ μ L), 3 μ L of healthy mouse plasma, or 3 μ L of vehicle control (PBS) were then delivered at 0.01 μ l/s into the frontal cortex at coordinates of 1 μ m posterior to bregma, 2 μ m left of the midline, and 1.5 μ m below the surface of the cortex [36].

Mice received a subcutaneous injection of buprenorphine (0.05 mg/kg) (Ceva santé animale, Libourne, France) 30 minutes before surgery and again 8 hours post-surgery to assure a constant analgesia during the procedure and postoperatively. Mice were humanely killed by pentobarbital (Richter Pharma, Wels, Austria) overdose at 24 hours post injection (dpi). For histological assessment, the brain of each animal was harvested.

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)

Ten-week-old female mice were immunized by subcutaneous injection of 300- μ g myelin oligodendrocyte glycoprotein-35-55 (MOG₃₅₋₅₅) (Hooke Laboratories, Lawrence, Massachusetts,

Table 1. List of primers used for RT qPCR.

<i>mDhh</i>	F	5' -CTTGGACATCACACGCTG- 3'
	R	5' -ATGTAGTTCCCTCAGCCCCT- 3'
<i>mIcam1</i>	F	5' -TGGCCTGGGGGATGCACACT- 3'
	R	5' -CCACCGGGCTGTAGGTGGGT- 3'
<i>mVcam1</i>	F	5' -CGTACACCATCCGCCAGGCA- 3'
	R	5' -TAGAGTGAAGGAGTTCGGGCG- 3'
<i>mCldn5</i>	F	5' -GCAAGGTGTATGAATCTGTGCT- 3'
	R	5' -GTCAAGGTAACAAAGAGTGCCA- 3'
<i>mZo1</i>	F	5' -GCTAAGAGCACAGCAATGGA- 3'
	R	5' -GCATGTTCAACGTTATCCAT- 3'
<i>mβ-actin</i>	F	5' -GAAGCTGTGCTATGTTGCTCTA- 3'
	R	5' -GGAGGAAGAGGATGCGGCA- 3'
<i>hGfap</i>	F	5' -TGGGTCAAAGGAAACCGGAA- 3'
	R	5' -GAAAGTCCAAGCCATCAGC- 3'
<i>hDhh</i>	F	5' -AACAGCTTACTTCCGGCTCC- 3'
	R	5' -CGACTCTTGTGGGCTCTGTT- 3'
<i>hIcam1</i>	F	5' -ACGCCGGAGGACAGGGCATT- 3'
	R	5' -GGGGCTATGCTCCCCACCA- 3'
<i>hVcam1</i>	F	5' -GGCCAGTTGAAGGATGCGGG- 3'
	R	5' -AGAGCACGAGAAGCTCAGGAGAA- 3'
<i>hAldh1L1</i>	F	5' -CCAGGGTCTTCTTTGAGCCA- 3'
	R	5' -CACCAGAAGCCAGGCCAAAT- 3'
<i>hVim</i>	F	5' -CAGTTTTTCAGGAGCGCAAGA- 3'
	R	5' -CAAGTTGGTTGGATACTTGTCTGG- 3'
<i>hCldn4</i>	F	5' -GACACTAATGAGCCTGGGAGG- 3'
	R	5' -GTGCACAGGTCCCATTATTGTAG- 3'
<i>hβ-actin</i>	F	5' -GCTGTGCTACGTCGCCCTG- 3'
	R	5' -GGAGGAGCTGGAAGCAGCC- 3'

F, forward; R, reverse; RT qPCR, quantitative reverse transcription polymer chain reaction.

β-actin was used as the household gene.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000946.t001>

USA) in 200- μ l Freund's Adjuvant containing 300- μ g/mL mycobacterium tuberculosis H37Ra (Hooke Laboratories) in the dorsum. Mice were administered with 500-ng pertussis toxin (PTX) intraperitoneously on day of sensitization and 1 day later (Hooke Laboratories). The emulsion provides antigen, which initiates expansion and differentiation of MOG-specific auto-immune T cells. PTX enhances EAE development by providing additional adjuvant. EAE will develop in mice 7 to 14 days after immunization (Day 0): Animals that develop EAE will become paralyzed. Disease was scored (0, no symptoms; 1, floppy tail; 2, hind limb weakness (paraparesis); 3, hind limb paralysis (paraplegia); 4, fore and hind limb paralysis; 5, death) [31] from day 7 post immunization until day 32 post immunization. At Day 32, all the animals were euthanized by pentobarbital (Richter Pharma) overdose. For histological assessment, cervical, lumbar, and dorsal sections of each animal spinal cord, as well as the spleen, were harvested.

Immunohistochemistry

Prior to tissue collection and staining, mice were transcardially perfused with PBS (10 mL) followed by 10% Formalin (10 mL) to remove intravascular plasma proteins. Brain and spinal cord samples were either fixed in 10% formalin for 3 hours, incubated in 30% sucrose

overnight, OCT embedded and cut into 9- μ m thick sections, or directly OCT embedded and cut into 9 μ m thick sections. Cultured cells were fixed with 10% formalin for 10 minutes. Human frozen sections were used directly without any prior treatment. Concerning the fixed sections, for CLDN4, prior to blocking, sections were soaked in Citrate (pH 7.5; 100°C). For CLDN5, prior to blocking, sections were soaked in EDTA (pH 6.0; 100°C). For CD45, sections were treated with 0.5 mg/mL protease XIV (Sigma Aldrich) at 37°C for 5 minutes. Primary antibodies were used at 1:100 except CLDN4 (1:50), FGB (1:1,000), and ALB (1:1,000). Samples were examined using a Zeiss Microsystems confocal microscope (Oberkochen, Germany), and stacks were collected with z of 1 μ m.

For immunofluorescence analyses, primary antibodies were resolved with Alexa Fluor-conjugated secondary polyclonal antibodies (Invitrogen), and nuclei were counterstained with DAPI (1:5000) (Invitrogen). For all immunofluorescence analyses, negative controls using secondary antibodies only were done to check for antibody specificity.

Morphometric analysis

Morphometric analyses were carried out using NIH ImageJ software (NIH).

BBB permeability was evaluated by measuring tight junction integrity and plasmatic protein extravasation. Brain and spinal cord sections were immunostained for the expression of CLDN5/CDH5 and FGB/IgG/ALB, respectively. For each brain or spinal cord section, CLDN5+, CDH5+, FGB+, IgG+, and ALB+ areas were quantified in 20 pictures taken at the margins of the lesion area under 40 \times magnification. One section was quantified per spinal cord (3 different zones are displayed on the same section: 1 cervical, 1 lumbar, and 1 dorsal to get a global vision of the lesion) (per mouse).

Leukocyte densities were evaluated in sections stained for the expression of CD45 leukocyte population. For each brain or spinal cord section, CD45+ leukocytes were counted in 20 pictures randomly taken under 40 \times magnification. One section was quantified per spinal cord (3 different zones are displayed on the same section: 1 cervical, 1 lumbar, and 1 dorsal to get a global vision of the inflammatory lesion) (per mouse).

Demyelination was evaluated in spinal cord sections stained for the expression of MBP. For each spinal cord section, MBP+ area was quantified in 10 pictures taken in and around inflammatory lesion sites under 20 \times magnification. One section was quantified per spinal cord (3 different zones are displayed on the same section: 1 cervical, 1 lumbar, and 1 dorsal to get a global vision of the lesion) (per mouse).

Plasmatic protein and leukocyte infiltrate distribution at the neurovascular unit were evaluated in brain or spinal cord sections (1) triple stained for PECAM1 or CDH5 (markers of the BBB), IgG (plasmatic proteins), and AQP4 or GFAP (markers of the Glia Limitans); or (2) double stained for IgG (plasmatic proteins), FITC Dextran (exogenous tracer) or CD45 (leukocyte infiltrate), and LAM (marker of basement membranes). For each section, the distribution (between the lumen, the PVS, and the parenchyma) of IgG, 70 kDa FITC Dextran or leukocyte infiltrate was quantified for 5 to 6 neurovascular units randomly taken under 60 \times magnification, each 1 from a different animal. We used negative working images highlighting the endothelial BBB and astrocyte Glia Limitans and outlined them by using dotted lines. Dotted lines were then transferred to the plasmatic protein or leukocyte infiltration images so that we could quantify their distribution within the 3 compartments (lumen, PVS, and parenchyma).

Statistical analyses

Results are reported as mean \pm SEM. Comparisons between groups were analyzed for significance with the nonparametric Mann-Whitney U test, the nonparametric Kruskal-Wallis test

followed by the Dunn multiple comparison test when we have more than 2 groups, the chi-squared test for the distribution of plasmatic proteins and inflammatory cells in the neurovascular unit, or a nonlinear regression test (Boltzmann sigmoidal) for the EAE scoring analysis using GraphPad Prism v8.0.2 (GraphPad, San Diego, California, USA). Differences between groups were considered significant when $P \leq 0.05$ (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

Supporting information

S1 Text. Supporting information file containing the S1 Data and S2 Data legends and DOI links (A), the Supporting Methods (B), and the associated References (C). (DOCX)

S1 Raw Images. Supporting information file containing the original, uncropped, and minimally adjusted images supporting all blot and gel results reported in Fig 2 panel G, Fig 4 panel F, and Fig 7 panel I as well as S6 Fig panel A and B. (PDF)

S1 Fig. (Related to Fig 1 and Fig 2). BMEC purity analysis shows limited contamination by other neurovascular components (A) Primary BMECs from Dhh^{ECKO} and control mice were isolated and cultured on Lab-Tek. ZO1 (in green) and SMA, NG2, IBA1, or GFAP (in red) localizations were evaluated by immunofluorescent staining of a confluent cell monolayer. Nuclei were stained with DAPI (in blue). The experiment was repeated 3 \times . **Mouse brain in situ hybridization analysis highlights *Dhh* expression at the BBB. (B)** C57BL/6 cortical cross section hybridized with the *Dhh* RNA probe show *Dhh* expression in blood vessels. A control section hybridized with the *Dhh* antisense RNA probe show the absence of hybridization signals. **MECs isolated from the spinal cord of mice induced with EAE MOG₃₅₋₅₅ are highly contaminated by leukocytes (C)** Spinal cord MECs were isolated from 12-week-old C57BL/6 mice at day 13 post induction with EAE MOG₃₅₋₅₅ or placebo and *Pecam1*, *Cd45*, *Sma*, *Ng2*, and *Gfap* expressions were quantified by qRT-PCR (cycle threshold mean values) before and after the cell suspension were depleted in CD45⁺ leukocytes. *β -actin* is used as a reference. **A MACS CD45+ cell depletion step is sufficient to eliminate leukocyte contamination in MECs isolated from the spinal cord of mice induced with EAE MOG₃₅₋₅₅ (D)** Representative graphs of flow cytometry analysis performed on C57BL/6 mouse spinal cord MECs harvested at day 13 post EAE MOG₃₅₋₅₅ induction. Analysis showed no CD45⁺ cell population in samples depleted in leukocytes using the MACS CD45+ cell isolation kit (Miltenyi Biotec) (EAE MOG₃₅₋₅₅ spinal cord MECs $n = 3$; EAE MOG₃₅₋₅₅ spinal cord MECs + MACS CD45+ cell isolation $n = 3$). ***Dhh* endothelial knockdown does not impact CNS MEC viability in culture (E-F).** (E) Primary CNS MECs from Dhh^{ECKO} and control mice were isolated and cultured on Lab-Tek and immunostained with Propidium Iodide (in red) and Hoechst 33342 to label the nuclei (in blue). (F) Dhh^{ECKO} versus control primary CNS MEC viability was evaluated by quantifying the number of nuclei that incorporated Propidium Iodide. NS, Mann-Whitney U test. The underlying data for S1 Fig can be found in S2 Data (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12625085.v7>). (TIF)

S2 Fig. (Related to Fig 3, Fig 4, Fig 6 and Fig 7). *Cadherin5Cre^{ERT2}* recombinase activation in blood vessels is successful and specific (A) Brain and spinal cord sections were harvested from *Cadherin5Cre^{ERT2}*, *Rosa26^{mTmG}* mice and littermate controls and immunostained with anti-GFP (in green) and anti-PECAM1 (in red) antibodies. ***Dhh* endothelial knockdown does not impact CNS angiogenesis (B)** Spinal cord sections were harvested from Dhh^{ECKO} mice and littermate controls and immunostained with an anti-IB4 (in green) antibody. IB4 positive

area was quantified (Dhh^{ECKO} $n = 7$, control $n = 6$). (C) Cortical sections were harvested from Dhh^{ECKO} mice and littermate controls and immunostained with an anti-IB4 (in green) antibody. IB4 positive area was quantified (Dhh^{ECKO} $n = 6$, WT $n = 6$). **Dhh endothelial knock-down does not impact brain angioarchitecture** (D) The vascular network in the brain of Dhh^{ECKO} mice and control littermates was imaged by microcomputed tomography (micro-CT). NS, Mann-Whitney U test. The underlying data for S2 Fig can be found in S1 Data (individual numerical data (excel file)) and S2 Data (statistical analysis (Prism file)) (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12625034.v6>; <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12625085.v7>). (TIF)

S3 Fig. Endothelial-specific Dhh inactivation induces BBB permeability in vivo. (A) Spinal cord sections were harvested from Dhh^{ECKO} mice and littermate controls and immunostained with anti-IB4 (in green) and anti-CLDN5 (in red) antibodies. Representative IB4/CLDN5 staining was shown. (B–C) Spinal cord sections were harvested from Dhh^{ECKO} mice and littermate controls and immunostained with anti-CDH5 or anti-CLDN5 (in green), and anti-FGB or anti-ALB (in red) antibodies. Representative (B) CDH5/FGB and (C) CLDN5/ALB staining were shown. (TIF)

S4 Fig. (Related to Fig 4). Dhh^{ECKO}-induced BBB breakdown is sufficient to induce a secondary CNS protective barrier at the Glia Limitans. (A) Brain sections were harvested from Dhh^{ECKO} mice and littermate controls injected with 70 kDa FITC Dextran and (A) immunostained with an anti-LAM (in red) antibody (nuclei were stained with DAPI (in blue)). Representative LAM/FITC Dextran staining was shown. (B) Negative working images of LAM channels were used to highlight the endothelial (EBM) and astrocyte (ABM) basement membranes, using orange dotted lines. The outlines were then transferred to the FITC Dextran images to discriminate the distribution of FITC Dextran between the lumen, PVS, and parenchyma. (C–D) The distribution of FITC Dextran within the lumen, PVS, and parenchyma was quantified. (Dhh^{ECKO} $n = 6$, control $n = 6$) $P < 0.0001$, 95% CI: 0.3518 to 0.5734, chi-squared test. (E) Negative working images of AQP4/PECAM1 channels were used to highlight the endothelial (EBM) and astrocyte (ABM) basement membranes, using orange dotted lines. The outlines were then transferred to the IgG images to discriminate the distribution of IgG between the lumen, PVS, and parenchyma. The underlying data for S4 Fig can be found in S2 Data (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12625085.v7>). (TIF)

S5 Fig. (Related to Fig 4). Dhh^{ECKO}-induced BBB breakdown is sufficient to induce a secondary CNS protective barrier at the Glia Limitans. (A) Spinal cord sections were harvested from Dhh^{ECKO} mice and littermate controls and immunostained with anti-LAM (in green) and anti-IgG (in red) antibodies (nuclei were stained with DAPI (in blue)). Representative LAM/IgG staining was shown. (B) Negative working images of LAM channels were used to highlight the endothelial (EBM) and astrocyte (ABM) basement membranes, using orange dotted lines. The outlines were then transferred to the IgG images to discriminate the distribution of IgG between the lumen, PVS, and parenchyma. (TIF)

S6 Fig. (Related to Fig 4). Small intestine samples are used as a positive control for the quantification of CLDN4 expression by western blot. (A) Representative blots of CLDN4 expression level on control mouse neurovascular unit lysates and mouse small intestine lysates were shown. **There is astrocyte reactivity but no astrocytic CLDN4 up-regulation at the capillary level in Dhh^{ECKO} mouse CNS.** (B) Representative blots of GFAP and CLDN4

expression level on Dhh^{ECKO} and control lysates were shown. Lysates were obtained with neurovascular units, which are 20 μ m and larger. (C) GFAP expression level was quantified by western blot on Dhh^{ECKO} and control lysates obtained with neurovascular units, which are 20 μ m and larger. (D) CLDN4 expression level was quantified by western blot on Dhh^{ECKO} and control lysates obtained with neurovascular units, which are 20 μ m and larger. (Dhh^{ECKO} $n = 6$, WT $n = 6$). * $P \leq 0.05$, Mann–Whitney U test. The underlying data for S6 Fig can be found in S2 Data (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12625085.v7>).

(TIF)

S7 Fig. (Related to Fig 5 and Fig 7). Both VEGFA and Mannitol induce HBMEC permeability in vitro. (A) Cultured HBMECs were treated with PBS, VEGFA, or Mannitol for 6 h, and HBMEC monolayer permeability to 70 kDa FITC Dextran was quantified. **Mice with endothelial Dhh knockdown display a reinforced barrier at the Glia Limitans restraining access to the parenchyma to inflammation in a model of multiple sclerosis:** (B) Negative working images of GFAP/CDH5 channels were used to highlight the endothelial (EBM) and astrocyte (ABM) basement membranes, using orange dotted lines. The outlines were then transferred to the FGB images to discriminate the distribution of FGB between the lumen, PVS, and parenchyma. (C) Negative working images of the LAM channel were used to highlight the endothelial (EBM) and astrocyte (ABM) basement membranes, using blue dotted lines. The outlines were then transferred to the CD45 images to discriminate the distribution of leukocytes between the lumen, PVS, and parenchyma. * $P \leq 0.05$, **** $P \leq 0.0001$ Kruskal–Wallis test. The underlying data for S7 Fig can be found in S2 Data (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12625085.v7>).

(TIF)

Acknowledgments

We thank Dr. Mary P. Heyer for her proofreading and correction of the manuscript. We thank Annabel Reynaud, Sylvain Grolleau, and Maxime David for their technical help. We thank Christelle Boullé for administrative assistance.

Author Contributions

Conceptualization: Candice Chapouly.

Data curation: Pierre Mora, Pierre-Louis Hollier, Sarah Guimbal, Alice Abelanet, Aïssata Diop, Lauriane Cornuault, Marie-Ange Renault, Candice Chapouly.

Formal analysis: Pierre-Louis Hollier, Sarah Guimbal, Aïssata Diop, Lauriane Cornuault, Candice Chapouly.

Funding acquisition: Candice Chapouly.

Investigation: Candice Chapouly.

Methodology: Sam Horng, Candice Chapouly.

Resources: Candice Chapouly.

Supervision: Candice Chapouly.

Validation: Pierre Mora, Pierre-Louis Hollier, Sarah Guimbal, Alice Abelanet, Aïssata Diop, Lauriane Cornuault, Marie-Ange Renault, Candice Chapouly.

Visualization: Alice Abelanet.

Writing – original draft: Candice Chapouly.

Writing – review & editing: Thierry Couffinhal, Sam Horng, Alain-Pierre Gadeau, Marie-Ange Renault, Candice Chapouly.

References

1. McConnell HL, Kersch CN, Woltjer RL, Neuwelt EA. The Translational Significance of the Neurovascular Unit. *J Biol Chem*. 2017; 292(3):762–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.760215> PMID: 27920202
2. Bartholomäus I, Kawakami N, Odoardi F, Schläger C, Miljkovic D, Ellwart JW, et al. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature*. 2009; 462(7269):94–98. <https://doi.org/10.1038/nature08478> PMID: 19829296
3. Brück W, Bitsch A, Kolenda H, Brück Y, Stiefel M, Lassmann H. Inflammatory central nervous system demyelination: correlation of magnetic resonance imaging findings with lesion pathology. *Ann Neurol*. 1997; 42(5):783–793. <https://doi.org/10.1002/ana.410420515> PMID: 9392578
4. Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, et al. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science*. 2011; 334(6063):1727–1731. <https://doi.org/10.1126/science.1206936> PMID: 22144466
5. Singh VB, Singh MV, Gorantla S, Poluektova LY, Maggirwar SB. Smoothed Agonist Reduces Human Immunodeficiency Virus Type-1-Induced Blood-Brain Barrier Breakdown in Humanized Mice. *Sci Rep*. 2016; 6:26876. <https://doi.org/10.1038/srep26876> PMID: 27241024
6. Xia Y, He Q, Li Y, Chen S, Huang M, Wang Y, et al. Recombinant human sonic hedgehog protein regulates the expression of ZO-1 and occludin by activating angiotensin-1 in stroke damage. *PLoS ONE*. 2013; 8(7):e68891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068891> PMID: 23894369
7. Chapouly C, Guimbal S, Hollier P-L, Renault M-A. Role of Hedgehog Signaling in Vasculature Development, Differentiation, and Maintenance. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(12).
8. Caradu C, Couffinhal T, Chapouly C, Guimbal S, Hollier P-L, Ducasse E, et al. Restoring Endothelial Function by Targeting Desert Hedgehog Downstream of Klf2 Improves Critical Limb Ischemia in Adults. *Circ Res*. 2018; 123(9):1053–1065. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313177> PMID: 30355159
9. Bitgood MJ, McMahon AP. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol*. 1995; 172(1):126–138. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.0010> PMID: 7589793
10. Robbins DJ, Fei DL, Riobo NA. The Hedgehog signal transduction network. *Sci Signal*. 2012; 5(246):re6. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002906> PMID: 23074268
11. Iadecola C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*. 2017; 96(1):17–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.030> PMID: 28957666
12. Sweeney MD, Ayyadurai S, Zlokovic BV. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci*. 2016; 19(6):771–83. <https://doi.org/10.1038/nn.4288> PMID: 27227366
13. Cheslow L, Alvarez JI. Glial-endothelial crosstalk regulates blood-brain barrier function. *Curr Opin Pharmacol*. 2016; 26:39–46. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.09.010> PMID: 26480201
14. Engelhardt B, Coisne C. Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids Barriers CNS*. 2011; 8(1):4. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-8-4> PMID: 21349152
15. Engelhardt B, Ransohoff RM. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol*. 2012; 33(12):579–589. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.07.004> PMID: 22926201
16. Colombo E, Farina C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol*. 2016; 37(9):608–620. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.06.006> PMID: 27443914
17. Chapouly C, Tadesse Argaw A, Horng S, Castro K, Zhang J, Asp L, et al. Astrocytic TYMP and VEGFA drive blood-brain barrier opening in inflammatory central nervous system lesions. *Brain J Neurol*. 2015; 138(Pt 6):1548–1567. <https://doi.org/10.1093/brain/awv077> PMID: 25805644
18. Argaw AT, Asp L, Zhang J, Navrazhina K, Pham T, Mariani JN, et al. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J Clin Invest*. 2012; 122(7):2454–2468. <https://doi.org/10.1172/JCI60842> PMID: 22653056
19. Argaw AT, Gurfein BT, Zhang Y, Zameer A, John GR. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(6):1977–1982. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808698106> PMID: 19174516

20. Engelhardt B, Carare RO, Bechmann I, Flügel A, Laman JD, Weller RO. Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2016; 132 (3):317–338.
21. Di Russo J, Hannocks M-J, Luik A-L, Song J, Zhang X, Yousif L, et al. Vascular laminins in physiology and pathology. *Matrix Biol*. 2017; 57–58:140–148. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.06.008> PMID: 27378388
22. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7 (1):41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824> PMID: 16371949
23. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β . *Sci Transl Med*. 2012; 4 (147):147ra111–147ra111. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748> PMID: 22896675
24. Song J, Wu C, Korpos E, Zhang X, Agrawal SM, Wang Y, et al. Focal MMP-2 and MMP-9 Activity at the Blood-Brain Barrier Promotes Chemokine-Induced Leukocyte Migration. *Cell Rep*. 2015; 10 (7):1040–1054. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.037> PMID: 25704809
25. Cruz-Orengo L, Holman DW, Dorsey D, Zhou L, Zhang P, Wright M, et al. CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling abluminal CXCL12 abundance during autoimmunity. *J Exp Med*. 2011; 208 (2):327–339. <https://doi.org/10.1084/jem.20102010> PMID: 21300915
26. Horng S, Therattil A, Moyon S, Gordon A, Kim K, Argaw AT, et al. Astrocytic tight junctions control inflammatory CNS lesion pathogenesis. *J Clin Invest*. 2017; 127 (8):3136–3151. <https://doi.org/10.1172/JCI91301> PMID: 28737509
27. Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviaro F, Pirazzoli V, et al. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat Cell Biol*. 2008; 10 (8):923–934. <https://doi.org/10.1038/ncb1752> PMID: 18604199
28. Davalos D, Akassoglou K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Semin Immunopathol*. 2012; 34 (1):43–62. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0290-8> PMID: 22037947
29. Nitta T, Yagita H, Sato K, Okumura K. Expression of Fc gamma receptors on astroglial cell lines and their role in the central nervous system. *Neurosurgery*. 1992; 31(1):83–7; discussion 87–88. <https://doi.org/10.1227/00006123-199207000-00012> PMID: 1386416
30. Okun E, Mattson MP, Arumugam TV. Involvement of Fc Receptors in Disorders of the Central Nervous System. *Neuromolecular Med*. 2010; 12 (2):164–178. <https://doi.org/10.1007/s12017-009-8099-5> PMID: 19844812
31. Gurfein BT, Zhang Y, López CB, Argaw AT, Zameer A, Moran TM, et al. IL-11 regulates autoimmune demyelination. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009; 183 (7):4229–4240. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900622> PMID: 19734214
32. Wanner IB, Anderson MA, Song B, Levine J, Fernandez A, Gray-Thompson Z, et al. Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2013; 33 (31):12870–12886. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2121-13.2013> PMID: 23904622
33. Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci*. 2015; 16 (5):249–263. <https://doi.org/10.1038/nrn3898> PMID: 25891508
34. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ, et al. *BMC Cancer*. 2006; 6:186. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-186> PMID: 16836752
35. Acharya P, Beckel J, Ruiz WG, Wang E, Rojas R, Birder L, et al. Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; 287 (2):F305–F318. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00341.2003> PMID: 15068973
36. Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, et al. Proinflammatory Cytokines Disrupt Epithelial Barrier Function by Apoptosis-Independent Mechanisms. *J Immunol*. 2003; 171 (11):6164–6172. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.6164> PMID: 14634132
37. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*. 2007; 13 (10):1173–1175. <https://doi.org/10.1038/nm1651> PMID: 17828272
38. Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker H. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology*. 2000; 118 (6):1001–1011. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(00\)70351-9](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(00)70351-9) PMID: 10833473
39. Fujita H, Chalubinski M, Rhyner C, Indermitte P, Meyer N, Ferstl R, et al. Claudin-1 expression in airway smooth muscle exacerbates airway remodeling in asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2011; 127 (6):1612–1621.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.03.039> PMID: 21624620

40. Konstantin G, Guillem G, Annika A, Christer B. Endothelial-Mural Cell Signaling in Vascular Development and Angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29 (5):630–638. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.161521> PMID: 19164813
41. Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science.* 1997; 277 (5323):242–245. <https://doi.org/10.1126/science.277.5323.242> PMID: 9211853
42. Yunoki M, Kanda T, Suzuki K, Uneda A, Hirashita K, Yoshino K. Ischemic Tolerance of the Brain and Spinal Cord: A Review. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2017; 57 (11):590–600. <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2017-0062> PMID: 28954945
43. Kirino T, Tsujita Y, Tamura A. Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991; 11 (2):299–307. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1991.62> PMID: 1997501
44. Koizumi S, Hirayama Y, Morizawa YM. New roles of reactive astrocytes in the brain: an organizer of cerebral ischemia. *Neurochem Int.* 2018; 119:107–114. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.01.007> PMID: 29360494
45. Cai W, Zhang K, Li P, Zhu L, Xu J, Yang B, et al. Dysfunction of the neurovascular unit in ischemic stroke and neurodegenerative diseases: An aging effect. *Ageing Res Rev.* 2017; 34:77–87. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.09.006> PMID: 27697546
46. Hou J, Baker LA, Zhou L, Klein RS. Viral interactions with the blood-brain barrier: old dog, new tricks. *Tissue Barriers.* 2016; 4 (1):e1142492. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1142492> PMID: 27141421
47. Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* 2008; 57 (2):178–201. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003> PMID: 18215617
48. Chacko A-M, Li C, Pryma DA, Brem S, Coukos G, Muzykantov V. Targeted delivery of antibody-based therapeutic and imaging agents to CNS tumors: crossing the blood-brain barrier divide. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013; 10 (7):907–926. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.808184> PMID: 23751126
49. Liu J, Zhao ML, Brosnan CF, Lee SC. Expression of type II nitric oxide synthase in primary human astrocytes and microglia: role of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1996; 157 (8):3569–3576. PMID: 8871657
50. Karki S, Farb MG, Ngo DTM, Myers S, Puri V, Hamburg NM, et al. Forkhead box O-1 modulation improves endothelial insulin resistance in human obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35 (6):1498–1506. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.305139> PMID: 25908760
51. Hess DC, Howard E, Cheng C, Carroll J, Hill WD, Hsu CY. Hypertonic mannitol loading of NF-kappaB transcription factor decoys in human brain microvascular endothelial cells blocks upregulation of ICAM-1. *Stroke.* 2000; 31 (5):1179–1186. <https://doi.org/10.1161/01.str.31.5.1179> PMID: 10797183



OPEN ACCESS

EDITED BY
Alexander Deutsch,
Medical University of Graz, Austria

REVIEWED BY
Janos Groh,
Technical University of Munich, Germany
Jose Javier Miguel-Hidalgo,
University of Mississippi Medical Center,
United States

*CORRESPONDENCE

Pierre Mora
✉ pierre.mora@inserm.fr

RECEIVED 07 July 2023
ACCEPTED 09 October 2023
PUBLISHED 23 October 2023

CITATION

Mora P and Chapouly C (2023)
Astrogliosis in multiple sclerosis
and neuro-inflammation: what
role for the notch pathway?
Front. Immunol. 14:1254586.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1254586

COPYRIGHT

© 2023 Mora and Chapouly. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Astrogliosis in multiple sclerosis and neuro-inflammation: what role for the notch pathway?

Pierre Mora* and Candice Chapouly

Université de Bordeaux, Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), Biology of Cardiovascular Diseases, Pessac, France

Multiple sclerosis is an autoimmune inflammatory disease of the central nervous system leading to neurodegeneration. It affects 2.3 million people worldwide, generally younger than 50. There is no known cure for the disease, and current treatment options - mainly immunotherapies to limit disease progression - are few and associated with serious side effects. In multiple sclerosis, disruption of the blood-brain barrier is an early event in the pathogenesis of lesions, predisposing to edema, excitotoxicity and inflammatory infiltration into the central nervous system. Recently, the vision of the blood brain barrier structure and integrity has changed and include contributions from all components of the neurovascular unit, among which astrocytes. During neuro-inflammation, astrocytes become reactive. They undergo morphological and molecular changes named "astrogliosis" driving the conversion from acute inflammatory injury to a chronic neurodegenerative state. Astrogliosis mechanisms are minimally explored despite their significance in regulating the autoimmune response during multiple sclerosis. Therefore, in this review, we take stock of the state of knowledge regarding astrogliosis in neuro-inflammation and highlight the central role of NOTCH signaling in the process of astrocyte reactivity. Indeed, a very detailed nomenclature published in nature neurosciences in 2021, listing all the reactive astrocyte markers fully identified in the literature, doesn't cover the NOTCH signaling. Hence, we discuss evidence supporting NOTCH1 receptor as a central regulator of astrogliosis in the pathophysiology of neuro-inflammation, notably multiple sclerosis, in human and experimental models.

KEYWORDS

multiple sclerosis, astrogliosis, NOTCH signaling, neuro-inflammation, astrocytes

1 Introduction

Neurodegeneration, defined as neuronal cell loss, is the major cause underlying behavioral and psychological abnormalities, notably in multiple sclerosis (MS). It represents a major public health issue as life expectancy increases. One common feature of neurodegeneration is vascular impairment: the Central Nervous System (CNS)

vasculature, through its regulatory mechanisms including solute transporters, receptor-mediated transcytosis and low levels of immune receptors, represents a physical blood brain barrier (BBB) which separates blood components from the brain parenchyma (1). However, during neuropathology, the BBB becomes permeable leading to parenchymal inflammatory infiltration (2). Increased BBB leakage is a common feature of several neurological conditions such as dementia, ischemic brain injury or neuro-inflammatory disorders like MS with a strong detrimental effect.

Importantly, a wealth of literature has recently enabled a change in the vision of the BBB structure and integrity which has expanded to include contributions from all components of the neurovascular unit (NVU), among which endothelial cells, pericytes, microglia and astrocyte endfeet (glia limitans) (3). Strikingly, our group recently published a paper highlighting the capacity for bidirectional signaling between endothelial cells and astrocytes from the NVU (4); however, how these signals participate to cerebrovascular impairment, notably BBB dysfunction and neuro-inflammation remains unclear and is of considerable translational interest to the field of neuro-immunology. Specifically, while it is now established that BBB breakdown leads to inflammatory infiltration into the perivascular space during neuropathology, the role of astrocytes from the glia limitans appears trickier. Indeed, astrocytes, described as reactive, are emerging as “Dr Jekyll and Mister Hyde” cells, having complex roles in both recruiting and restricting neuro-inflammatory infiltration. Reactive astrocyte behavior is determined in a context-specific manner by signaling events that vary with the nature and severity of CNS insults. Indeed, during infections (HIV, Herpes virus), and in Alzheimer’s disease, Parkinson’s disease and MS, reactive astrocytes have been shown, on one hand, to produce pro-inflammatory and pro-permeability factors and, on the other hand, to produce neuroprotective factors (5, 6).

A better understanding of the molecular pathways responsible for the production of these beneficial or deleterious factors could enable the development of new therapies targeting astrocytes in MS in which current treatments are mostly directed against the immune system and responsible for many side effects.

Among the pathways involved in controlling astrocyte reactivity, notch receptor 1 (NOTCH1) has been identified as a central effector of astrogliosis in a wide range of neuropathological contexts. The NOTCH signaling, which is highly conserved in vertebrates, is stimulated by the interaction of NOTCH receptor with its ligands, Delta (DLL) and Jagged (JAG), which are trans-membrane proteins with large extracellular domains. The precise number of notch receptors differ between species (7): in vertebrates, 4 different notch receptors have been identified and in the NVU, NOTCH1 is expressed by astrocytes, neurons and endothelial cells, notch receptor 4 (NOTCH4) by endothelial cells (8–10) and notch receptor 3 (NOTCH3) by mural cells, or pericytes (11, 12).

The NOTCH pathway is expressed in neural stem cells during development and is involved in neuron – glia cell fate decision. Strikingly, NOTCH1 signal transduction is reactivated in reactive astrocyte populations after intra-cerebral hemorrhage (13), in stroke (14) and in several neuro-inflammatory conditions such as

amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (15), MS and experimental auto-immune encephalomyelitis (EAE) (16, 17).

The targeting of NOTCH in therapeutics was first studied in oncology. More recently, the pathological role of the NOTCH pathway in the control of inflammation has been demonstrated in numerous autoimmune diseases, and is currently being tested as a therapeutic target in allergic asthma and graft-versus-host disease. Numerous strategies have been tested and are still under development to inhibit this pathway. However, non-specific inhibition of the NOTCH pathway has failed due to an unfavorable safety profile. A better understanding of the ligand-receptor interactions and their effects during neuro-inflammation is therefore necessary to determine their therapeutic interest and identify more specific targets of the pathway.

This review will address the role of reactive astrocytes in controlling BBB homeostasis and inflammatory infiltration of the CNS, under pathological conditions, with a focus on MS. More specifically, we will address the involvement of the NOTCH signaling in the control of astrogliosis, to provide a comprehensive review of what is known about this pathway and the prospects for further work that it offers.

2 Subsections relevant for the subject

2.1 Multiple sclerosis

MS is an inflammatory autoimmune disease of the CNS, causing motor, sensory, cognitive, visual and sphincter disturbances. It is a progressive neurological disease affecting young adults, with varied and sometimes inconspicuous or non-specific signs and symptoms.

2.1.1 The first anatomic-pathological observations in humans

The earliest evocative description of MS date back to the 14th century, with Lidwine de Schiedam, holly patroness of ice skating, who suffered from a slowly progressing disease with periods of recovery, and whose symptomatology consisted of gait disturbance, paralysis of the right upper limb, unilateral loss of sight, stabbing facial pain and trouble swallowing (18).

In the first half of the 19th century, anatomic-pathological atlases by Jean Cruveilhier (19) and Sir Robert Carswell (20) focused on the spinal cord, with illustrations of spinal sclerotic lesions (Figure 1 Illustration of spinal sclerotic lesions by Sir Robert Carswell).

However, it was not until 1868 that Jean-Marie Charcot’s anatomical-clinical approach made the connection between these post-mortem histological observations of medullary sclerotic lesions and the clinical signs that had been described for centuries. He described the pathogenesis of the disease, demyelination and glial proliferation, and thus proposed the diagnostic criteria for the pathology he calls MS. These signs - dysarthria, nystagmus and intention tremor - became known as the Charcot’s triad (21).



FIGURE 1
Illustration of spinal sclerotic lesions by Sir Robert Carswell.

2.1.2 Multiple sclerosis epidemiology

Several epidemiological studies have highlighted an increase in MS incidence in the order of 15% since 2013, bringing the average incidence worldwide in 2020 to 43.95 per 100,000 people (95% confidence interval [43.90; 44.01]), with a strong loco-regional disparity, with European and American countries being more affected than Asian or African countries (22).

MS is affecting young adults and is twice as common in women as in men (23).

One of the major limitations of epidemiological studies is that they are based solely on self-reporting of incidence and prevalence. The variable reliability of databases around the world, therefore, partly explains the differences observed.

Beyond the declarative performance of different national health systems, these geographical epidemiological differences reflect the existence of genetic predisposing factors and environmental risk factors (Figure 2).

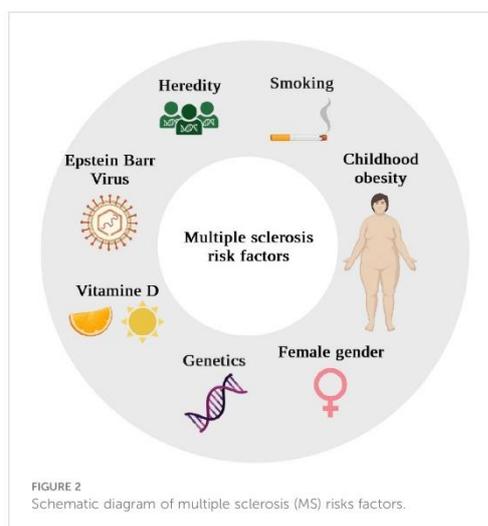


FIGURE 2
Schematic diagram of multiple sclerosis (MS) risks factors.

2.1.3 The numerous forms of multiple sclerosis

The positive diagnosis of MS is based on clinical and para-clinical arguments. In order to standardize this diagnosis, the McDonald criteria were developed by the International Panel on Diagnosis of Multiple Sclerosis, comprising European and American neurologists. These criteria are based on the spatial and temporal dissemination of lesions (24).

Despite these common diagnostic criteria, the different clinical presentations of MS are extremely heterogeneous.

As early as 1996, an American-European consensus, The International Advisory Committee on Clinical Trials in Multiple Sclerosis, classified the different clinical course of MS into four categories:

- Relapsing-remitting MS (RR-MS)
- Secondarily progressive MS (SP-MS)
- Primary-progressive (PP-MS)
- Progressive-relapsing (PR-MS)

RR-MS is characterized by alternating attacks and periods of complete recovery or incomplete recovery with minor residual deficit and by a lack of disease progression between relapses. Attacks develop gradually, over several days. It is the most frequently diagnosed form, accounting for 85% of cases. RR-MS patients may go on to develop SP-MS, corresponding to a continuous progression of symptoms. PP-MS corresponds to a continuous and progressive deterioration of neurological functions, with no clear recovery periods, but with potential plateau phases or minor improvement. It affects 10-15% of patients at diagnosis, and is more common in men. The average age at diagnosis is also higher (40 versus 30 for RR forms). PR-MS, which is less common, corresponds to a primary progressive form with episodes of acute relapses, with or without periods of recovery (25).

127. Stephenson NL, Avis JM. Direct observation of proteolytic cleavage at the S2 site upon forced unfolding of the Notch negative regulatory region. *Proc Natl Acad Sci USA* (2012) 109(41):E2757–2765. doi: 10.1073/pnas.1205788109
128. Li YM, Lai MT, Xu M, Huang Q, DiMuzio-Mower J, Sardana MK, et al. Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) 97(11):6138–43. doi: 10.1073/pnas.110126897
129. Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ. Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) 100(11):6382–7. doi: 10.1073/pnas.1037392100
130. Conner SD. Chapter four - regulation of notch signaling through intracellular transport. In: Jeon KW, editor. *International Review of Cell and Molecular Biology*. Cambridge: Academic Press (2016). p. 107–27. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1937644815001185>.
131. Steinbuck MP, Arakcheeva K, Winandy S. Novel TCR-mediated mechanisms of notch activation and signaling. *J Immunol* (2018) 200(3):997–1007. doi: 10.4049/jimmunol.1700070
132. Song LL, Peng Y, Yun J, Rizzo P, Chaturvedi V, Weijnen S, et al. Notch-1 associates with IKK α and regulates IKK activity in cervical cancer cells. *Oncogene* (2008) 27(44):5833–44. doi: 10.1038/onc.2008.190
133. Zhang Y, He K, Wang F, Li X, Liu D. Notch-1 signaling regulates astrocytic proliferation and activation after hypoxia exposure. *Neurosci Lett* (2015) 603:12–8. doi: 10.1016/j.neulet.2015.07.009
134. Li L, Lin G, Gu H, Yu L, Ni C. Effects of Srxn1 on growth and Notch signalling of astrocyte induced by hydrogen peroxide. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* (2019) 47(1):1917–23. doi: 10.1080/21691401.2019.1614016
135. Acaz-Fonseca E, Ortiz-Rodriguez A, Azcoitia I, Garcia-Segura LM, Arevalo MA. Notch signaling in astrocytes mediates their morphological response to an inflammatory challenge. *Cell Death Discovery* (2019) 5(1):1–14. doi: 10.1038/s41420-019-0166-6
136. Wang SY, Ren M, Jiang HZ, Wang J, Jiang HQ, Yin X, et al. Notch pathway is activated in cell culture and mouse models of mutant SOD1-related familial amyotrophic lateral sclerosis, with suppression of its activation as an additional mechanism of neuroprotection for lithium and valproate. *Neuroscience* (2015) 301:276–88. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.06.002
137. Ma X, Drannik A, Jiang F, Peterson R, Turnbull J. Crosstalk between Notch and Sonic hedgehog signaling in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *NeuroReport* (2017) 28(3):141. doi: 10.1097/WNR.0000000000000725
138. Liu C, Li D, Lv C, Gao Z, Qi Y, Wu H, et al. Activation of the notch signaling pathway and cellular localization of notch signaling molecules in the spinal cord of SOD1-G93A ALS model mice. *Neuroscience* (2020) 432:84–93. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.02.034
139. Gómez-Pinedo U, Galán I, Matias-Guiu JA, Pytel V, Moreno T, Guerrero-Sola A, et al. Notch signalling in the hippocampus of patients with motor neuron disease. *Front Neurosci* (2019) 13. doi: 10.3389/fnins.2019.00302
140. Cheng YL, Park JS, Manzanero S, Choi Y, Baik SH, Okun E, et al. Evidence that collaboration between HIF-1 α and Notch-1 promotes neuronal cell death in ischemic stroke. *Neurobiol Dis* (2014) 62:286–95. doi: 10.1016/j.nbd.2013.10.009
141. Magnusson JP, Göröcz C, Tatarishvili J, Dias DO, Smith EMK, Lindvall O, et al. A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse. *Science* (2014) 346(6206):237–41. doi: 10.1126/science.1254586
142. Qian D, Li L, Rong Y, Liu W, Wang Q, Zhou Z, et al. Blocking Notch signal pathway suppresses the activation of neurotoxic A1 astrocytes after spinal cord injury. *Cell Cycle* (2019) 18(21):3010–29. doi: 10.1080/15384101.2019.1667189
143. Ohuchi K, Funato M, Yoshino Y, Ando S, Inagaki S, Sato A, et al. Notch signaling mediates astrocyte abnormality in spinal muscular atrophy model systems. *Sci Rep* (2019) 9(1):3701. doi: 10.1038/s41598-019-39788-w
144. Arumugam TV, Chan SL, Jo DG, Yilmaz G, Tang SC, Cheng A, et al. Gamma secretase-mediated Notch signaling worsens brain damage and functional outcome in ischemic stroke. *Nat Med* (2006) 12(6):621–3. doi: 10.1038/nm1403
145. Smith E, Claudinot S, Lehal R, Pellegrin L, Barrandon Y, Radtke F. Generation and characterization of a Notch1 signaling-specific reporter mouse line. *Genesis* (2012) 50(9):700–10. doi: 10.1002/dvg.22030
146. Ohuchi K, Funato M, Kato Z, Seki J, Kawase C, Tamai Y, et al. Established stem cell model of spinal muscular atrophy is applicable in the evaluation of the efficacy of thyrotropin-releasing hormone analog. *Stem Cells Trans Med* (2016) 5(2):152–63. doi: 10.5966/sctm.2015-0059
147. Iadecola C. The neurovascular unit coming of age: A journey through neurovascular coupling in health and disease. *Neuron* (2017) 96(1):17–42. doi: 10.1016/j.neuron.2017.07.030
148. Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci* (2021) 24(3):312–25. doi: 10.1038/s41593-020-00783-4
149. Ribeiro TN, Delgado-García LM, Porcionatto MA. Notch1 and galectin-3 modulate cortical reactive astrocyte response after brain injury. *Front Cell Dev Biol* (2021) 9:649854. doi: 10.3389/fcell.2021.649854
150. Tanigaki K, Honjo T. Regulation of lymphocyte development by Notch signaling. *Nat Immunol* (2007) 8(5):451–6. doi: 10.1038/ni1453
151. Anastasi E, Campese AF, Bellavia D, Bulotta A, Balestri A, Pascucci M, et al. Expression of activated Notch3 in transgenic mice enhances generation of T regulatory cells and protects against experimental autoimmune diabetes. *J Immunol* (2003) 171(9):4504–11. doi: 10.4049/jimmunol.171.9.4504
152. Eixarch H, Mansilla MJ, Costa C, Kunkel SL, Montalban X, Godessart N, et al. Inhibition of delta-like ligand 4 decreases Th1/Th17 response in a mouse model of multiple sclerosis. *Neurosci Lett* (2013) 541:161–6. doi: 10.1016/j.neulet.2013.02.038
153. Yin X, Liu B, Wei H, Wu S, Guo L, Xu F, et al. Activation of the Notch signaling pathway disturbs the CD4+/CD8+, Th17/Treg balance in rats with experimental autoimmune uveitis. *Inflammation Res* (2019) 68(9):761–74. doi: 10.1007/s00011-019-01260-w

In 2013, an update of these recommendations introduced a new syndrome, the clinically isolated syndrome, and the authors proposed two concepts for characterizing the disease: disease activity and disease progression (26). The clinically isolated syndrome (CIS) corresponds to the first clinical presentation of an episode possessing the characteristic signs of a demyelinating disease, without fulfilling all of Mac Donald's criteria for diagnosis, notably the notion of temporal dissemination (27).

Activity can be assessed clinically (clinical signs of relapse) or by imaging. Progression is determined on the basis of clinical evidence of worsening disability.

The new phenotypes proposed are as follows (Table 1 Evolution of clinical courses description of relapsing multiple sclerosis and Table 2 Evolution of clinical courses description of progressive multiple sclerosis):

- Relapsing disease:
 - Active CIS
 - Not active CIS
 - Active RR-MS
 - Not active RR-MS
- Progressive disease: PP-MS or SP-MS
 - Active progressive disease with progression

TABLE 1 Evolution of clinical courses description of relapsing multiple sclerosis.

Relapsing multiple sclerosis			
MS clinical courses as described in 1996 guidelines		MS clinical courses as described in 2013 guidelines	
RR-MS	Full recovery between relapses	CIS	Not active
	Incomplete recovery between relapses		Active
		RR-MS	Not active
			Active

TABLE 2 Evolution of clinical courses description of progressive multiple sclerosis.

Progressive multiple sclerosis			
MS clinical courses as described in 1996 guidelines		MS clinical courses as described in 2013 guidelines	
Progressive disease	PP-MS	Progressive disease (both PP-MS and SP-MS)	Active with progression
	SP-MS		Active without progression
	PR-MS		Not active with progression
			Not active without progression

- Active progressive disease without progression
- Progressive not active disease with progression
- Not active and without progression disease (stable disease)

Alongside progression, the notion of disease worsening was defined in 2020. Unlike progression, which corresponds to an accumulation of disability, independently of any relapses, during the progression phase, disease aggravation corresponds to an increase in disability, whether resulting from a residual relapse deficit or from progressive disability during the disease progression phase (28).

Disruption of the BBB, and more broadly of the NVU, comprising astrocytic endfeet or "glia limitans", is an early and fundamental element in the pathogenesis of MS and plays an important part in the diagnosis of MS notably through medical imaging.

2.1.4 Inflammatory infiltration at the neurovascular unit, a key stage in multiple sclerosis pathogenesis

2.1.4.1 Definition of the neurovascular unit

The CNS has high energy consumption but a very low storage capacity. This massive energy consumption requires constant exchange between the blood and the brain. Thus, despite representing only 2% of the human body's mass, the CNS receives over 20% of blood flow to satisfy its oxygen and nutrient requirements (29, 30). However, the CNS is a fragile tissue, with a low capacity for renewal, and therefore requires protection from microorganisms.

Under physiological conditions, the CNS is protected from endogenous and exogenous elements present in the systemic circulation by a physical barrier which, in vertebrates, is called the BBB. The BBB, a major evolutionary advantage, is uniquely structured to meet the specific metabolic needs of the parenchyma. The highly complex structure of the BBB is the subject of numerous studies; however there are still many grey areas on its structure and functions.

Originally, this barrier was described as predominantly endothelial in nature, in association with mural cells (pericytes or smooth muscle cells) and the basal matrix. However, this simplistic view of the BBB has long been outdated. The increasing complexity of the BBB, with the discovery of new cell types such as microglia and astrocytes within its structure, has led to the emergence of a new consensual concept named the NVU. The NVU is a cellular network that modulates blood flow in response to glial and neuronal energy demand, and regulates the passage of molecules and cells into the brain parenchyma. Its organization and architecture are scrupulously controlled in order to fulfill these missions.

2.1.4.2 Mechanisms of neurovascular unit inflammatory infiltration in multiple sclerosis

The most widespread hypothesis to date, to explain onset of MS pathology, is the infiltration of auto-reactive lymphocytes into the CNS through the NVU. These auto-reactive cells are the

consequence of a loss of tolerance to certain CNS self-proteins, notably myelin, following cross-reactivity after infection (31).

It is now commonly accepted that the NVU is composed of 2 barriers that leukocytes must cross sequentially: a first barrier, the BBB, composed of endothelial cells, and a second barrier, the glia limitans, composed of astrocyte endfeet. These two barriers delimit a zone known as the perivascular space (32, 33).

The passage of leukocytes across the BBB involves several stages: capture, rolling, activation, adhesion, crawling, and diapedesis. Diapedesis corresponds to the migration of leukocytes through the endothelium (34).

During the onset of MS disease, neuro-inflammation occurs and endothelial cells from the BBB become activated, participating in the migration of plasmatic proteins and leukocytes from the systemic circulation to the parenchyma. Activated endothelial cells undergo changes including increased expression of adhesion molecules, pro-inflammatory cytokines and chemokines, combined with reduced expression or disorganization of junctional molecules. Increased expression of the selectin family proteins, selectin P (SELP) and selectin E (SELE), on endothelial cells leads to increased leukocyte rolling via binding of selectin P ligand (SELPLG) located on T lymphocytes (35). However, this rolling mechanism is not absolutely necessary as, interestingly, selectins appear to be dispensable in the induction of EAE (36, 37).

T lymphocytes, to stop completely, then require G protein-coupled receptor-dependent signaling, notably atypical chemokine receptor 1 (ACKR1). This arrest step is controlled by integrins, integrin subunit alpha L (ITGAL) and integrin subunit alpha 4 (ITGA4), and their endothelial ligands, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1) respectively (38, 39).

T lymphocytes then crawl out in search of a suitable site for diapedesis. Until the early 2000s, the commonly accepted hypothesis was that mononuclear cells cross the endothelial barrier via a paracellular passage phenomenon known as “paracellular diapedesis”, following a reorganization of tight junctions sometimes referred to as the “zipper model” (40, 41). Since then, numerous studies have demonstrated the existence of a transcellular passage known as “transcellular diapedesis”, which spares the tight junctions (42). Transcellular passage has been much less studied than paracellular passage, but it would appear that under neuro-inflammatory conditions, the endothelial passage of circulating blood cells is predominantly transcellular. This hypothesis is supported by the fact that overexpression of adhesion molecules, notably ICAM1, found in neuro-inflammatory conditions, favors transcellular passage. Furthermore, the decrease in junctional integrity in endothelial cells does not correlate with an increase in paracellular diapedesis but rather with an increase in transcellular diapedesis (43, 44).

In the perivascular space, CD4+ cells encounter their antigens via antigen-presenting cells and perivascular macrophages. This step acts as a final checkpoint before the passage of the second barrier, the glia limitans, with CD4+ T cells remaining sequestered in the perivascular space in its absence (45).

Lymphocyte passage through the glia limitans requires active recruitment and enzymatic cleavage of glial barrier components. In the perivascular space, macrophages produce the metalloproteinases matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and matrix

metalloproteinase 9 (MMP9), which destabilize the glia limitans and allow leukocytes to pass into the parenchyma. Substrates for MMP2 and MMP9 include dystroglycan, which anchors astrocyte endfeet to the parenchymal basement membrane via a high-affinity interaction with laminin 1 and 2, perlecan and agrin (46, 47).

In this review, we will focus on astrocytes, key components of the NVU; precisely we will explore how astrocytes control BBB homeostasis and inflammatory infiltration under pathological condition such as MS and EAE.

2.2 Astrocytes as part of the neurovascular unit, central players of neuro-inflammation pathophysiology

Astrocytes represent one of the most abundant cell types in the CNS, accounting for between 20% and 50% of the total number of CNS cells depending on the species, and help maintain parenchymal homeostasis during development, in physiological conditions and during aging. Originally, astrocytes were considered solely as a structural support cell population for neurons, but since the early 2000s, numerous studies have demonstrated a much more diverse range of roles for astrocytes physiologically and under pathological conditions (48).

The morphological heterogeneity of astrocytes has long been described. Historically, a distinction was made between fibrous astrocytes in the white matter and protoplasmic astrocytes in the gray matter (49–51). Recent technological advances have made it possible to identify different astrocyte subtypes within these two populations. Protoplasmic astrocytes, located in the gray matter, are characterized by short, numerous extensions that enable them to come into contact with other astrocytes as well as other cell types such as microglia or neurons. In white matter, astrocytes are fibrous or fibrillary, with a smaller cell body. Their extensions are longer and fewer.

This morphological difference based on the anatomical location of astrocytes is not only due to differences based on the origin of these cells, but also to environmental stimuli. Indeed, when exogenous astrocytes are grafted, they acquire a protoplasmic or fibrous morphology depending on the area in which they are grafted.

2.2.1 Astrogliosis, a response mechanism to injury

Astrocytes are quiescent cells which undergo profound morphological and functional changes in response to stress. The nature of this stress is variable: ischemic, cytokinic, traumatic or infectious, for example.

Numerous names exist to describe these phenomena, the most common and those used in the remainder of this manuscript being “astrogliosis” to describe all the changes observed, and “reactive astrocytes” to describe astrocytes that have undergone these changes.

2.2.2 Reactive astrocyte behavior under neuro-inflammatory conditions

2.2.2.1 Blood brain barrier homeostasis

In MS, several studies demonstrate both beneficial and deleterious effects of astrogliosis on BBB homeostasis via the secretion of factors by reactive astrocytes. In MS patients and

more widely in various models of neuro-inflammation, reactive astrocytes have been identified as secreting factors that are either beneficial or deleterious to BBB integrity, notably by regulating the expression of endothelial junction proteins and endothelial activation markers (Figure 3 Simplified drawing of reactive astrocyte soluble signals to endothelial and inflammatory infiltrated cells).

2.2.2.1.1 Vascular endothelial growth factor A

The first reports of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) expression by glial cells date back to the early 90s in human gliomas (52) in the process of retinal angiogenesis in rats or cats (53) or *in vitro* in rat astrocyte cultures subjected to hypoxic conditions (54). In 1999, MJ Merrill's laboratory demonstrated that chronic exposure of healthy rat brains to VEGFA, delivered by a pump or a viral vector, causes an increase in vascular permeability, measured by X-ray after intravenous administration (55). Still in rats, the authors observe VEGFA expression at day 6 post EAE induction and an increase in its production over time. VEGFA expression in the animals' CNS correlates with parenchymal infiltration of cluster of differentiation 45 (CD45) + cells (56). In 2002, the same laboratory demonstrated astrocytic overexpression in cortical lesion areas of MS patients. GR John and AT Argaw's team then demonstrated that astrocytic VEGFA expression is partly regulated by IL-1 β . IL-1 β induces HIF1 α production via nuclear factor-kappa B (NFkB). HIF1 α then enables the formation of a heterodimeric HIF1 α /HIF1 β complex which translocates to the nucleus and activates transcription of target genes including VEGFA (57). *In vitro*, adding VEGFA to human brain microvascular endothelial cells (hBMVEC) reduces the expression of the junction proteins claudin5 (CLDN5) and occludin (OCLN). *In vivo*, intra-cortical stereotactic administration of VEGFA to wild-type mice induces increased permeability and decreased expression of CLDN5 and OCLN (58). By creating a mouse model of astrocytic

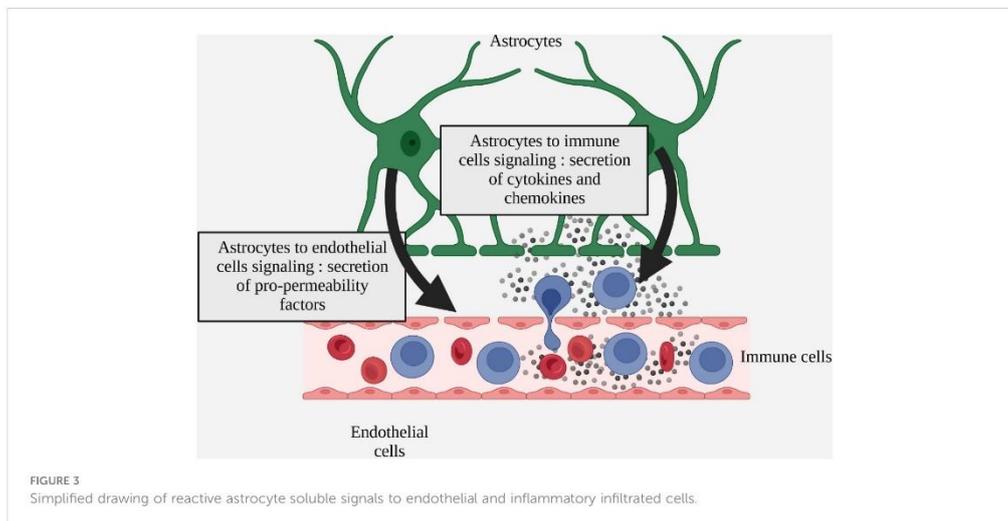
Vegfa knockdown under *glial fibrillary acidic protein (Gfap)* promoter (*Vegfa*^{ACKO} mice), the authors then showed that the clinical signs of EAE in these mice are extremely reduced, making the IL-1 β /VEGFA/CLDN5 axis an interesting therapeutic target. Furthermore, downstream of VEGFA, the authors showed that the reduction in endothelial CLDN5 expression by astrocytic VEGFA is mediated by the activation of the endothelial vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), which activates the endothelial nitrite oxide synthase (eNOS) via the phospholipase C gamma (PLC γ). The use of an eNOS inhibitor, named Cavtratin, in EAE mice also results in a reduction in clinical signs of the condition, similar to the reduction observed in *Vegfa*^{ACKO} mice (59).

Despite work in GR John's laboratory on the importance of VEGFA in BBB opening under neuro-inflammatory conditions, VEGFA blockade does not completely abrogate the clinical signs of EAE, suggesting that other pathways are involved in BBB opening.

2.2.2.1.2 Thymidine phosphorylase

By screening human astrocytes in culture stimulated by the pro-inflammatory cytokine IL-1 β , Chapouly et al. identified the thymidine phosphorylase (TYMP) as a pro-permeability factor (6). The involvement of TYMP in tumor angiogenesis has previously been demonstrated in certain cancers of the digestive sphere (60–63), in breast cancer (64) and in lung cancer (65). The endothelial effect of TYMP is due not only to the mature protein itself, but also to one of its degradation products, 2-deoxy-D-ribose (DDR). TYMP catalyzes thymidine into thymine and 2-deoxy-D-ribose-1-phosphate, which is subsequently dephosphorylated to give DDR (66).

Chapouly et al. demonstrated that DDR has the same effects as VEGFA in reducing the expression of the junction proteins CLDN5 and OCLN both *in vitro* and *in vivo*. The authors also demonstrated that the effects of VEGFA and DDR are synergistic. However, despite these similar effects, sequencing of endothelial cells



incubated with VEGFA and DDR showed that the genes modulated by these two factors are different, and of the 80 genes modulated by VEGFA and 41 modulated by DDR, only 9 are common (6).

2.2.2.1.3 Sonic hedgehog and desert hedgehog

In mammals, there are 3 ligands of the hedgehog pathway: sonic hedgehog (SHH), indian hedgehog (IHH) and desert hedgehog (DHH). They are synthesized as precursors which undergo post-translational modifications: cleavage, C-terminal cholesterol modification and N-terminal palmitoylation. Hedgehog proteins initiate their signaling by binding to the patched receptor 1 (PTCH1), resulting in the removal of smoothened (SMO) inhibition. SMO then cleaves the *glioma-associated oncogene transcription factors (GLI)* which act as transcriptional effectors of the pathway (67). The critical role of the hedgehog signaling in neuro-inflammation was first highlighted in 2011 by A. Prat's team; this study revealed that under MS or EAE conditions, the morphogen SHH is expressed by reactive astrocytes and participates in the maintenance of BBB homeostasis (68). However, following this discovery, our group found that, while SHH is expressed by activated astrocytes, DHH is physiologically expressed by endothelial cells in adults, particularly at the BBB (69). We demonstrated that endothelial DHH is down-regulated during EAE and that endothelial knockdown of *Dhh* is sufficient to induce BBB permeability by inhibiting tight junction expression. In parallel, our team has published a study demonstrating that ectopic expression of SHH by activated astrocytes under EAE condition induces BBB disruption by acting as a competitive antagonist of DHH at the endothelial level. Indeed, in a context of chronic neuro-inflammation, the two ligands compete at the level of their binding to the PTCH1 receptor on endothelial cells: thus, massive secretion of SHH by astrocytes contributes to the displacement of DHH from its receptor at the BBB, with consequent rupture of the NVU. This study has resolved some inconsistencies in the literature concerning the role of the hedgehog signaling in the NVU biology. Indeed, for a long time, the absence of specific inhibitors of each hedgehog ligand or of ligand-specific knockdown mice in a given cell type contributed to erroneous conclusions. The use of antibodies that do not discriminate between the three hedgehog ligands, as well as the use of SMO inhibitors and *Smo* knockdown mouse models, are the major causes of these wrong conclusions (69).

2.2.2.2 Glial scar formation

After injury, necrotic nerve tissue is separated from healthy tissue by a glial scar composed mainly of proliferative astrocytes (70). Since the first observations of the glial scar in the early 20th century (71), quantitative and qualitative knowledge of its composition but also of its interactions with other cell types in the NVU has evolved considerably.

In 2013, MV Sofroniew's laboratory highlighted the phenotypic heterogeneity of the astrocytes composing this scar in an acute model of spinal cord injury. In immediate contact with the lesion, proliferation is high and astrocytes will orient themselves parallel to the lesion via signal transducer and activator of transcription 3

(STAT3)-dependent signaling (72). This scarring protects viable neurons by segregating inflammatory cells in the lesion zone.

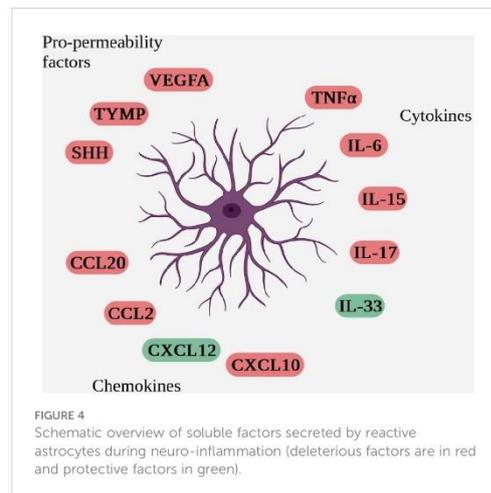
In models of chronic neuro-inflammation, inflammatory cell clusters have long been observed (73). In 2009, the same team demonstrated, in a mouse model of EAE, an organization of astrocytes similar to that found following spinal cord trauma. Indeed, reactive astrocytes in areas of EAE-induced inflammatory injury also form a scar that prevents the infiltration of inflammatory cells to the entire parenchyma (74).

In a more recent study, GR John's team demonstrated the expression by reactive astrocytes of tight junction proteins usually found in tight epithelia such as the digestive or renal epithelia. The main tight junction proteins identified are claudin1 (CLDN1) and claudin4 (CLDN4). In an *in vitro* model of astrogliosis, a knockdown of these junction proteins leads to disorganization of reactive astrocyte networks and a defect in CD4+ T cell segregation in co-culture. *In vivo*, induction of EAE in an astrocytic *Cldn4*-deficient mouse model is associated with a milder pathology and less inflammatory infiltration of the parenchyma (75).

Subsequent work in EAE also showed that junctional adhesion molecule-A (JAM-A), in addition to its function as a tight junction, also plays a role in astrocyte-T cell communication and promotes the passage of the latter from the perivascular space into the parenchyma (76).

2.2.2.3 Astrogliosis and inflammatory infiltration

Within the NVU, astrocytes are heavily involved in communication with immune cells. In addition to direct contact between astrocytes and immune cells during passage through the parenchyma, their anatomical location in contact with vessels enables juxtacrine and paracrine communication via the secretion of soluble factors with immune cells trapped in the perivascular space (Figure 4 Schematic overview of soluble factors secreted by



reactive astrocytes during neuro-inflammation (deleterious factors are in red and protective factors in green)).

2.2.2.3.1 Cytokines

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is overexpressed in acute and chronic active lesions in MS brains (77). However, this cytokine has been identified as having both beneficial and deleterious roles in EAE. This may be explained by the fact that TNF- α exists in two forms: a soluble form (solTNF) and a membrane-bound form (memTNF). Thus, in EAE-induced mice, using TNF- α inhibitors directed against the different forms, Brambilla et al. demonstrated that solTNF, by binding to tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1), is responsible for pro-apoptotic and pro-inflammatory actions and that memTNF, by binding to TNFR2, possesses anti-inflammatory and remyelinating actions (78). More recently, Plumb et al. demonstrated increased expression of ADAM metalloproteinase domain 17 (ADAM17), or TNF- α converting enzyme (TACE), in reactive astrocytes within active white matter lesions in MS patients. ADAM17 is an enzyme that cleaves soluble TNF- α , suggesting a neurotoxic role for astrocytic TNF- α (79). However, it should be noted that astrocytes express TNFR1 but also TNFR2 and that the anti-inflammatory and pro-myelinating role associated with astrocytic TNFR2 activation has been demonstrated in a CXCL2-dependent cuprizone model (80).

Interleukin-6 (IL-6) is notably overexpressed by activated astrocytes in the brains of MS patients at the level of acute and chronic active lesions (81, 82). Although several teams have focused on IL-6 under neuro-inflammatory condition, its exact role in the pathophysiology of MS is still unknown. Some studies suggest a beneficial role for astrocytic IL-6, notably because, in human brains, IL-6+ astrocytes are predominantly located close to healthy oligodendrocytes (82). Conversely, several studies in mice suggest a deleterious role for IL-6. In a mouse model with total *Il-6* knockdown, *Il-6*-deficient mice are completely resistant to EAE induction (83). In an inducible mouse model of *Il-6* knockdown specifically in astrocytes, the time to onset of clinical signs of EAE is delayed in females, who also show a reduction in areas of demyelination and a decrease in cellular infiltration in the parenchyma. However, these differences in clinical score between astrocytic *Il-6*-deficient females and control littermates remain minimal compared with the clinical effects obtained with the total *Il-6* knockdown. This may be explained by the fact that astrocytic knockdown is compensated for, by IL-6 production by other cell types notably B lymphocytes. In males, on the other hand, no difference is observed, either clinically or histologically (84).

Interleukin-15 (IL-15) is poorly expressed at a basal level by astrocytes. However, Saikali's team has demonstrated astrocytic overexpression of this cytokine in and around cortical lesions in MS patients. In their work, this team demonstrates that cluster of differentiation 8 (CD8) + T lymphocytes are located in areas where IL-15 is overexpressed, suggesting a role for astrocytic IL-15 in promoting the cytotoxic functions of CD8 T lymphocytes (85). Very few other groups have explored the role of astrocytic IL-15 in EAE or MS to our knowledge.

Interleukin-17 (IL-17) is produced in large quantities by T lymphocytes after induction of EAE. Astrocytes express the IL-17

receptor constitutively and overexpress it in neuro-inflammatory conditions (86). *In vitro*, treatment of astrocyte cultures with a cocktail of IL-17A and TNF α induces nuclear translocation of NF- κ B and production of interleukins (IL-6 and IL-8) and chemokines (CXCL1, CXCL2 and CCL20) (87). The IL-17 receptor is a heterodimeric complex composed of SEFIR (after SEFs and IL-17 receptor) family proteins: interleukin 17 receptor A (IL-17RA) and interleukin 17 receptor C (IL-17RC) (88). Act 1 adaptor protein (ACT1) is a cytoplasmic protein that also belongs to the SEFIR family of proteins. Following stimulation by IL-17A, ACT1 is recruited to the IL-17R receptor via a SEFIR domain-dependent interaction. ACT1, in turn, induces the recruitment of TNF-receptor associated factor (TRAF) family of kinases such as TRAF6, which activates the NF- κ B pathway (89). *In vivo*, using a mouse *Act1* knockdown under the control of the Nestin promoter to induce *Act1* inhibition specifically in neuronal precursors, Kang et al. demonstrated, in deficient mice, a delay in the onset of clinical signs after EAE induction and a decrease in physical disability at acme. A decreased infiltration of inflammatory cells in the spinal cord of *Act1*-deficient mice is also observed, associated with less demyelination (90).

Interleukin-33 (IL-33) is overexpressed in the CNS of MS patients both in cortical lesions (plaques) and in healthy regions of the brain and spinal cord, compared with healthy volunteers (91). In an animal model of EAE, Chen et al. demonstrated that IL-33 is released by activated astrocytes and dying neurons during the progression of the disease and prevents EAE exacerbation. After administration of a blocking antibody directed against IL-33 in the cerebral ventricles, the authors observed an increased in the clinical scores, an increased demyelination and more CD3+ cells infiltration in the CNS (92). In 2019, the same team repeated the experiment in a mouse model with total *Il-33* knockdown. The authors confirmed the data obtained with the antibody and showed an exacerbation of the disability and spinal cord demyelination, correlated with a decrease in regulatory T cell in spleen and lymph nodes and a decrease in TH2 cell populations in the CNS of EAE-induced *Il-33* knockdown mice (93). However, these data are open to criticism since the effect observed on the pathophysiology of EAE is linked to the total inhibition of IL-33 in mice via the use of a blocking antibody or by a total *Il-33* knockdown. Thus, the specific effect of astrocytic IL-33 cannot be identified with certainty in these models. Furthermore, clinical scores at plateau phase in control animals are abnormally low for EAE models.

2.2.2.3.2 Chemokines

C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2) is the most extensively studied chemokine in MS and EAE. In EAE, the CNS cells that predominantly produce CCL2 are astrocytes and endothelial cells (94). In astrocytes, its production is dependent on NF- κ B which, following stimulation with TNF α , is recruited to the CCL2 promoter and acts as a transcription factor (95). Using astrocytic *Ccl2* knockdown, Kim et al. showed that astrocytic CCL2 is deleterious in EAE and responsible for macrophage and T cell infiltration into the parenchyma (96). Paul et al. compared EAE-induced *Ccl2* knockdown mice at astrocytic (ACKO) and endothelial (ECKO) levels, and analyzed the pathophysiology of

the disease at D9 and D16 post-induction, further determining the action of this chemokine in disrupting junctional proteins and BBB permeability. At D9 post-induction, i.e. before the appearance of the first symptoms of the disease, CLDN5 expression is reduced in control and ECKO mice, but preserved in ACKO mice, underlining the early effect of astrocytic CCL2 on the destabilization of junctional proteins. Astrocytic CCL2 is also responsible for the passage of leukocytes into the parenchyma, a perivascular cell aggregate being found at D16 in ACKO mice in contrast to ECKO and control mice. Endothelial CCL2, on the other hand, appears to participate solely in the transendothelial passage of immune cells (97).

C-C motif chemokine ligand 20 (CCL20), originally called macrophage inflammatory protein (MIP)-3a, is the ligand for the CC-chemokine receptor (CCR) 6. This receptor is located on memory T lymphocytes (98), mature B lymphocytes (99) and dendritic cells (100). Astrocytes have been identified as the main source of CCL20 in EAE. Ambrosini's team demonstrated that this production is dependent on IL-1 β and TNF α *in vivo* (101). Meares et al. also highlighted the role of IL-6 and IL-17 in transcriptional activation of the gene encoding CCL20 via phosphorylation of STAT3 and NF- κ B (102). Finally, Ambrosini et al. demonstrated the chemoattractant role of astrocytic CCL20 on TH1 and TH2 lymphocytes *in vitro* using conditioned medium of IL-1 β /TNF α -stimulated astrocytes (101). To date, no transgenic mice for CCL20 have been developed, making it difficult to transpose these results *in vivo*. However, CCL20 receptor knockdown does exist; in this mouse model, Reboldi et al. described the resistance of the knockout mice to the development of paralysis after induction of EAE. Indeed, TH1 and TH17 lymphocytes reactive against myelin were found in these animals in the spleen but not in the CNS. This is explained by the fact that TH17 lymphocytes are trapped between endothelial cells and choroid plexus epithelial cells expressing CCL20, underlining the importance of CCL20 for the passage of TH17 lymphocytes through the choroid plexus (103).

CXC motif chemokine ligand 10 (CXCL10), also known as IP-10, is a cytokine of the CXC family whose pro-inflammatory effects on tissue infiltration were first demonstrated in hepatitis C. CXC motif chemokine ligand 9 (CXCL9), or monokine induced by gamma interferon (MIG), is a chemokine of the same family whose effects have been described in tumor models. These two proteins share a common receptor, CXCR3. Simpson et al, in a post-mortem analysis of MS patient brains, described astrocytic and macrophagic expression of CXCL10 and CXCL9 at the edge of active demyelinating lesions. CXCR3 is expressed by lymphocytes in the lesion. In parallel, the authors also showed that IFN γ , known to increase CXCL10 and CXCL9 expression, is expressed in perivascular infiltrates. However, CXCL10 and CXCL9 expression is not found in chronic non-active lesions. In view of these results, the authors propose the following activation sequence: IFN γ expression by perivascular lymphocytes induces CXCL10 and CXCL9 expression by astrocytes, which in turn triggers the recruitment of CXCR3 receptor-expressing lymphocytes to the lesion (104). In addition to their role in lymphocyte recruitment, the chemokines CXCL10 and CXCL9 are also thought to play a role in astrocyte-astrocyte and astrocyte-microglia communication.

Indeed, like Simpson's team, Tanuma et al. demonstrated astrocytic and microglial expression of CXCR3 in active MS lesions. The authors hypothesize that communication between a chemokine (CXCL9/10) and its receptor CXCR3 leads to the recruitment of astrocytes and microglia to the lesions (105). In a mouse model of astrocytic knockdown for *Cxcl10* (*Cxcl10*^{ACKO} mice), subjected to EAE, Mills Ko et al. confirmed the deleterious role of astrocytic CXCL10 on acute disease progression via an improvement in the clinical score and a reduction in the demyelination in *Cxcl10*^{ACKO} mice, with no effect on the chronic axonal loss. Regarding the lymphocyte infiltrate, no changes were observed in the parenchyma, but two major differences were highlighted by the authors: a decrease in the TH1/TH17 ratio and a decrease in the CD4+ T lymphocyte accumulation in the perivascular spaces (106).

CXC motif chemokine ligand 12 (CXCL12), also known as stromal cell-derived factor 1, is a known inhibitor of lymphocyte entry into the CNS. It is constitutively expressed by various CNS cells at low noise and overexpressed by astrocytes in MS patients. By injecting EAE-induced mice with a neutralizing anti-CXCL12 antibody, Meiron et al. demonstrated an anti-inflammatory effect of CXCL12. In addition to attracting T lymphocytes, CXCL12 also has an impact on their polarization. Treatment of mice with CXCL12 results in a switch from pro-inflammatory TH1 cells to IL-10-producing anti-inflammatory regulatory T cells (107). Furthermore, Patel et al. demonstrated that astrocytic CXCL12, by binding to its receptor CXCR4 in oligodendrocytes, promotes oligodendrocyte proliferation, migration and differentiation (80).

2.2.2.3.3 Chemokine and cytokine production and regulation

The production of a large number of molecules by astrocytes under neuro-inflammatory conditions is dependent on NF- κ B. Activation of the canonical or classical NF- κ B pathway results in the expression of genes encoding pro-inflammatory cytokines (such as TNF α , IL-1 β and IL-6), growth factors (such as granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)), chemokines (IL-8, CXCL1, CXCL2, CCL2, CCL3 and CCL5), matrix metalloproteinases (MMPs) such as MMP9, pro-proliferative proteins (such as cyclin D1 and cellular myelocytomatosis oncogene (MYC)), anti-apoptotic proteins (such as B-cell lymphoma-extra-large (BCL-XL), B-cell lymphoma2 (BCL2) and FLICE-inhibitory protein (FLIP)), pro-inflammatory enzymes (such as cyclooxygenase 2 (COX2)) and inducible nitric oxide synthase (iNOS)), angiogenic factors (such as VEGFA), adhesion molecules (such as VCAM1, ICAM1 and E-selectin) and inhibitors of NF- κ B signaling (such as nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (I κ B α) and tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 (A20)).

To better characterize the effects of astrocytic NF- κ B, Brambilla's team created a transgenic mouse model of NF- κ B inactivation in astrocytes by overexpressing, under the *Gfap* promoter, *dn-I κ B α* , a NF- κ B super repressor. By subjecting these mice to EAE, the authors demonstrated that inhibition of astrocytic NF- κ B leads to an improvement in the mice's clinical score, a reduction in leukocyte infiltration and a decrease in astrogliosis. These clinical and histological improvements correlate with a

reduction in the expression of pro-inflammatory molecules 17 days after EAE induction (cytokines (TNF α , IFN γ , IL-1 β), chemokines (CCL2, CCL5, CXCL9, CXCL10) and their receptors (CXCR2 and CCR2) (108).

2.2.3 What about the NOTCH signaling in astroglial mechanisms?

2.2.3.1 The NOTCH pathway

The *NOTCH* gene was first described in *Drosophila* in the 1910s, and has subsequently been found in most vertebrates, reflecting the age and conservation of this pathway (109).

While a haplo-insufficiency in *Drosophila* caused a notch-like anatomical defect in the wings, giving the pathway its name, the total knockout was lethal.

The two main players in the NOTCH pathway are the NOTCH receptors and their ligands, of the Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) family (Figure 5 Overview of the NOTCH ligands and NOTCH receptors in mammals).

Unlike many cellular pathways, the NOTCH pathway has no intermediary between its membrane receptor and the nuclear effector. Indeed, the intracellular part of the receptor is translocated to the nucleus after several enzymatic cleavages (110).

2.2.3.1.1 Receptors

The NOTCH pathway is highly conserved within metazoans, but the number of homologous genes varies between species, e.g. *Drosophila* has a single *NOTCH* gene, whereas mammals have 4 paralogous *NOTCH* genes, numbered 1 to 4 and located in humans on chromosomes 9, 1, 19 and 6 respectively (111–113).

Receptors are composed of an extracellular part, a transmembrane part and an intracellular part. The extracellular part contains a variable number of tandem repeats of the endothelial growth factor (EGF) like domain. The intracellular

part contains a sequence, called RBPJ association module (RAM), responsible for binding to the complex core binding factor 1 (CBF1)/ suppressor of hairless/longevity assurance gene (LAG1) also named CSL or RBPJ) (114), an ubiquitous transcription factor that causes the recruitment of other transcription factors (115).

With regard to cells derived from neural progenitors, most studies on the NOTCH pathway have been carried out during development or under pathological conditions, and only very few studies have focused on the NOTCH pathway under physiological conditions in adults. NOTCH1 is the most studied in the CNS, being expressed by pyramidal neurons and playing a role in memory processes and synaptic plasticity (116, 117). However, NOTCH receptors have also been identified in adults at the BBB, in endothelial cells for NOTCH1 (118) and NOTCH4 (8), and in mural cells (pericytes and smooth muscle cells) for NOTCH3 (11).

2.2.3.1.2 Ligands

As with receptors, the number of homologous genes varies for ligands. In *Drosophila*, two *NOTCH* ligands have been identified, *DELTA* and *SERRATE* (119), while to date, five ligands have been identified in humans: *delta like canonical notch ligand 1* (*DLL1*), *ligand 3* (*DLL3*), *ligand 4* (*DLL4*), *jagged canonical notch ligand 1* (*JAG1*) and *ligand 2* (*JAG2*). They have a transmembrane structure similar to that of the receptors NOTCH (110).

2.2.3.1.3 Ligand-receptor interaction

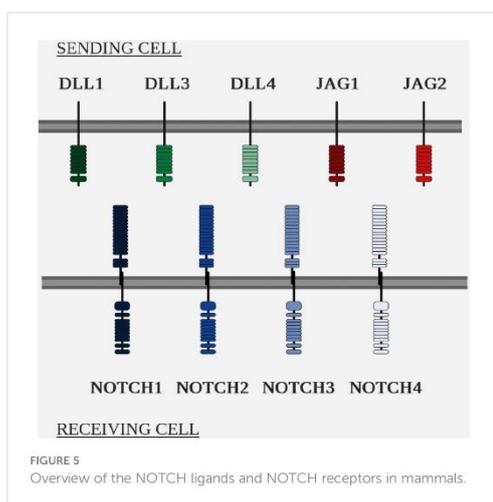
In *Drosophila*, the activity of the *DELTA* and *SERRATE* ligands is regulated by *FRINGE*, a glycosyltransferase. Its expression in the same cell as the receptor causes glycosylation of the EGF sequence repeated on the extracellular domain of the receptor, thus promoting *DELTA* binding and inhibiting *SERRATE* binding. Similarly in mammals, the *FRINGE* homologues, *lunatic fringe* (*LFNG*), *manic fringe* (*MFNG*) and *radical fringe* (*RFNG*), modulate the interaction of ligands with the receptor: *LFNG* and *MFNG* favor *DLL1* binding and inhibit *JAG1* binding, while *RFNG* favors *DLL4* and *JAG1* binding (120, 121).

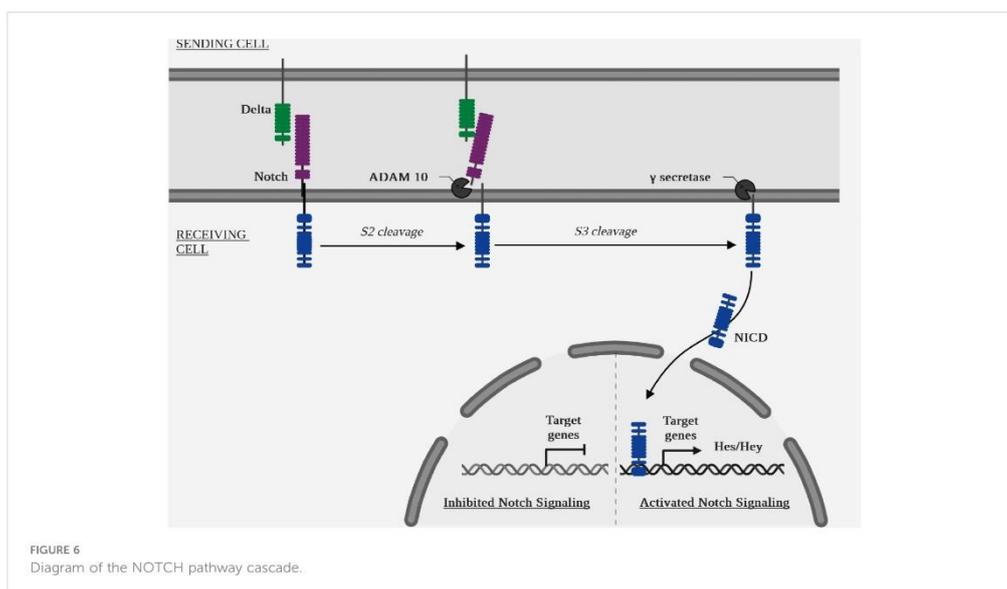
Despite the differences in binding attributable to glycosylation of the NOTCH receptor, the ligands possess different intrinsic affinities for the receptors: *DLL1* has a greater affinity for NOTCH2 and *DLL4* for NOTCH1 (122, 123).

Cis-inhibition: when expressed on the same cell as the receptor, NOTCH ligands can inhibit these same receptors. This phenomenon is called cis-inhibition, as opposed to trans-activation, i.e. the activation of a receptor on cell A by a ligand on cell B (124). The only known functions of *DLL3* to date are, for example, via cis-inhibition of NOTCH1 (125).

As with trans-activation, cis-inhibition is modulated by NOTCH glycosylation. *MFNG* and *LFNG* promote cis-inhibition of NOTCH by *DLL* ligands and restrict cis-inhibition by *JAG* ligands (126).

Canonical pathway (Figure 6 Diagram of the NOTCH pathway cascade): ligand binding to a receptor initiates its endocytosis, which causes a conformational change in the receptor, opening up an enzymatic cleavage site known as S2, targeted by the two isoform enzymes ADAM metallopeptidase domain 10 (ADAM10)





and ADAM metallopeptidase domain 17 (ADAM17) (127). A second intracellular enzymatic cleavage at the S3 site by a γ -secretase, the protein complex containing presenilin 1 (PSEN1) and presenilin 2 (PSEN2) (128), aph-1 homolog A, γ -secretase subunit (APH1A) and aph-1 homolog B, γ -secretase subunit (APH1B), presenilin enhancer γ -secretase subunit (PSENEN) and nicastrin (NCSTN) (129), will cause translocation of the intracellular part of the receptor, NOTCH intracellular domain (NICD), to the nucleus. The target genes of the canonical NOTCH pathway are: *hes family bhlh transcription factor (HES)* and *hes related family bhlh transcription factor with yrpw (HEY)* (7).

The quantitative increase of NICD by cleavage and of *HES* and *HEY* by transcription is a signal of activation of this pathway.

Non-canonical pathway: there is also a NOTCH non-canonical pathway represented by several mechanisms. Mature NOTCH receptors are recycled after endocytosis (130). They can then be re-addressed to the membrane, destroyed in lysosomes or activated

in endosomes, independently of a ligand. Indeed, endosomes contain ADAM enzymes and γ -secretases (131).

NICD can also interact independently of CSL, via direct interaction with other proteins, such as NF- κ B (132).

2.2.3.2 NOTCH1 is a positive effector of astrogliosis

In normal CNS conditions, the NOTCH pathway is only slightly active and NICD is found mainly in the cytoplasm of neurons. However, in several models of neuro-inflammation, NOTCH1 is strongly upregulated (Table 3 Summary table of the NOTCH pathway activity *in vitro* under pathological condition in cultured astrocytes and Table 4 Summary table of the NOTCH pathway activity *in vivo* under various neuro-inflammatory conditions).

2.2.3.2.1 Amyotrophic lateral sclerosis

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease affecting motor neurons in the brain and spinal cord.

TABLE 3 Summary table of the NOTCH pathway activity *in vitro* under pathological condition in cultured astrocytes.

<i>In vitro</i>				
Species	Pathological condition	Treatment	Effect on NOTCH pathway activity	Reference
Primary astrocytes from rat	Hypoxia	Gas mixture of 3% oxygen, 5% carbon dioxide and 92% nitrogen	Increased production of NICD	(133)
Primary astrocytes from rat	Oxidative stress	Hydrogen peroxide 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ for 6 hours	Increased production of NICD	(134)
Primary astrocytes from mice	Inflammation	LPS 500 ng.mL^{-1} for 24 hours	Decreased production of NICD	(135)

TABLE 4 Summary table of the NOTCH pathway activity *in vivo* under various neuro-inflammatory conditions.

<i>In vivo</i>			
Disease	Model	Effects on NOTCH pathway in the CNS	Reference
ALS	SOD1-G93A (transgenic mouse model)	NOTCH1, JAG1, HEY1, HES1 and MAML1 are all increased in whole spinal cord	(136)
ALS	SOD1-G93A (transgenic mouse model)	NICD is increased in astrocytes	(137)
ALS	SOD1-G93A (transgenic mouse model)	NICD/JAG1/DLL4 are increased in astrocytes	(138)
ALS	SOD1-G93A (transgenic mouse model)	NICD is increased in astrocytes	(15)
ALS	Human: ALS patient post-mortem tissue	NICD is prominently present in reactive astrocytes	(15)
ALS	Human: ALS patient post-mortem tissue	NICD is decreased in the hippocampus	(139)
Stroke	MCAO (pathological mouse model)	NICD is increased in whole brain	(140)
Stroke	MCAO (pathological mouse model)	NICD is increased in astrocytes	(14)
Stroke	MCAO (pathological mouse model)	NICD is decreased in astrocytes	(141)
Traumatic injury	SCI (pathological mouse model)	NICD is markedly enhanced in A1 astrocytes at the lesion area compared to astrocytes in uninjured areas	(142)
SMA	SMNΔ7 (transgenic mouse model)	NICD is increased in astrocytes	(143)
MS	EAE (pathological mouse model)	NICD is increased in whole spinal cord	(17)

Numerous teams have studied the NOTCH pathway in experimental animal models of ALS, with sometimes contradictory results.

In a mouse model of ALS, SOD1-G93A (mSOD), Wang et al. demonstrated increased activation of the NOTCH pathway in

mouse spinal cords. Treatment of the mice with lithium and valproic acid, two neuroprotective drugs used in ALS patients, inhibits activation of the NOTCH pathway, the dual therapy being synergistic. However, in this study, activation of the NOTCH pathway was measured on whole spinal cord and was not studied specifically in the different cell types. Meanwhile, *in vitro* analyses were carried out only on a hybrid motor neuron/medulloblastoma cell line (136).

Two teams subsequently attempted to map the expression of the NOTCH ligands and target genes in the spinal cord. Ma et al. demonstrated a modification of the NOTCH pathway activation in mSOD mice after the onset of the disease. In these mice, the disease manifests itself around 90 to 120 days postnatal. The authors demonstrated that before this period, at day 60 for example, the NOTCH pathway is activated in motor neurons (co-localization of NICD and NeuN) in both mSOD and control mice. In 117-day-old mSOD mice, activation of the pathway is decreased in motor neurons and increased in astrocytes. In control mice, NOTCH pathway activation is absent in astrocytes (137). Liu's team confirmed these results in the same mouse model and correlated the increase in NOTCH pathway activation in astrocytes with an increase in the expression of *HES1*, a target gene of the NOTCH pathway in these same cells (138). Conversely, in the same ALS model, Nonneman's team found an increase expression of NICD and JAG1 in astrocytes. Indeed, a mouse model of *Jag1* inhibition specifically in astrocytes causes an increase in disease severity and a decrease in motor neuron viability as well as an increase in NOTCH pathway activation in astrocytes suggesting a beneficial role for NOTCH pathway activation in ALS (15).

Moreover, Gomez-Pinedo et al. performed immunostaining on hippocampal sections from ALS patients. The authors observed an increase in NOTCH1 expression but a decrease in NICD production associated with a decrease in the expression of γ -secretase, ADAM10 and ADAM17. The authors proposed that this decrease in NICD corresponds to a reduced activation of the NOTCH pathway in neurons. However, no quantification of neuronal or astroglial NICD was performed (139).

2.2.3.2.2 Stroke

The reference murine model for the study of stroke is the Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO). The basic technique involves introducing a filament via the carotid artery and advancing it until it blocks the origin of the middle cerebral artery. By varying the duration of the occlusion, this model can produce transient ischemia, ischemia reperfusion, or permanent ischemia.

In a MCAO model of ischemia-reperfusion, γ -secretase activity in mouse brain increases rapidly before returning to normal. Following a one-hour ischemia, the activity is significantly higher after 2 hours of reperfusion, and its level returns to normal after 6 hours of reperfusion. NICD levels are elevated as early as one hour of ischemia and remain stable after 2 and 6 hours of reperfusion. The authors used two techniques to inhibit activation of the NOTCH pathway, antisense *Notch* transgenic mice (*NAS*) and γ -secretase inhibitors (*GSI*). *NAS* transgenic mice are generated by expressing an antisense *Notch1* oligonucleotide under the control of the mammary tumor virus long terminal repeat promoter. The two *GSI*

used are: DAPT (tert-butyl(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-(3,5-difluorophenyl)acetyl]amino]propanoyl]amino]-2-phenylacetate) and DBZ ((2S)-2-[[2-(3,5-difluorophenyl)acetyl]amino]-N-[(7S)-5-methyl-6-oxo-7H-benzo[d][1]benzazepin-7-yl]propanamide). Neurological deficits and brain damage are less severe in transgenic or GSI-treated mice than in their controls. This improved perfusion recovery correlates with reduced microglia activation and lymphocyte infiltration (144). In this study, the use of *NAS* transgenic mice and GSI did not allow us to target a particular cell type. While systemic inhibition of the NOTCH pathway in several cell types appears to have a synergistic effect on the performance of mice after ischemia, it does not provide a detailed understanding of the mechanisms modulated in these different cell types. The same team subsequently demonstrated, *in vitro* and *in vivo*, that neuronal expression of NOTCH1 is responsible for activation of the apoptotic cascade in a model of cerebral ischemia (140).

Another team focused on γ -secretase cleavage products in a subpopulation of radial glial cell marker 2 (RC2)+ reactive astrocytes. After cerebral ischemia, a subpopulation of perilesional proliferative astrocytes (KI67+) begins to express RC2. In these astrocytes, there is an increase in NICD and the intracellular domain amyloid beta precursor protein (APP) known as APP intracellular domain (AICD). GSI treatment after cerebral ischemia do not alter the total number of reactive astrocytes (GFAP+), but reduce the number of RC2+ astrocytes and the number of proliferative reactive astrocytes (GFAP+ KI67+). In a model of conditional astrocytic deletion for *Notch1*, the authors confirmed the results obtained with GSI: decreased number of GFAP+ reactive astrocytes, decreased number of RC2+ reactive astrocytes and increased parenchymal infiltration of CD45+ cells (14).

In contrast, Magnusson et al. found a reduced activation of the NOTCH pathway in astrocytes after cerebral ischemia. In their model of MCAO-induced ischemia, occlusion was maintained for 35 minutes in mice. The authors used a mouse line with a reporter system for cells receiving a signal from the NOTCH pathway. This system is based on the generation of a chimeric NOTCH1 receptor in which the intracellular portion is replaced by GAL4-VP16 (N1-Gal4VP16) in mice that are crossed with transgenic *UAS-lacZ* reporter mice (145). Two weeks after induction of ischemia in these mice, both NICD and β -galactosidase mRNA become undetectable in the striatum of the mice but remain abundant in the brains of uninjured mice. The authors also demonstrated that, as early as day 2 post-ischemia, astrocytes in the striatum express achaete-scute family BHLH transcription factor 1 (*ASCL1*), a proneural transcription factor. Two weeks after ischemia, clusters of doublecortin (DCX)-positive neuroblasts appear. To specifically identify striatal astrocytes, the authors injected an adenovirus expressing the Cre recombinase under the *Gfap* promoter into *R26R-YFP* mice. Seven weeks after inducing ischemia in these mice, *ASCL1+* and *DCX+* cells also express YFP, demonstrating that astrocytes in the striatum generate neuroblasts. Finally, *RBPJ* deletion in striatal astrocytes from healthy mice induces a phenotype similar to a post-ischemia phenotype, namely an increase in *ASCL1* and neuroblast generation. Thus, in post-ischemia, reduced activation of the NOTCH pathway in astrocytes seems to induce a neurogenic program (141).

2.2.3.2.3 Traumatic injury

Following traumatic injury to the spinal cord, a population of reactive astrocytes with a toxic phenotype A1, expressing complement C3, are found in the vicinity of the injury. Qian et al. demonstrated *in vitro* that treatment of primary human astrocytes with conditioned medium of LPS-treated microglial cells induces an A1 phenotype and increases activation of the NOTCH pathway. DAPT treatment reverses the A1 phenotype of astrocytes and astrocytic secretion of inflammatory cytokines: TNF α , IL-1 β and IL-6. By incubating primary neurons with the conditioned medium of these astrocytes, the authors demonstrated their neurotoxic phenotype via an increase in neuronal apoptosis. In the group of neurons incubated with DAPT-treated astrocyte conditioned medium, neuronal apoptosis is significantly reduced, underlining the deleterious nature of activation of this pathway in astrocytes. Interestingly, the authors demonstrated an interaction between the NOTCH pathway and the STAT3 pathway: STAT3 phosphorylation is increased in A1 astrocytes, which is consistent with the literature, but the authors also demonstrated that inhibition of the NOTCH pathway, via DAPT, leads to a decrease in STAT3 phosphorylation, and that there is a direct interaction between these two pathways as demonstrated by immunoprecipitation of STAT3 by NICD. The authors suggest that NICD binds to STAT3 and facilitates its phosphorylation. The NICD/phospho-STAT3 complex would then be translocated to the nucleus and act as a transcription factor. However, this hypothesis remains to be proven (142).

2.2.3.2.4 Spinal muscular atrophy

Spinal muscular atrophy (SMA) is an orphan hereditary disease characterized by skeletal muscle weakness and atrophy due to decreased transcriptional levels of survival motor neuron (SMN) protein caused by mutation or deletion of the *survival motor neuron 1 (SMN1)* gene. *SMN* is encoded by 2 genes that differ mainly by one nucleotide located in exon 7. The majority of *SMN2* transcripts thus yield an SMN protein truncated at exon 7 (*SMN Δ 7*). A commonly used mouse model of spinal muscular atrophy is the *SMN Δ 7* model in which the endogenous murine gene *Smn1* is inactivated and replaced by two human genes, *SMN2* and *SMN2 Δ 7* (*mSmn $^{-/-}$; hSMN2 $^{+/+}$, hSMN2 Δ 7 $^{+/+}$*).

Ohuchi et al. showed an increase in the level of NICD and P-STAT3 in the spinal cord of *SMN Δ 7* mice at P5, associated to an increase at the level of GFAP+ astrocytes (143). Previously, using fibroblasts derived from the skin of a SMA patient, the authors generated induced pluripotent stem cells (SMA-iPSCs) and showed that differentiation into motor neurons (SMA-iPSC-MN) also results in the production of a GFAP+ astrocyte population (146). The use of LY-411575, a GSI, allows a reduction in GFAP+ astrocyte differentiation in the SMA-iPSC-MN model, highlighting the importance of the NOTCH pathway in astrocyte versus neuron differentiation. *In vivo*, intraventricular injection of the same inhibitor at P2 and P5 in *SMN Δ 7* mice improves motor deficit. Pathologically, GSI-treated mice have fewer GFAP+ astrocytes in the medulla than controls (143).

2.2.3.2.5 Hypoxia

Using primary rat astrocytes cultured under a gas mixture of 3% oxygen (O₂), 5% carbon dioxide (CO₂) and 92% nitrogen (N₂),

Zhang et al. showed that hypoxia induces activation of the NOTCH pathway at 12 hours in astrocytes correlated with an increased proliferation and production of the pro-inflammatory cytokines, TNF α and IL-1 β . *In vivo*, the authors showed that rat treated with DAPT show a decreased hypoxia-induced astrocytic reactivity and less VEGFA production (133).

2.2.3.2.6 Oxidative stress

Oxidative stress causes protein oxidation and is implicated in several inflammatory and degenerative neurological pathologies. Sulfiredoxin-1 (SRXN-1) is an endogenous antioxidant protein with neuroprotective effects (134). To study the effect of oxidative stress, Li et al. added hydrogen peroxide (H₂O₂) at a final concentration of 100 μ mol.L⁻¹ to the culture medium of primary rat astrocytes and incubated the cells for 6 hours. Under oxidative stress, SRXN-1 expression is increased in astrocytes. The number of apoptotic astrocytes is increased in the H₂O₂ group, and the addition of *siSRXN-1* potentiates cell apoptosis, confirming the protective antioxidant role of SRXN1. Interestingly, the NOTCH pathway is activated in astrocytes after incubation with H₂O₂ and DAPT treatment and causes an increase in H₂O₂-induced astrocyte apoptosis. Together these results suggest a protective role for the NOTCH pathway in astrocytes following oxidative stress (134).

2.2.3.2.7 Experimental autoimmune encephalomyelitis

Liu et al. investigated the role of IL-9, produced by T helper 9 (TH 9) lymphocytes, in astrogliosis. Treatment of primary murine astrocytes with IL-9 resulted in an increased activation of the NOTCH pathway and STAT3 phosphorylation, as well as increased transcriptional levels of the pro-inflammatory cytokines IL-6, TNF- α , CXCL10 and CCL2. The authors also demonstrated the transcription of a 446-base-pair long non-coding RNA (*lncRNA*) identical to an antisense sequence of the NOTCH gene (*lncRNA Gm13568*) after IL-9 stimulation. *In vitro*, treatment with a lentivirus inhibiting *Gm13568* or with a small hairpin RNA (*shRNA*) directed against *NOTCH1* gave identical results, namely inhibition of the NOTCH pathway in astrocytes, leading to reduced activation of the STAT3 pathway, and inhibition of production of the pro-inflammatory cytokines IL-6, TNF- α and CXCL10. *In vivo*, in a mouse model of MOG-induced EAE, the authors showed that injection of lentiviruses inhibiting *NOTCH1* or inhibiting *Gm13568* delays disease onset and reduces clinical signs in mice, which is correlated with preservation of myelin and a reduction in immune cell infiltrates in the medullar parenchyma (17).

2.2.3.2.8 Contradictory data

Acaz-Fonseca et al. on the other hand, published a study in 2019 that runs counter to the above-mentioned studies describing the deleterious effects of NOTCH pathway activation in neuro-inflammatory pathologies. Indeed, after treatment of primary murine astrocytes with LPS, the authors found an increase in *JAG1* transcriptional levels, but a decrease in NOTCH pathway activation (lower *HES-5* effector transcriptional levels and reduced NICD release). According to the authors, the decrease in the NOTCH pathway activity has an effect on astrocyte morphology, but not on the production of pro-inflammatory factors (135).

In view of all the studies analyzed above, on the role of the NOTCH pathway during neuro-inflammation, it is clear that effects of inactivation of this signaling depend on several factors: first the type of pathology studied, the timing of the knockout and/or of the observations that follows; and second, the method used for the knockout, genetic or pharmacological, and the target, specific, i.e. ligand or receptor, or non-specific, e.g. GSI.

3 Discussion

A complex network of intercellular signaling occurs between cells of the NVU during neuro-inflammation (1, 147). Specifically, astrocytes acquire a reactive phenotype, named astrogliosis, defined by morphological and molecular changes that drive BBB breakdown, acute inflammatory injury as well as chronic neurodegeneration. Understanding the pathways controlling reactive astrogliosis and BBB function is of considerable translational interest to the field of neuro-immunology.

In this review, we first present the state of the art on reactive astrogliosis under neuro-inflammatory conditions, particularly in MS. We then focus on the NOTCH signaling involvement in astrogliosis. Interestingly, the very detailed consensus statement published by C. Escartin et al. in 2021, which lists all the reactive astrocyte markers fully identified in the literature (148), doesn't cover the NOTCH signaling. However, a wealth of publications agrees on the fact that NOTCH1 is a central regulator of astrogliosis in several models of neuro-inflammation and is involved in the pathophysiology of various diseases, notably MS and EAE.

While the role of the NOTCH1 receptor in reactive astrocytes is well documented, that of its ligands is much less so. For example, DLL4 ligand expression has only been reported once, anecdotally, in reactive astrocytes, following brain injury (149). The important role of DLL4-NOTCH1 signaling in the cardiovascular system is already widely appreciated, but little is known about this specific pathway in reactive astrogliosis during neuro-inflammation. Thus, more investigations will be needed to explore the DLL4-NOTCH1 interaction in reactive astrocytes under neuro-inflammatory condition such as MS.

To further investigate the role of the NOTCH pathway in neuro-inflammation, we could also ask whether there is an interaction, through the NOTCH signaling, between reactive astrocytes and other cells from the NVU notably endothelial cells and pericytes which express actors of the NOTCH pathway (8–10, 150).

Moreover, literature shows that immune cells also express NOTCH signaling markers and it is well known that during MS and EAE, immune cells penetrate the BBB and then accumulate within the perivascular space in contact with the astrocytic endfeet (2, 3). Therefore, as NOTCH signaling can influence the differentiation and function of T lymphocytes (150, 151) and because novel emerging properties of the DLL4-NOTCH signaling pathway have recently been identified in pathology, notably in controlling the CD4+/CD8+, Th17/Treg balance both in experimental autoimmune uveitis and EAE (152, 153), studying the NOTCH pathway between astrocytic endfeet and infiltrated inflammatory cells is of particular interest to the field of neuro-immunology.

Overall this review proves that NOTCH1 is a recognized marker of astrogliosis in neuro-inflammation and underlines the importance to take a closer look at the NOTCH signaling in reactive astrocytes, but also NVU neighboring cells, in the pathophysiology of neuro-inflammation like MS condition, in order to investigate the possibility of targeting this pathway therapeutically.

Author contributions

PM: Writing – original draft, Writing – review & editing, Conceptualization. CC: Funding acquisition, Investigation, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing.

References

- McConnell HL, Kersch CN, Woltjer RL, Neuwelt EA. The translational significance of the neurovascular unit. *J Biol Chem* (2017) 292(3):762–70. doi: 10.1074/jbc.R116.760215
- Engelhardt B, Ransohoff RM. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol* (2012) 33(12):579–89. doi: 10.1016/j.it.2012.07.004
- Engelhardt B, Coisne C. Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids Barriers CNS* (2011) 8(1):4. doi: 10.1186/2045-8118-8-4
- Mora P, Hollier PL, Guimbal S, Abelanet A, Diop A, Cornuault L, et al. Blood-brain barrier genetic disruption leads to protective barrier formation at the Glia Limitans. *PLoS Biol* (2010) 18(11):e3000946. doi: 10.1371/journal.pbio.3000946
- Gimsa U, Mitchison NA, Brunner-Weinzierl MC. Immune privilege as an intrinsic CNS property: astrocytes protect the CNS against T-cell-mediated neuroinflammation. *Mediators Inflamm* (2013) 2013:320519. doi: 10.1155/2013/320519
- Chapouly C, Tadesse Argaw A, Horng S, Castro K, Zhang J, Asp L, et al. Astrocytic TYMP and VEGFA drive blood-brain barrier opening in inflammatory central nervous system lesions. *Brain* (2015) 138(Pt 6):1548–67. doi: 10.1093/brain/awv077
- Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2006) 7(9):678–89. doi: 10.1038/nrm2009
- Murphy PA, Lam MTY, Wu X, Kim TN, Vartanian SM, Bollen AW, et al. Endothelial Notch4 signaling induces hallmarks of brain arteriovenous malformations in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) 105(31):10901–6. doi: 10.1073/pnas.0802743105
- Grigorian A, Hurfurd R, Chao Y, Patrick C, Langford TD. Alterations in the Notch4 pathway in cerebral endothelial cells by the HIV aspartyl protease inhibitor, nelfinavir. *BMC Neurosci* (2008) 9(1):1–18. doi: 10.1186/1471-2202-9-27
- Yu L, Lu Z, Burchell S, Nowrangi D, Manaenko A, Li X, et al. Adropin preserves the blood-brain barrier through a Notch1/Hes1 pathway after intracerebral hemorrhage in mice. *J Neurochem* (2017) 143(6):750–60. doi: 10.1111/jnc.14238
- Liu H, Kennard S, Lilly B. NOTCH3 expression is induced in mural cells through an autoregulatory loop that requires endothelial-expressed JAGGED1. *Circ Res* (2009) 104(4):466–75. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184846
- Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2009) 29(5):630–8. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.161521
- Zhong JH, Zhou HJ, Tang T, Cui HJ, Yang AL, Zhang QM, et al. Activation of the Notch-1 signaling pathway may be involved in intracerebral hemorrhage-induced reactive astrogliosis in rats. *J Neurosurg* (2018) 129(3):732–9. doi: 10.3171/2016.11.JNS162121
- Shimada IS, Borders A, Aronshtam A, Spees JL. Proliferating reactive astrocytes are regulated by Notch-1 in the peri-infarct area after stroke. *Stroke* (2011) 42(11):3231–7. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.623280
- Nonneman A, Crieem N, Lewandowski SA, Nuyts R, Thal DR, Pfrieger FW, et al. Astrocyte-derived Jagged-1 mitigates deleterious Notch signaling in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* (2018) 119:26–40. doi: 10.1016/j.nbd.2018.07.012
- Cheng YY, Ding YX, Bian GL, Chen LW, Yao XY, Lin YB, et al. Reactive astrocytes display pro-inflammatory adaptability with modulation of notch-PI3K-AKT

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

- signaling pathway under inflammatory stimulation. *Neuroscience* (2020) 440:130–45. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.05.023
- Liu X, Zhou F, Wang W, Chen G, Zhang Q, Lv R, et al. IL-9-triggered IncRNA Gm13568 regulates Notch1 in astrocytes through interaction with CBP/P300: contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* (2021) 18(1):1–15. doi: 10.1186/s12974-021-02156-5
- Medaer R. Does the history of multiple sclerosis go back as far as the 14th century? *Acta Neurol Scand* (1979) 60(3):189–92. doi: 10.1111/j.1600-0404.1979.tb02968.x
- Cruveilhier J. *Anatomie pathologique du corps humain : ou descriptions, avec figures lithographiées et coloriées, des diverses altérations morbides dont le corps humain est susceptible*. Baillière JB, editor. Paris (1829).
- Carswell SR. *Pathological Anatomy: Illustrations of the Elementary Forms of Disease*. London: Longman, Orme, Brown, Green and Longman (1838). p. 324.
- Charcot JM. *A du texte. Histologie de la sclérose en plaques, leçon faite à l'hospice de la Salpêtrière par M. Charcot et recueillie par M. Bourneville*. Paris: Imprimerie L. Poupart-Davy (1869). p. 23.
- Koch-Henriksen N, Magyari M. Apparent changes in the epidemiology and severity of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* (2011) 17(11):676–88. doi: 10.1038/s41582-021-00556-y
- Boström I, Landtblom AM. Does the changing sex ratio of multiple sclerosis give opportunities for intervention? *Acta Neurologica Scandinavica* (2015) 132(S199):42–5. doi: 10.1111/ane.12430
- Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. *Lancet* (2018) 391(10130):1622–36. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30481-1
- Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology* (1996) 46(4):907–11. doi: 10.1212/WNL.46.4.907
- Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology* (2014) 83(3):278–86. doi: 10.1212/WNL.0000000000000560
- Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* (2018) 17(2):162–73. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2
- Lublin FD, Coetzee T, Cohen JA, Marrie RA, Thompson AJ. Ms on behalf of the IAC on CT in. The 2013 clinical course descriptors for multiple sclerosis: A clarification. *Neurology* (2020) 94(24):1088–92. doi: 10.1212/WNL.0000000000001198
- Meng I, Hou W, Chui J, Han R, Gelb AW. Cardiac output and cerebral blood flow: the integrated regulation of brain perfusion in adult humans. *Anesthesiology* (2015) 123(5):1198–208. doi: 10.1097/ALN.0000000000000872
- Xing CY, Tarumi T, Liu J, Zhang Y, Turner M, Riley J, et al. Distribution of cardiac output to the brain across the adult lifespan. *J Cereb Blood Flow Metab* (2017) 37(8):2848–56. doi: 10.1177/0271678X16676826
- Liu R, Du S, Zhao L, Jain S, Sahay K, Rizvanov A, et al. Autoreactive lymphocytes in multiple sclerosis: Pathogenesis and treatment target. *Front Immunol* (2022) 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.996469
- Engelhardt B, Carare RO, Bechmann I, Flügel A, Laman JD, Weller RO. Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system. *Acta Neuropathol* (2016) 132(3):317–38. doi: 10.1007/s00401-016-1606-5

33. Ineichen BV, Okar SV, Proulx ST, Engelhardt B, Lassmann H, Reich DS. Perivascular spaces and their role in neuroinflammation. *Neuron* (2022) 110(21):3566–81. doi: 10.1016/j.neuron.2022.10.024
34. Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV. Blood-brain barrier: from physiology to disease and back. *Physiol Rev* (2019) 99(1):21–78. doi: 10.1152/physrev.00050.2017
35. Battistini L, Piccio L, Rossi B, Bach S, Galgani S, Gasperini C, et al. CD8+ T cells from patients with acute multiple sclerosis display selective increase of adhesiveness in brain venules: a critical role for P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* (2003) 101(12):4775–82. doi: 10.1182/blood-2002-10-3309
36. Sathyanadan K, Coisne C, Enzmann G, Deutsch U, Engelhardt B. PSGL-1 and E/P-selectins are essential for T-cell rolling in inflamed CNS microvessels but dispensable for initiation of EAE. *Eur J Immunol* (2014) 44(8):2287–94. doi: 10.1002/eji.201344214
37. Kerfoot SM, Norman MU, Lapointe BM, Bonder CS, Zbytniuk L, Kubes P. Reevaluation of P-selectin and $\alpha 4$ integrin as targets for the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* (2006) 176(10):6225–34. doi: 10.4049/jimmunol.176.10.6225
38. Steffen BJ, Butcher EC, Engelhardt B. Evidence for involvement of ICAM-1 and VCAM-1 in lymphocyte interaction with endothelium in experimental autoimmune encephalomyelitis in the central nervous system in the SJL/J mouse. *Am J Pathol* (1994) 145(1):189–201.
39. Greenwood J, Wang Y, Calder VL. Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *Immunology* (1995) 86(3):408–15.
40. Lusciuskas FW, Ma S, Nusrat A, Parkos CA, Shaw SK. Leukocyte transendothelial migration: A junctional affair. *Semin Immunol* (2002) 14(2):105–13. doi: 10.1006/smim.2001.0347
41. Johnson-Léger C, Imhof BA. Forging the endothelium during inflammation: pushing at a half-open door? *Cell Tissue Res* (2003) 314(1):93–105. doi: 10.1007/s00441-003-0775-4
42. Engelhardt B, Wolburg H. Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol* (2004) 34(11):2955–63. doi: 10.1002/eji.200425327
43. Abadier M, Haghayegh Jahromi N, Cardoso Alves L, Boscacci R, Vestweber D, Barnum S, et al. Cell surface levels of endothelial ICAM-1 influence the transcellular or paracellular T-cell diapedesis across the blood-brain barrier. *Eur J Immunol* (2015) 45(4):1043–58. doi: 10.1002/eji.201445125
44. Wimmer I, Tietz S, Nishihara H, Deutsch U, Sallusto F, Gosselet F, et al. PECAM-1 stabilizes blood-brain barrier integrity and favors paracellular T-cell diapedesis across the blood-brain barrier during neuroinflammation. *Front Immunol* (2019) 10:711. doi: 10.3389/fimmu.2019.00711
45. Kawakami N, Nägerl UV, Odoardi F, Bonhoeffer T, Wekerle H, Flügel A. Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion. *J Exp Med* (2005) 201(11):1805–14. doi: 10.1084/jem.20050011
46. Agrawal S, Anderson P, Durbeej M, van Rooijen N, Ivars F, Opendakker G, et al. Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* (2006) 203(4):1007–19. doi: 10.1084/jem.20051342
47. Song J, Wu C, Korpos E, Zhang X, Agrawal SM, Wang Y, et al. Focal MMP-2 and MMP-9 activity at the blood-brain barrier promotes chemokine-induced leukocyte migration. *Clin Rep* (2015) 10(7):1040–54. doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.037
48. Hasel P, Liddelow SA. Astrocytes. *Curr Biol* (2021) 31(7):R326–7. doi: 10.1016/j.cub.2021.01.056
49. Miller RH, Raff MC. Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J Neurosci* (1984) 4(2):585–92. doi: 10.1523/JNEUROSCI.04-02-00585.1984
50. Peters A, Palay SL, Webster HD. The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells. Philadelphia: Saunders (1976), 442.
51. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* (2010) 119(1):7–35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8
52. Alvarez JA, Baird A, Tatum A, Daucher J, Chorsky R, Gonzalez AM, et al. Localization of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in human glial neoplasms. *Mod Pathol* (1992) 5(3):303–7.
53. Stone J, Iiin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, et al. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci* (1995) 15(7):4738–47. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-07-04738.1995
54. Ijichi A, Sakuma S, Tofilon PJ. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression in normal rat astrocyte cultures. *Glia* (1995) 14(2):87–93. doi: 10.1002/glia.440140203
55. Proescholdt MA, Heiss JD, Walbridge S, Mühlhauser J, Capogrossi MC, Oldfield EH, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulates vascular permeability and inflammation in rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol* (1999) 58(6):613–27. doi: 10.1097/00005072-199906000-00006
56. Proescholdt MA, Jacobson S, Tresser N, Oldfield EH, Merrill MJ. Vascular endothelial growth factor is expressed in multiple sclerosis plaques and can induce inflammatory lesions in experimental allergic encephalomyelitis rats. *J Neuropathol Exp Neurol* (2002) 61(10):914–25. doi: 10.1093/jnen/61.10.914
57. Argaw AT, Zhang Y, Snyder BJ, Zhao ML, Kopp N, Lee SC, et al. IL-1 β Regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. *J Immunol* (2006) 177(8):5574–84. doi: 10.4049/jimmunol.177.8.5574
58. Argaw AT, Gurfein BT, Zhang Y, Zameer A, John GR. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc Natl Acad Sci* (2009) 106(6):1977–82. doi: 10.1073/pnas.0808698106
59. Argaw AT, Asp L, Zhang J, Navrazhina K, Pham T, Mariani JN, et al. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J Clin Invest* (2012) 122(7):2454–68. doi: 10.1172/JCI60842
60. Saeki T, Tanada M, Takashima S, Saeki H, Takiyama W, Nishimoto N, et al. Correlation between expression of platelet-derived endothelial cell growth factor (Thymidine phosphorylase) and microvessel density in early-stage human colon carcinomas. *Japanese J Clin Oncol* (1997) 27(4):227–30. doi: 10.1093/jjco/27.4.227
61. Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, et al. Thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor expression associated with hepatic metastasis in gastric carcinoma. *Br J Cancer* (1996) 73(8):884–8. doi: 10.1038/bjc.1996.177
62. Igarashi M, Dhar DK, Kubota H, Yamamoto A, El-Assal O, Nagasue N. The prognostic significance of microvessel density and thymidine phosphorylase expression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* (1998) 82(7):1225–32. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19980401)82:7<1225::AID-CNCR3>3.0.CO;2-E
63. Takao S, Takebayashi Y, Che X, Shinchi H, Natsugoe S, Miyadera K, et al. Expression of thymidine phosphorylase is associated with a poor prognosis in patients with ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res* (1998) 4(7):1619–24.
64. Engels K, Fox SB, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. Up-regulation of thymidine phosphorylase expression is associated with a discrete pattern of angiogenesis in ductal carcinomas *in situ* of the breast. *J Pathol* (1997) 182(4):414–20. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199708)182:4<414::AID-PATH897>3.0.CO;2-Q
65. Koukourakis MI, Giromanolaki A, O'Byrne KJ, Comley M, Whitehouse RM, Talbot DC, et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor expression correlates with tumour angiogenesis and prognosis in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* (1997) 75(4):477–81. doi: 10.1038/bjc.1997.83
66. Sengupta S, Sellers LA, Matheson HB, Fan TPD. Thymidine phosphorylase induces angiogenesis *in vivo* and *in vitro*: an evaluation of possible mechanisms. *Br J Pharmacol* (2003) 139(2):219–31. doi: 10.1038/sj.bjp.0705216
67. Beachy PA, Hymowitz SG, Lazarus RA, Leahy DJ, Siebold C. Interactions between Hedgehog proteins and their binding partners come into view. *Genes Dev* (2010) 24(18):2001–12. doi: 10.1101/gad.1951710
68. Alvarez JJ, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, et al. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science* (2011) 334(6063):1727–31. doi: 10.1126/science.1206936
69. Hollier PL, Chapouly C, Diop A, Guimbal S, Cornuault L, Gadeau AP, et al. Full-length Dhh and N-terminal Shh act as competitive antagonists to regulate angiogenesis and vascular permeability. *Cardiovasc Res* (2021) 117(12):2489–501. doi: 10.1093/cvr/cvaa285
70. Mathewson AJ, Berry M. Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. *Brain Res* (1985) 327(1):61–9. doi: 10.1016/0006-8993(85)91499-4
71. Ramón y Cajal S, May RM. *Degeneration & regeneration of the nervous system*. London: Oxford University Press, Humphrey Milford (1928), p. 2.
72. Wanner IB, Anderson MA, Song B, Levine J, Fernandez A, Gray-Thompson Z, et al. Glial Scar Borders Are Formed by Newly Proliferated, Elongated Astrocytes That Interact to Corral Inflammatory and Fibrotic Cells via STAT3-Dependent Mechanisms after Spinal Cord Injury. *J Neurosci* (2013) 33(31):12870–86. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2121-13.2013
73. Adams CWM, Poston RN, Buk SJ. Pathology, histochemistry and immunocytochemistry of lesions in acute multiple sclerosis. *J Neurological Sci* (1989) 92(2–3):291–306. doi: 10.1016/0022-510X(89)90144-5
74. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* (2009) 32(12):638–47. doi: 10.1016/j.tins.2009.08.002
75. Horng S, Theratit A, Moyon S, Gordon A, Kim K, Argaw AT, et al. Astrocytic tight junctions control inflammatory CNS lesion pathogenesis. *J Clin Invest* (2017) 127(8):3136–51. doi: 10.1172/JCI91301
76. Amatruda M, Chapouly C, Woo V, Safavi F, Zhang J, Dai D, et al. Astrocytic junctional adhesion molecule-A regulates T-cell entry past the glia limitans to promote central nervous system autoimmune attack. *Brain Commun* (2022) 4(2):fcaa044. doi: 10.1093/braincomms/fcaa044
77. Selmaj K, Raine CS, Cannella B, Brosnan CF. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest* (1991) 87(3):949–54. doi: 10.1172/JCI115102
78. Brambilla R, Ashbaugh JJ, Magliozzi R, Dellarole A, Karmally S, Szymkowski DE, et al. Inhibition of soluble tumour necrosis factor is therapeutic in experimental autoimmune encephalomyelitis and promotes axon preservation and remyelination. *Brain* (2011) 134(Pt 9):2736–54. doi: 10.1093/brain/awr199
79. Plumb J, McQuaid S, Cross AK, Surr J, Haddock G, Bunning RA, et al. Upregulation of ADAM-17 expression in active lesions in multiple sclerosis. *Mult Scler* (2006) 12(4):375–85. doi: 10.1191/135248506ms12760a

80. Patel JR, Williams JL, Muccigrosso MM, Liu L, Sun T, Rubin JB, et al. Astrocyte TNFR2 is required for CXCL12-mediated regulation of oligodendrocyte progenitor proliferation and differentiation within the adult CNS. *Acta Neuropathol* (2012) 124(6):847–60. doi: 10.1007/s00401-012-1034-0
81. Maimone D, Guazzi GC, Annunziata P. IL-6 detection in multiple sclerosis brain. *J Neurological Sci* (1997) 146(1):59–65. doi: 10.1016/S0022-510X(96)00283-3
82. Schönrock LM, Gawlowski G, Brück W. Interleukin-6 expression in human multiple sclerosis lesions. *Neurosci Lett* (2000) 294(1):45–8. doi: 10.1016/S0304-3940(00)01543-3
83. Okuda Y, Sakoda S, Bernard CC, Fujimura H, Saeki Y, Kishimoto T, et al. IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Int Immunol* (1998) 10(5):703–8. doi: 10.1093/intimm/10.5.703
84. Erta M, Giralt M, Jiménez S, Molinero A, Comes G, Hidalgo J. Astrocytic IL-6 influences the clinical symptoms of EAE in mice. *Brain Sci* (2016) 6(2):15. doi: 10.3390/brainsci6020015
85. Saikali P, Antel JP, Pittet CL, Newcombe J, Arbour N. Contribution of astrocyte-derived IL-15 to CD8 T cell effector functions in multiple sclerosis. *J Immunol* (2010) 185(10):5693–703. doi: 10.4049/jimmunol.1002188
86. Das Sarma J, Ciric B, Marek R, Sadhukhan S, Caruso ML, Shafagh J, et al. Functional interleukin-17 receptor A is expressed in central nervous system glia and upregulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflamm* (2009) 6:14. doi: 10.1186/1742-2094-6-14
87. Elain G, Jeanneau K, Rutkowska A, Mir AK, Dev KK. The selective anti-IL17A monoclonal antibody secukinumab (AIN457) attenuates IL17A-induced levels of IL6 in human astrocytes. *Glia* (2014) 62(5):725–35. doi: 10.1002/glia.22637
88. Toy D, Kugler D, Wolfson M, Bos TV, Gurgel J, Derry J, et al. Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *J Immunol* (2006) 177(1):36–9. doi: 10.4049/jimmunol.177.1.36
89. Gu C, Wu L, Li X. IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* (2013) 64(2):477–85. doi: 10.1016/j.cyt.2013.07.022
90. Kang Z, Altuntas CZ, Gulen MF, Liu C, Giltiyani N, Qin H, et al. Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* (2010) 32(3):414–25. doi: 10.1016/j.immuni.2010.03.004
91. Christophi GP, Gruber RC, Panos M, Christophi RL, Jubelt B, Massa PT. Interleukin-33 upregulation in peripheral leukocytes and CNS of multiple sclerosis patients. *Clin Immunol* (2012) 142(3):308–19. doi: 10.1016/j.clim.2011.11.007
92. Chen H, Sun Y, Lai L, Wu H, Xiao Y, Ming B, et al. Interleukin-33 is released in spinal cord and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Neuroscience* (2015) 308:157–68. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.09.019
93. Xiao Y, Lai L, Chen H, Shi J, Zeng F, Li J, et al. Interleukin-33 deficiency exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis with an influence on immune cells and glia cells. *Mol Immunol* (2018) 101:550–63. doi: 10.1016/j.molimm.2018.08.026
94. Shrestha B, Ge S, Pachter JS. Resolution of central nervous system astrocytic and endothelial sources of CCL2 gene expression during evolving neuroinflammation. *Fluids Barriers CNS* (2014) 11(1):1–6. doi: 10.1186/2045-8118-11-6
95. Giraud SN, Caron CM, Pham-Dinh D, Kitabgi P, Nicot AB. Estradiol inhibits ongoing autoimmune neuroinflammation and NFκB-dependent CCL2 expression in reactive astrocytes. *Proc Natl Acad Sci* (2010) 107(18):8416–21. doi: 10.1073/pnas.0910627107
96. Kim RY, Hoffman AS, Itoh N, Ao Y, Spence R, Sofroniew MV, et al. Astrocyte CCL2 sustains immune cell infiltration in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* (2014) 274(1–2):53–61. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.06.009
97. Paul D, Ge S, Lemire Y, Jellison ER, Serwanski DR, Ruddle NH, et al. Cell-selective knockout and 3D confocal image analysis reveals separate roles for astrocyte- and endothelial-derived CCL2 in neuroinflammation. *J Neuroinflamm* (2014) 11(1):1–16. doi: 10.1186/1742-2094-11-10
98. Maki W, Morales RE, Carroll VA, Telford WG, Knibbs RN, Stoolman LM, et al. CCR6 colocalizes with CD18 and enhances adhesion to activated endothelial cells in CCR6-transduced Jurkat T cells. *J Immunol* (2002) 169(5):2346–53. doi: 10.4049/jimmunol.169.5.2346
99. Krzysiek R, Lefevre EA, Bernard J, Fousat A, Galanaud P, Louache F, et al. Regulation of CCR6 chemokine receptor expression and responsiveness to macrophage inflammatory protein-3α/CCL20 in human B cells. *Blood* (2000) 96(7):2338–45. doi: 10.1182/blood.V96.7.2338
100. Varona R, Zaballos A, Gutiérrez J, Martín P, Roncal F, Albar JP, et al. Molecular cloning, functional characterization and mRNA expression analysis of the murine chemokine receptor CCR6 and its specific ligand MIP-3α. *FEBS Lett* (1998) 440(1–2):188–94. doi: 10.1016/S0014-5793(98)01450-1
101. Ambrosini E, Columba-Cabezas S, Serafini B, Muscella A, Aloisi F. Astrocytes are the major intracerebral source of macrophage inflammatory protein-3α/CCL20 in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis and *in vitro*. *Glia* (2003) 41(3):290–300. doi: 10.1002/glia.10193
102. Meares GP, Ma X, Qin H, Benveniste EN. Regulation of CCL20 expression in astrocytes by IL-6 and IL-17. *Glia* (2012) 60(5):771–81. doi: 10.1002/glia.22307
103. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* (2009) 10(5):514–23. doi: 10.1038/ni.1716
104. Simpson JE, Newcombe J, Cuzner MI, Woodroffe MN. Expression of the interferon-γ-inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol* (2000) 26(2):133–42. doi: 10.1046/j.1365-2990.2000.026002133.x
105. Tanuma N, Sakuma H, Sasaki A, Matsumoto Y. Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* (2006) 112(2):195–204. doi: 10.1007/s00401-006-0083-7
106. Mills Ko E, Ma JH, Guo F, Miers L, Lee E, Bannerman P, et al. Deletion of astroglial CXCL10 delays clinical onset but does not affect progressive axon loss in a murine autoimmune multiple sclerosis model. *J Neuroinflamm* (2014) 11(1):1–11. doi: 10.1186/1742-2094-11-105
107. Meiron M, Zohar Y, Anunu R, Wildbaum G, Karin N. CXCL12 (SDF-1α) suppresses ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by selecting antigen-specific regulatory T cells. *J Exp Med* (2008) 205(11):2643–55. doi: 10.1084/jem.20080730
108. Brambilla R, Persaud T, Hu X, Karmally S, Shestopalov VI, Dvorianchikova G, et al. Transgenic inhibition of astroglial NF-κB improves functional outcome in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing chronic central nervous system inflammation. *J Immunol* (2009) 182(5):2628–40. doi: 10.4049/jimmunol.0802954
109. Mohr OL. Character changes caused by mutation of an entire region of a chromosome in drosophila. *Genetics* (1919) 4(3):275–82. doi: 10.1093/genetics/4.3.275
110. Kopan R, Ilagan M. The canonical notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* (2009) 137(2):216–33. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.045
111. Hori K, Sen A, Artavanis-Tsakonas S. Notch signaling at a glance. *J Cell Sci* (2013) 126(10):2135–40. doi: 10.1242/jcs.127308
112. Larsson C, Lardelli M, White I, Lendahl U. The human NOTCH1, 2, and 3 genes are located at chromosome positions 9q34, 1p13-p11, and 19p13.2-p13.1 in regions of neoplasia-associated translocation. *Genomics* (1994) 24(2):253–8. doi: 10.1006/geno.1994.1613
113. Li L, Huang GM, Banta AB, Deng Y, Smith T, Dong P, et al. Cloning, characterization, and the complete 56.8-kilobase DNA sequence of the human NOTCH4 gene. *Genomics* (1998) 51(1):45–58. doi: 10.1006/geno.1998.5330
114. Borggräfe T, Oswald F. The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci* (2009) 66(10):1631–46. doi: 10.1007/s00108-009-8668-7
115. Dreval K, Lake RJ, Fan HY. HDAC1 negatively regulates selective mitotic chromatin binding of the Notch effector RBPJ in a KDM5A dependent manner. *Nucleic Acids Res* (2019) 47(9):4521–38. doi: 10.1093/nar/gkz178
116. Alberi L, Hoey SE, Brai E, Scotti AL, Marathe S. Notch signaling in the brain: In good and bad times. *Ageing Res Rev* (2013) 12(3):801–14. doi: 10.1016/j.arr.2013.03.004
117. Ables JL, Breunig JJ, Eisch AJ, Rakic P. Notch signaling just development: Notch signaling in the adult brain. *Nat Rev Neurosci* (2011) 12(5):269–83. doi: 10.1038/nrn3024
118. Limbourg FP, Takeshita K, Radtke F, Bronson RT, Chin MT, Liao JK. Essential role of endothelial notch1 in angiogenesis. *Circulation* (2005) 111(14):1826–32. doi: 10.1161/01.CIR.0000160870.93058.DD
119. Klueg KM, Muskavitch MA. Ligand-receptor interactions and trans-endocytosis of Delta, Serrate and Notch: members of the Notch signaling pathway in Drosophila. *J Cell Sci* (1999) 112(19):3289–97. doi: 10.1242/jcs.112.19.3289
120. Kakuda S, Haltiwanger RS. Deciphering the fringe-mediated notch code: identification of activating and inhibiting sites allowing discrimination between ligands. *Dev Cell* (2017) 40(2):193–201. doi: 10.1016/j.devcel.2016.12.013
121. Taylor P, Takeuchi H, Sheppard D, Chillakuri C, Lea SM, Haltiwanger RS, et al. Fringe-mediated extension of O-linked fucose in the ligand-binding region of Notch1 increases binding to mammalian Notch ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* (2014) 111(20):7290–5. doi: 10.1073/pnas.1319683111
122. Tverikhina I, Schuster-Gossler K, Jarrett SM, Andrawes MB, Rohrbach M, Blacklow SC, et al. The ectodomains determine ligand function *in vivo* and selectivity of DLL1 and DLL4 toward NOTCH1 and NOTCH2 *in vitro*. *eLife* (2018) 7:e40045. doi: 10.7554/eLife.40045.030
123. Andrawes MB, Xu X, Liu H, Ficarro SB, Maroto JA, Aster JC, et al. Intrinsic selectivity of notch 1 for delta-like 4 over delta-like 1*. *J Biol Chem* (2013) 288(35):25477–89. doi: 10.1074/jbc.M113.454850
124. del Álamo D, Rouault H, Schweisguth F. Mechanism and significance of cis-inhibition in notch signalling. *Curr Biol* (2011) 21(1):R40–7. doi: 10.1016/j.cub.2010.10.034
125. Ladi E, Nichols JT, Ge W, Miyamoto A, Yao C, Yang LT, et al. The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. *J Cell Biol* (2005) 170(6):983–92. doi: 10.1083/jcb.200503113
126. LeBon L, Lee TV, Sprinzak D, Jafar-Nejad H, Elowitz MB. Fringe proteins modulate Notch-ligand cis and trans interactions to specify signaling states. *eLife* (2014) 3:e02950. doi: 10.7554/eLife.02950.020

DLL4 au niveau de la GLIA LIMITANS, un acteur clé de la physiopathologie de la neuro-inflammation

Résumé

Introduction : Au cours de la neuro-inflammation, les astrocytes, qui font partie intégrante de l'unité neuro-vasculaire avec les vaisseaux de la barrière hémato-encéphalique (BHE), subissent des changements morphologiques et moléculaires appelés « astroglie ». On parle alors d'« astrocytes réactifs » dont le phénotype est complexe avec des effets soit bénéfiques, soit délétères, sur l'intégrité de la BHE. Pour caractériser le transcriptome astrocytaire induit par l'astroglie en contexte inflammatoire et ainsi mieux comprendre les conséquences qui en découlent au niveau du système nerveux central, le laboratoire a réalisé un séquençage de l'ARN sur des astrocytes humains en culture, quiescents versus réactifs. Ce séquençage a permis d'identifier le gène *delta like canonical Notch ligand 4* (*DLL4*), un ligand de la voie NOTCH, comme étant fortement surexprimé par les astrocytes réactifs in vitro. Cette observation a été vérifiée in vivo sur des biopsies corticales de lésions actives de patients atteints de sclérose en plaques.

Objectifs : Notre objectif est d'étudier la contribution de la signalisation DLL4-NOTCH1 aux effets de l'astroglie en condition neuro-inflammatoire.

Méthodes : Dans un premier temps, nous avons développé deux modèles murins d'inhibition génique spécifiquement astrocytaire de *Dll4* (souris *DLL4ACKO*), le premier permettant une inhibition partielle et le second une inhibition totale du *DLL4* astrocytaire. Puis dans un second temps, nous avons mis au point un modèle préclinique d'inhibition pharmacologique systémique reposant sur un anticorps monoclonal bloquant dirigé contre *DLL4* injecté à des souris sauvages C57BL/6. Le modèle de neuro-inflammation que nous avons utilisé est un modèle murin de sclérose en plaques appelé encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) qui consiste à immuniser l'animal contre sa propre myéline. La taille des lésions, l'inflammation, la démyélinisation et le handicap clinique ont été mesurés afin d'évaluer la gravité de la pathologie. En parallèle, nous avons utilisé in vitro des astrocytes primaires humains incubés avec l'interleukin 1 beta (IL1B) afin de mimer un état inflammatoire et ainsi induire l'astroglie. Dans ce modèle, l'inhibition de *DLL4* est obtenue par traitement avec un petit ARN interférent (siRNA) dirigé contre *DLL4*.

Résultats : In vivo, nous avons observé une diminution de la gravité de la pathologie chez les souris *Dll4ACKO* proportionnelle au degré d'inhibition du *DLL4* astrocytaire. D'un point de vue clinique, le handicap moteur est moins important chez les souris mutées que chez les souris contrôles. D'un point de vue anatomo-pathologique, ces mêmes animaux présentent une diminution de l'astroglie, corrélée à une diminution de l'expression astrocytaire du facteur pro-inflammatoire interleukin 6 (IL6), et des facteurs de perméabilisation vasculaire, thymidine phosphorylase (TYMP) et vascular endothelial growth factor A (VEGFA). In vitro, nous avons démontré que la signalisation juxtacrine *DLL4-NOTCH1* dans les astrocytes réactifs participe au contrôle direct du niveau transcriptionnel d'IL6 et que l'inhibition de cette voie engendre une diminution de la production de TYMP et VEGFA. Enfin, nous avons prouvé que le traitement de souris C57BL/6 avec un anticorps monoclonal dirigé contre *DLL4* réduit l'invalidité clinique dans un modèle d'EAE et permet le maintien de l'imperméabilité de la BHE.

Discussion : L'ensemble de ces données suggère que *DLL4* induit une partie des effets délétères de l'astroglie durant l'EAE via la promotion de l'inflammation et la perturbation de la structure de la BHE. Ainsi, nous pensons que l'axe *DLL4-NOTCH1*, dans les astrocytes réactifs en contexte inflammatoire, représente une cible intéressante pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la prise en charge des pathologies neuro-inflammatoires comme la sclérose en plaques, pour lesquelles les options thérapeutiques font encore cruellement défaut.

Mots Clés : Neuro-inflammation, Voie NOTCH, Astroglie, Sclérose en plaque, Unité neuro-vasculaire

Delta like 4 at the GLIA LIMITANS, a key player of neuro-inflammation pathophysiology

Abstract

Introduction: During neuroinflammation, astrocytes, which form an integral part of the neurovascular unit with the vessels of the blood-brain barrier, undergo morphological and molecular changes known as "astrogliosis". They take the name of "reactive astrocytes", and have a complex phenotype with either beneficial or deleterious effects on the integrity of the blood-brain barrier. To characterize the astrocytic transcriptome induced by astrogliosis in an inflammatory context, and thus gain a better understanding of its consequences for the central nervous system, the laboratory carried out a RNA sequencing on quiescent versus reactive human astrocytes in culture. This sequencing identified the *delta like canonical Notch ligand 4* (*Dll4*) gene, a ligand of the NOTCH pathway, as being strongly overexpressed by reactive astrocytes in vitro. This observation was verified in vivo on cortical biopsies of active lesions from multiple sclerosis patients.

Objectives: Our aim is to study the contribution of *DLL4-NOTCH1* signaling to the effects of astrogliosis under neuroinflammatory conditions.

Methods: Firstly, we developed a mouse model of astrocytic-specific gene inhibition of *Dll4* (*DLL4ACKO* mice). Secondly, we developed a preclinical model of systemic pharmacological inhibition based on a blocking monoclonal antibody directed against *DLL4* injected into wild-type C57BL/6 mice. The neuroinflammation model we used is a mouse model of multiple sclerosis called experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), in which the animal is immunized against its own myelin. Lesion size, inflammation, demyelination and clinical disability were measured to assess the severity of the pathology. In parallel, we used in vitro primary human astrocytes incubated with interleukin 1 beta (IL1B) to mimic an inflammatory state and thus induce astrogliosis. In this model, *DLL4* inhibition is achieved by treatment with a small interfering RNA (siRNA) directed against *DLL4*.

Results: In vivo, we observed a reduction in the severity of pathology in *Dll4ACKO* mice. From a clinical point of view, motor disability was less severe in mutated mice than in control mice. From an anatomical-pathological point of view, these same animals show a reduction in astrogliosis, correlated with a decrease in astrocytic expression of the pro-inflammatory factor interleukin 6 (IL6), and of the vascular permeability factors thymidine phosphorylase (TYMP) and vascular endothelial growth factor A (VEGFA). In vitro, we demonstrated that *DLL4-NOTCH1* juxtacrine signaling in reactive astrocytes participates in the direct control of IL6 transcriptional levels, and that inhibition of this pathway results in a decrease in TYMP and VEGFA production. Finally, we have demonstrated that treatment of C57BL/6 mice with a monoclonal antibody directed against *DLL4* reduces clinical disability in a model of EAE and maintains the impermeability of the blood-brain barrier.

Discussion: Taken together, these data suggest that *DLL4* induces some of the deleterious effects of astrogliosis during EAE by promoting inflammation and disrupting the structure of the blood-brain barrier. Thus, we believe that the *DLL4-NOTCH1* axis, in reactive astrocytes in an inflammatory context, represents an interesting target for the development of new therapeutic strategies for the management of neuroinflammatory pathologies such as multiple sclerosis, for which therapeutic options are still sorely lacking.

Keywords: Neuroinflammation, NOTCH pathway, Astrogliosis, Multiple sclerosis, Neuro-vascular unit,

Unité de recherche

Inserm U1034, biologie des maladies cardiovasculaires
Avenue de Magellan
33604 - PESSAC