

UNIVERSITE DE STRASBOURG
École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THÈSE

**PRESENTÉE POUR LE DIPLÔME DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG**

Spécialité NEUROSCIENCES

PAR

COLLONGUES Nicolas

**APPROCHE TRANSLATIONNELLE DE LA
NEUROMYÉLITE OPTIQUE :
DU PHENOTYPE AU HANDICAP**

Soutenue le 08 septembre 2011 devant la commission d'examen

Professeur	Jérôme DE SEZE	Directeur de Thèse
Professeur	Klaus PETRY	Rapporteur externe
Professeur	Christian SINDIC	Rapporteur externe
Professeur	Guy MENSAH-NYAGAN	Examineur
Docteur	Philippe CABRE	Membre invité

« Mais les parties du monde ont toutes un tel rapport et un tel enchainement l'une avec l'autre, que je crois impossible de connaitre l'une sans l'autre et sans le tout. »

Pascal

Pensées

REMERCIEMENTS

A messieurs les membres du jury,

Monsieur **Christian Sindic**, professeur en neurologie, spécialiste en immunologie clinique, pour ses remarques constructives à propos de l'anticorps anti-aquaporine-4, son sens de la transversalité et son amour de la langue française

Monsieur **Klaus Petry**, professeur en neurosciences, pour m'avoir fait partager son expertise dans le domaine de la neuroinflammation, sa maîtrise de l'outil IRM, ses conseils sur les marqueurs microgliaux

Monsieur **Guy Mensah-Nyagan**, professeur en neurosciences, pour m'avoir donné les bases en neurochimie et le goût d'aller toujours plus loin dans la compréhension des mécanismes moléculaires

Monsieur **Philippe Cabre**, docteur en neurologie, pour ses remarques éclairées sur cette pathologie rare et complexe qu'est la neuromyéélite optique, ainsi que pour les nombreux échanges passionnés que nous avons eu ensemble

Monsieur **Jérôme de Seze**, professeur en neurologie, pour m'avoir permis d'être l'auteur de cette thèse et pour avoir cru en moi, tout simplement.

A tous ceux qui m'ont supporté et aidé dans cette épreuve,

A Elisabeth Trifilieff, pour sa grande gentillesse et ses conseils pertinents sans lesquels cette thèse ne serait pas ce qu'elle est. Merci aussi pour son goût des choses bien faites : demain je m'achète un cahier de labo, promis !

A Jérôme Steibel, pour m'avoir accompagné depuis le début dans ce vaste projet d'immunisation, m'avoir appris à relativiser et donner l'adresse de la meilleure brasserie de Strasbourg !

A Chanh Dao Lam pour sa curiosité et son savoir-faire légendaires, son sourire à toute épreuve

A Said Ghandour pour son soutien et l'intérêt qu'il a porté à ce travail

A Wissam Beaino, de Pittsburg, pour m'avoir fait partager son expérience dans les domaines scientifiques et logistiques

A Laura Harsan, pour sa bienveillance à mon égard, sa disponibilité et ses allers-retours Strasbourg-Freiburg

À Vidjeyabaradi Brice pour sa bonne humeur, son amabilité et son grand professionnalisme

A mes proches,

A ma famille que j'aime tant, Alain, Colette, Vincent et Antoine,

A Marie qui m'a toujours soutenu et encouragé, même parfois sans le savoir,

A tous mes amis, surtout Pierre, Fanny, Gildas, Kashia, Julien, Vincent et Guillaume, pour leur soutien indéfectible et leur sens aigu de l'amitié

Et aux patients, à qui je promets l'arrivée de nouvelles thérapeutiques efficaces dans un futur proche

ABREVIATIONS

AC : Antilles/Cuba	FM : France métropolitaine
ADC : coefficient apparent de diffusion	GFAP : <i>glial fibrillary acidic protein</i>
AQP4 : aquaporine-4	GFP : <i>green fluorescence protein</i>
BHE : barrière hémato-encéphalique	HLA : antigènes des leucocytes humains
BN : Brown Norway	IFA : adjuvant incomplet de Freund
BOC : bandes oligoclonales	IFI : immunofluorescence indirecte
BT : butyrophiline	Ig : immunoglobuline
CBA : <i>cell based assay</i>	KO : <i>knock-out</i>
CFA : adjuvant complet de Freund	LB : lymphocyte B
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	LCR : liquide céphalo-rachidien
C5b-9 : complément 5b-9	LEW : Lewis
DA : Dark Agouti	LT : lymphocyte T
EAE : encéphalomyélite autoimmune expérimentale	MBP : <i>myelin basic protein</i>
EDSS : <i>expanded disability status scale</i>	MLTE : myélite longitudinale transverse extensive
EAAT2 : transporteur 2 des acides aminés excitateurs	MOG : <i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
ELISA : <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	MPTA : myélite partielle transverse aiguë
FACS : <i>fluorescence-activated cell sorting</i>	NMO : neuromyérite optique
FIPA : fluoro-immunoprecipitation	NMO-IgG : immunoglobuline d'isotype G spécifique de la NMO
	PLP : <i>proteolipid protein</i>
	PNE : polynucléaire éosinophile

RIPA : radio-immunoprecipitation

rMOG : MOG recombinante

SEP : sclérose en plaques

SNC : système nerveux central

TAP : taux annualisé de poussée

Th : T *helper*

WB : *Western blot*

CHAPITRE I. INTRODUCTION	9
A. UN MOT D'HISTOIRE	9
B. CARACTÉRISTIQUES DE LA NMO	10
B.1 UNE PATHOLOGIE BIFOCALÉ PARTICULIÈRE	10
B.2 SPÉCIFICITÉS CLINIQUES	11
B.3 SPÉCIFICITÉS PARACLINIQUES	12
B.4 SPÉCIFICITÉS PHYSIOPATHOLOGIQUES ET IMMUNOLOGIQUES	14
B.5 L'ÉTABLISSEMENT DES CRITÈRES DIAGNOSTIQUES	16
C. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA NMO	18
C.1 STRUCTURE DE L'AQP4	18
C.1.1 Données chez l'humain	18
C.1.2 Données chez l'animal	20
C.2 FONCTIONS DE L'AQP4	20
C.3 DÉTECTION DE L'ANTICORPS ANTI-AQP4	21
C.4 RÔLE DE L'ANTICORPS ANTI-AQP4	25
C.4.1 In vitro	25
C.4.2 In vivo	26
C.5 AUTRE HYPOTHÈSE POUR LE RÔLE DES ANTI-AQP4	27
CHAPITRE II. EPIDEMIOLOGIE DE LA NMO	30
A. ÉPIDÉMIOLOGIE DESCRIPTIVE	30
A.1 DONNÉES GÉNÉRALES DE POPULATION	30
A.2 LES FORMES À DÉBUT PÉDIATRIQUE	33
B. PARTICULARITÉS GÉNÉTIQUES	34
B.1 LE SYSTÈME HLA	34
B.2 LES FORMES OPTICO-MÉDULLAIRES DE SEP AU JAPON	35
C. ANALYSE DU PRONOSTIC	36
C.1 FACTEURS PRÉDICTIONNELS DU HANDICAP	36
C.2 VALEUR PRONOSTIQUE DE L'ANTICORPS ANTI-AQP4	37
C.2.1 Dans la NMO	37
C.2.2 Dans les myélites extensives ou névrites optiques récidivantes	38
CHAPITRE III. LES MODELES ANIMAUX DE DEMYELINISATION OPTICO-MÉDULLAIRE	40
A. LES MODÈLES ANIMAUX DÉMYÉLINISANTS	40
B. L'EAE À TROPISME OPTICO-MÉDULLAIRE	41
B.1 LE RÔLE PRIMORDIAL DE LA MOG	41
B.1.1 Structure et fonction chez l'humain	41
B.1.2 La MOG dans l'EAE	44
B.2 L'ESPÈCE ET LA SOUCHE ANIMALE	46
B.2.1 La souris	46
B.2.2 Le rat	47
B.3 LES MODALITÉS D'IMMUNISATION	49
C. ANALOGIE ENTRE LES MODÈLES MURINS EXISTANTS ET LA NMO CHEZ L'HUMAIN	50
CHAPITRE IV. APPROCHE TRANSLATIONNELLE DE LA NMO	54
A. QUESTIONS POSÉES	54
B. MOYENS DÉVELOPPÉS	54
CHAPITRE V. ARTICLES	56
A. LA NMO EN FRANCE : ÉTUDE MULTICENTRIQUE DE 125 PATIENTS (ARTICLE 1)	56

B. SUIVI À LONG TERME DES PATIENTS AYANT UNE NMO À DÉBUT PÉDIATRIQUE (ARTICLE 2)	64
C. LES FORMES DITES « BÉNIGNES » DE NMO (ARTICLE 3)	70
D. COMMENTAIRES À PROPOS DES TROIS ÉTUDES ISSUES DE L'ANALYSE DE LA COHORTE NATIONALE DE PATIENTS NMO	78
D.1 NOUVELLES DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES ET CLINIQUES EN FRANCE	78
D.2 LA NMO EST UNE MALADIE SÉVÈRE	81
D.3 LE HANDICAP EST PRINCIPALEMENT VISUEL CHEZ L'ENFANT ET MÉDULLAIRE CHEZ L'ADULTE	82
D.4 LE HANDICAP EST LIÉ AUX POUSSÉES DANS LA NMO	83
D.5 LES DIFFÉRENCES ETHNIQUES DANS LA NMO	83
E. ÉTUDE DESCRIPTIVE ET COMPARATIVE DES PATIENTS À HAUT RISQUE DE DÉVELOPPER UNE NMO (ARTICLE 4)	85
F. COMMENTAIRES	91
F.1 LES PATIENTS AVEC UNE MLTE ET DES NMO-IGG ONT DES MYÉLITES SÉVÈRES	91
F.2 FRÉQUENCE DES LÉSIONS CÉRÉBRALES	92
G. LE MODÈLE DE DÉMYÉLINISATION OPTICO-MÉDULLAIRE CHEZ LE RAT BROWN NORWAY : CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE ET CORRÉLATION AVEC LE HANDICAP (ARTICLE 5)	93
H. COMMENTAIRES	127
H.1 ÉTUDE COMPARATIVE AVEC LA NMO CHEZ L'HUMAIN	127
H.2 LIMITES DE L'ÉTUDE	128
H.2.1 La quantification des marquages AQP4 et GFAP	128
H.2.2 Le protocole d'imagerie	130
H.2.3 L'analyse détaillée de la réponse inflammatoire	132
CHAPITRE VI. DISCUSSION GENERALE	134
A. LE PHÉNOTYPE OPTICO-MÉDULLAIRE	134
A.1 RÔLE DE LA MOG	134
A.2 RÔLE DE L'IMMUNITÉ HUMORALE	137
B. LE HANDICAP DANS LA NMO	141
B.1 DE L'HUMAIN À L'ANIMAL	141
B.2 UN ACTEUR DU HANDICAP MÉCONNU : LA BALANCE MICROGLIE/MACROPHAGE	142
CHAPITRE VII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	144
CHAPITRE VIII. REFERENCES	147

CHAPITRE I. INTRODUCTION

A. Un mot d'histoire

En 1870, Sir Thomas Clifford Allbutt reporta, pour la première fois, chez huit patients l'association d'une atteinte médullaire et optique (Allbutt, 1870). Parmi eux, seul un patient était atteint d'une myélite aiguë, suivie, 3 mois plus tard, d'une névrite optique sévère sans récupération nette. Erb publia la cas d'un patient de 52 ans qui développa plusieurs névrites optiques et une myélite subaiguë (Erb, 1879). La récupération fut également incomplète avec d'importantes séquelles visuelles. Seguin regroupa le cas de Erb, celui d'un ophtalmologiste (Noyes, 1880) et un cas personnel de névrite optique et de myélite transverse subaiguë. Il considéra alors que l'association était probablement fortuite. Dreschfeld en 1882 décrivit le premier cas anatomopathologique d'un patient associant névrite optique et myélite en montrant une inflammation marquée dans ces deux structures alors que l'encéphale était totalement normal (Dreschfeld, 1882), ce qui fit dire à Gowers dans son ouvrage de référence : *In rare cases of myelitis, optic neuritis has been observed, without any intracranial complication to cause it. It is probably not the result of the inflammation of the spinal cord, but is an associated and similar lesion, the result cause of the myelitis... most of the cases thus accompanied have been instances of disseminated myelitis... (Gowers, 1888)*

Enfin, en 1894, Eugène Devic documenta cliniquement et anatomopathologiquement un nouveau cas (Devic, 1894) et confia à son étudiant Fernand Gault de regrouper 16 autres cas publiés de patients ayant une névrite optique uni ou bilatérale et une myélite transverse aiguë (Gault, 1895). C'est dans la thèse de Fernand Gault intitulée *De la Neuromyérite Optique aiguë* qu'apparait pour la première fois le terme de

neuromyérite optique (NMO). Il individualise alors ce syndrome en une entité bien distincte : *la concomitance de ces deux lésions myélite et névrite optique forme un complexus symptomatique d'allure spéciale qu'on peut désigner sous le nom de neuromyérite aiguë.*

B. Caractéristiques de la NMO

B.1 Une pathologie bifocale particulière

Les pathologies inflammatoires touchant le nerf optique et la moelle épinière, étiquetées optico-médullaires, sont dominées par deux entités : la sclérose en plaques (SEP) optico-médullaire et la NMO. Toutes deux se définissent comme une maladie inflammatoire et démyélinisante du système nerveux central (SNC), caractérisée par des épisodes de névrite optique et de myélite.

Ces deux pathologies ont été longtemps confondues compte tenu de leur présentation phénotypique similaire, des points communs liés à leur mécanisme inflammatoire et de leur bonne réponse à la corticothérapie. Cependant, depuis une vingtaine d'années, les données cliniques, IRM, immunologiques du liquide céphalo-rachidien (LCR), anatomopathologiques des cas autopsiés ainsi que, très récemment, la découverte d'un anticorps très spécifique de la NMO, ont permis de mieux délimiter les frontières de cette affection qui se différencie en plusieurs points de la SEP. Comme nous allons le voir, ces éléments ont permis d'élaborer des critères diagnostiques en 1999 et 2006 qui ont ensuite servi pour l'inclusion des patients dans les enquêtes épidémiologiques.

B.2 Spécificités cliniques

La NMO est une pathologie classiquement sévère, dont le pronostic est lié à la sévérité des poussées. En effet, les formes d'aggravation progressive sont exceptionnelles et l'évolution est rémittente dans plus de 90% des cas (Wingerchuk et al., 2007). Les poussées sont optiques ou médullaires, pouvant confiner à la cécité ou la tétraplégie et peuvent être mortelles dans 3 à 25% des cas, principalement à cause d'une atteinte de centres cardio-respiratoires du tronc cérébral ou de la moelle épinière cervicale (Cabre et al., 2001; Ghezzi et al., 2004; Papais-Alvarenga et al., 2002; Rivera et al., 2008; Wingerchuk and Weinshenker, 2003). La première névrite optique est suivie d'une acuité visuelle résiduelle ≤ 0.1 chez 30% des patients non-Caucasiens (Merle et al., 2007). Des troubles de la marche sévères sont également observés dans plus de la moitié des cas après 5 ans d'évolution (Wingerchuk and Weinshenker, 2003). A côté de la gravité des poussées, il existe des particularités sémiologiques dans la NMO correspondant à l'atteinte possible du diencephale et du tronc cérébral. Plusieurs cas d'endocrinopathie avec aménorrhée, galactorrhée, diabète insipide, hypothyroïdie ou hyperphagie ont été mis en rapport avec une inflammation aiguë hypothalamo-hypophysaire contemporaine d'une poussée (Petrvacic et al., 2006; Vernant et al., 1997). D'autres cas rapportés font mention d'un hoquet prolongé ou de nausées/vomissements répétés pouvant être en rapport avec une inflammation périaqueducule incluant l'area postrema dans le tronc cérébral et inaugurer la NMO (Apiwattanakul et al., 2010; Misu et al., 2005; Takahashi et al., 2008).

Enfin, les poussées de NMO sont traitées efficacement par de fortes doses de corticoïdes intraveineux ou par plasmaphérèse (Sellner et al., 2010). La NMO est accessible à un traitement de fond immunosuppresseur comme il a été observé avec

l'azathioprine (Mandler et al., 1998), le mycophenolate mofetil (Jacob et al., 2009), le cyclophosphamide (Jarius et al., 2008), la mitoxantrone (Weinstock-Guttman et al., 2006) et le rituximab (Cree et al., 2005), alors que les immunomodulateurs, fréquemment utilisés dans la SEP, semblent inefficaces (Papeix et al., 2007) et peuvent dans certains cas aggraver la pathologie (Palace et al., 2010; Shimizu et al., 2008).

B.3 Spécificités paracliniques

Tout d'abord, des lésions encéphaliques à l'IRM cérébrale ne sont que rarement retrouvées dans les NMO débutantes. Au cours de l'évolution, des anomalies de signal apparaissent dans 60% des cas, mais seulement 10% des patients atteints de NMO remplissent alors les critères diagnostics actuels de SEP (Pittock et al., 2006). Sur l'IRM médullaire, les patients atteints de NMO ont des myélites longitudinales transverses extensives (MLTE), définies par des lésions s'étendant sur au moins trois segments vertébraux, qui ne sont présentes que de façon exceptionnelle dans la SEP (Cabre et al., 2001; de Seze et al., 2002; Papais-Alvarenga et al., 2002; Wingerchuk et al., 1999). L'ensemble des modifications de signal classiquement visibles en IRM est résumé dans la **figure 1**.

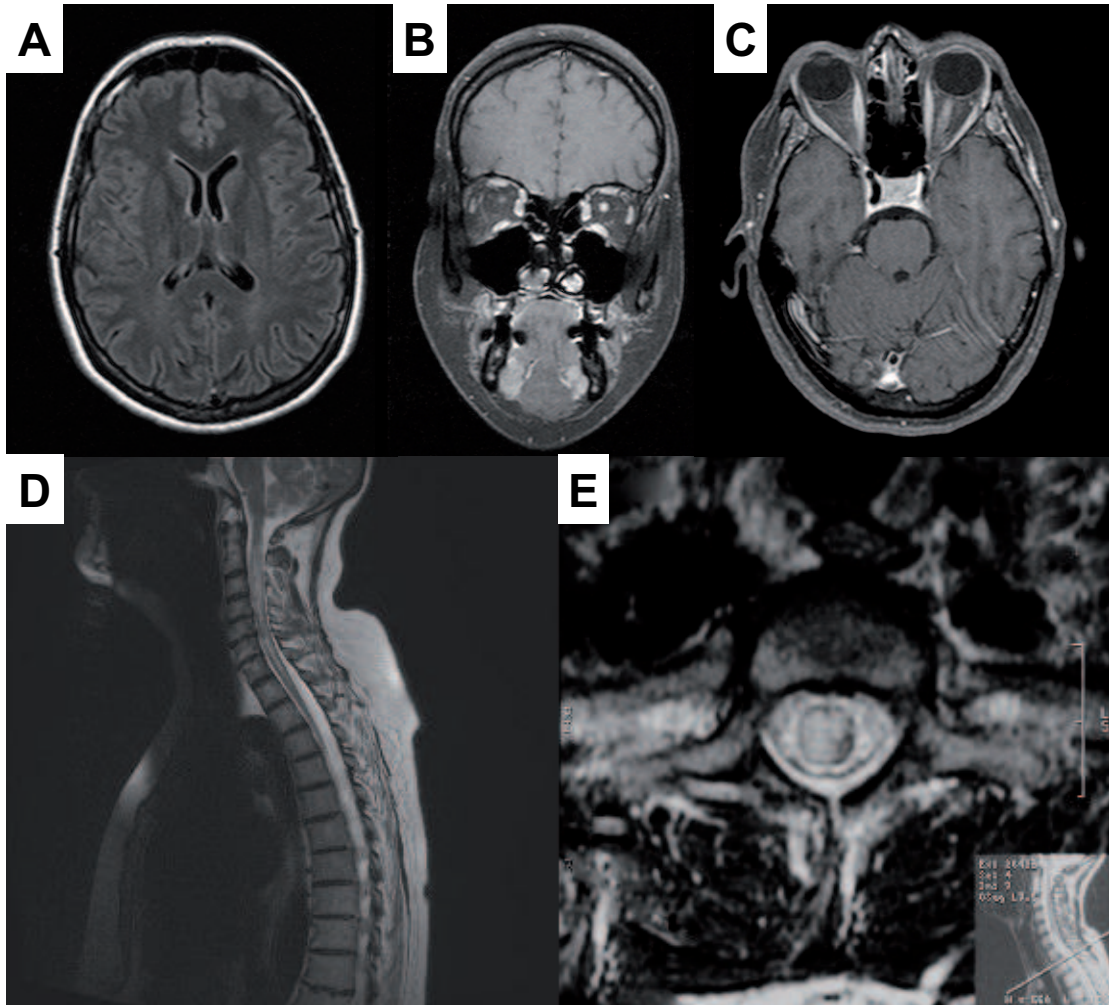


Figure 1. Modifications de signal en IRM de l'encéphale, des nerfs optiques et de la moelle épinière dans la neuromyélie optique (NMO).

Dans la NMO, l'IRM cérébrale est le plus souvent normale (A) à l'exception d'un hypersignal des nerfs optiques retrouvé en séquence T2 ou, comme illustré ici sur le nerf optique gauche, en T1 après injection de gadolinium sur les coupes frontales (B) et transversales (C). La myélite extensive apparaît en hypersignal T2 spontané, s'étendant ici, dans la région cervicale, sur plus de 3 métamères dans le plan longitudinal (D) et occupant plus de la moitié de la coupe dans le plan transversal (E).

L'étude du LCR retrouve parfois une pléiocytose supérieure à $50 \cdot 10^9$ leucocytes/L et des bandes oligoclonales (BOC) dans 15 à 30% des cas. Dans la SEP, une pléiocytose de cet ordre reste exceptionnelle et les BOC sont présentes dans plus de 85% des cas (Bergamaschi et al., 2004). Une hyperéosinophilie peut également être retrouvée de façon spécifique dans le LCR des patients NMO comparativement à la SEP (Correale

and Fiol, 2004) ainsi que des taux de GFAP importants lors des attaques de NMO, soulignant ainsi la présence de lésions astrocytaires (Misu et al., 2009; Petzold et al., 2010). Enfin, la présence d'un anticorps spécifique de la maladie, appelé NMO-IgG, a été également identifié dans le LCR de ces patients même si cette recherche ne s'effectue pas en routine (Bennett et al., 2009).

B.4 Spécificités physiopathologiques et immunologiques

Le mécanisme dysimmunitaire dans la NMO est principalement de type humoral, ce qui lui confère une spécificité au regard des autres pathologies inflammatoires du SNC. Une étude histochimique réalisée sur 9 autopsies de patients NMO et contrôlée par 3 autopsies de patients atteints d'encéphalomyélite aiguë disséminée et 22 autopsies de patients ayant une SEP active, a montré des dépôts d'immunoglobuline (Ig) et de C9néo-antigène dans 100% des cas de NMO et dans 52% des cas de SEP (Lucchinetti et al., 2000; Lucchinetti et al., 2002). La colocalisation des Ig avec le C9néo-antigène, disposés autour des vaisseaux ainsi que la présence d'éosinophiles dans les lésions actives étaient spécifiques de la NMO. La chemokine CCR3 a également été retrouvée dans les lésions. Produite par les éosinophiles, elle permet l'activation des lymphocytes T helper (Th) 2 qui entraînent à leur tour une activation de la réponse humorale (Sallusto et al., 1998).

L'ensemble de ces données fait du lymphocyte B (LB) un élément central de la réaction immunitaire dans cette pathologie. Dans cette optique, chez 1 à 16% des patients selon les études, est rapportée l'association d'un phénotype NMO avec d'autres maladies dysimmunitaires comprenant le lupus érythémateux disséminé, le syndrome de Gougerot-Sjögren, la myasthénie, les dysthyroïdies et les contextes paranéoplasiques (McKeon et al., 2009; McKeon et al., 2008; Pittock and Lennon,

2008; Pittock et al., 2008). Un autre témoin de l'activation lymphocytaire B dans la NMO est la découverte d'une Ig très spécifique appelée NMO-IgG. Cet anticorps est retrouvé dans les dépôts périvasculaires mentionnés précédemment et est alors d'isotype IgM. Dans le sérum des patients NMO cet anticorps, d'isotype IgG1, a été identifié au sein d'une cohorte de 45 patients NMO et 22 patients SEP, avec une sensibilité de 73% et une spécificité de 91% (Lennon et al., 2004), faisant de sa détection un élément important du diagnostic. Cet anticorps a pour cible le principal canal hydrique du SNC, l'aquaporine-4 (AQP4), qui se situe principalement sur les pieds astrocytaires jalonnant la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Lennon et al., 2005).

L'étude neuropathologique des marqueurs astrocytaires comme l'AQP4 ou la *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) a révélé une baisse précoce de leur immunoréactivité dans les nerfs optiques et la moelle épinière, pouvant précéder l'atteinte de la myéline dans les lésions inflammatoires aiguës (Misu et al., 2007; Nakamura et al., 2008; Roemer et al., 2007; Sinclair et al., 2007). Dans ces lésions, il n'a pas été observé de diminution de l'expression de la GFAP avant celle de l'AQP4, pouvant là suggérer une implication précoce et spécifique de l'AQP4. Ce double marquage réapparaît ensuite dans les lésions chroniques, actives ou non, et semble là aussi précéder la réapparition des marqueurs myéliniques (Misu et al., 2007). A ce stade de nos connaissances, l'évolution des marqueurs astrocytaires dans la SEP est différente car bien corrélée au degré de démyélinisation, ils sont notamment absents des régions inflammatoires fortement démyélinisées et suivent la remyélinisation dans les lésions chroniques.

B.5 L'établissement des critères diagnostiques

L'ensemble de ces données souligne les nombreuses différences entre la NMO et la SEP. C'est dans la population asiatique qu'apparaissent les premiers critères de NMO. La NMO est alors assimilée à une forme optico-médullaire de SEP, et se caractérise par des lésions démyélinisantes récidivantes, confinées au nerf optique et à la moelle épinière, parfois au tronc cérébral (Kira et al., 1996). Ces critères d'inclusion larges ont permis d'identifier les premiers cas de NMO dans cette population mais incluaient probablement certaines SEP débutant avec un tropisme optico-médullaire et étaient donc insuffisants. En 1999 émergent de nouveaux critères diagnostiques aux États-Unis. A la topographie habituelle des lésions, viennent s'ajouter des critères majeurs prenant en compte l'atteinte médullaire étendue, la pléïocytose dans le LCR et l'absence de lésions encéphaliques à l'IRM (Wingerchuk et al., 1999). Malgré leur utilité certaine dans les études épidémiologiques ultérieures, ces critères comportaient plusieurs imperfections, notamment le manque de sensibilité ne permettait pas d'inclure les patients ayant des lésions à l'IRM cérébrale et le manque de spécificité conduisait à inclure les patients SEP ayant un tropisme optico-médullaire. La révision de ces critères en 2006 permit de gagner en sensibilité (passant de 87 à 99%) et en spécificité (passant de 85 à 90%) en intégrant d'une part les patients ayant des lésions à l'IRM cérébrale n'évoquant pas une SEP, et d'autre part, ceux ayant des anticorps NMO-IgG (Wingerchuk et al., 2006). Enfin, une dernière proposition de critères a été formulée en 2008 par un consortium d'expert international (Miller et al., 2008). Ces critères insistent sur l'importance de la MLTE qui est obligatoire et doit être observée au moment d'une poussée. Ils excluent les maladies de systèmes susceptibles de donner un phénotype NMO (**tableau 1**).

Kira 1996	Wingerchuk 1999	Wingerchuk 2006	NMISS 2008
<i>Tous les critères</i>	<i>Tous les critères absolus et au moins un critère majeur ou deux critères mineurs</i>	<i>Tous les critères absolus et au moins deux autres critères</i>	<i>Tous les critères absolus et au moins un des deux autres critères</i>
1. Lésions confinées au nerf optique et à la moelle épinière	Critères absolus : 1. Névrite optique 2. Myélite aiguë	Critères absolus : 1. Névrite optique 2. Myélite aiguë	Critères absolus : 1. Névrite optique 2. Myélite aiguë étendue sur au moins 3 métamères vertébraux sur une IRM faite pendant l'épisode
2. Pas de lésions cérébrales ou cérébelleuses	3. Pas de symptômes impliquant d'autres régions du SNC	Critères relatifs : 1. Lésion médullaire étendue sur au moins 3 métamères vertébraux	3. Pas d'argument pour une sarcoïdose, un SGS, un LES ou une autre explication à ce syndrome
3. Possible atteinte mineure du tronc cérébral	Critères majeurs : 1. IRM cérébrale initiale normale ou ne remplissant pas les critères de SEP	2. IRM cérébrale initiale ne remplissant pas les critères de SEP	Critères relatifs : 1. IRM cérébrale ne remplissant pas les critères de SEP selon Barkhof pouvant inclure des lésions: • Aspécifiques • De la partie dorsale du bulbe • Du Tronc cérébral ou de l'hypothalamus • Linéaires pétriventriculaires ou du corps calleux
4. Au moins deux attaques hypersignaux T2 s'étendant sur au moins 3 segments vertébraux	2. IRM médullaire retrouvant des hypersignaux T2 s'étendant sur au moins 3 segments vertébraux	3. Présence d'NMO-IgG	2. Présence d'NMO-IgG
3. LCR ≥ 50 GB/mm ³ ou ≥ 5 PNE/mm ³	Critères mineurs : 1. Névrite optique bilatérale 2. Séquelle visuelle sévère à au moins un œil (acuité visuelle $\leq 20/200$) 3. Déficit moteur sévère après une attaque à au moins un membre (MRC ≤ 2)		

Tableau 1. Critères diagnostiques utilisés dans la NMO.

PNE : polynucléaires éosinophiles; MRC : medical research council; SGS : syndrome de Gougerot Sjögren; LES : lupus érythémateux systémique.

C. Physiopathologie de la NMO

C.1 Structure de l'AQP4

C.1.1 Données chez l'humain

L'AQP4 appartient à la famille des aquaporines qui sont des protéines transmembranaires assurant exclusivement le passage de l'eau du secteur extracellulaire dans le milieu intracellulaire. Malgré sa répartition ubiquitaire (trachée, estomac, rein, muscle, poumon), l'AQP4 se distingue des autres aquaporines par son tropisme particulier pour le SNC (cervelet, gyrus dentelé hippocampique, noyaux supra-optiques et paraventriculaires) et la rétine.

Le gène de l'AQP4 humaine est situé sur le chromosome 18 et code pour deux principales isoformes protéiques de 32 kDa (AQP4-M1), si le cadre de lecture débute à l'exon 0, et 30 kDa (AQP4-M23) si celui-ci débute à l'exon 1 (Lu et al., 1996). Chaque monomère, composé de 323 acides aminés (AQP4-M1) ou de 301 acides aminés (AQP4-M23), comporte deux domaines ayant chacun trois hélices α transmembranaires (**figure 2A**). Ces hélices sont reliées entre elles par des boucles dont deux contiennent un motif NPA (asparagine-proline-alanine), directement impliqués dans la conformation canalaire de la protéine permettant une filtration sélective de l'eau (Hiroaki et al., 2006). Les monomères sont assemblés pour former un hétéro-tétramère composé en nombre variable d'isoformes AQP4-M1 ou AQP4-M23, enchâssé dans la membrane cytoplasmique. Chaque tétramère peut se lier aux autres en formant des *square arrays*, correspondant à un réseau en maille à la surface des cellules, d'autant plus étendu qu'il contient la forme AQP4-M23 (Crane and Verkman, 2009). C'est donc au sein de ce réseau que l'AQP4 acquière sa structure

tridimensionnelle définitive et expose ainsi plusieurs épitopes conformationnels (figure 2B).

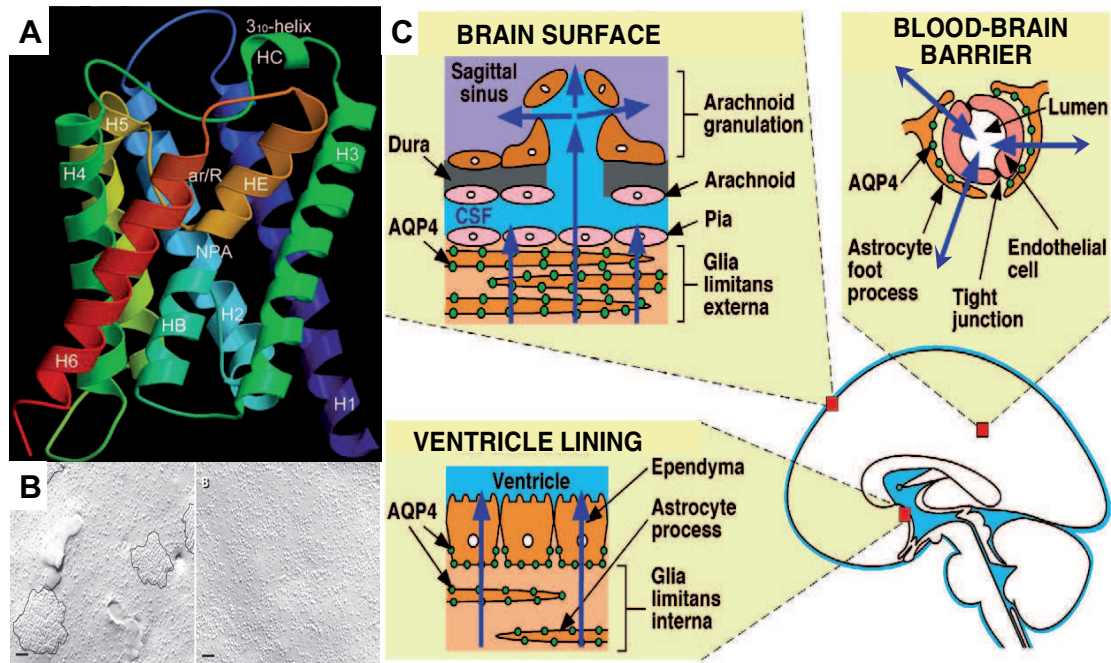


Figure 2. Structure et localisation de l'aquaporine-4 (AQP4).

A. L'AQP4 est composée de 4 monomères composés chacun de 6 hélices transmembranaires (H1-H6), 2 hélices impliquées dans la formation du pore noté ar/R (HB pour la boucle B et HE pour la boucle E), une hélice comprise dans la boucle C. La courte hélice 3₁₀ est impliquée dans la jonction des différents monomères. NPA correspond à la séquence Asn-Pro-Ala, hautement conservée parmi les aquaporines et impliquée dans les interactions électrostatiques permettant la conduction des protons dans le pore (Hiroaki et al., 2006).

B. L'étude en microscopie électronique a montré par cryofracture, sur des coupes de cellules transfectées avec de l'AQP4, des square arrays avec l'AQP4-M23 (image de gauche, les square arrays sont délimités en noir) et l'absence de ces dernières avec l'AQP4-M1 (image de droite) (Silberstein et al., 2004).

C. La répartition de l'AQP4 (en vert) est retrouvée aux différentes interfaces liquidiennes dans l'encéphale. L'AQP4 participe en leur sein à la diffusion de l'eau (flèches bleues) (Verkman, 2005).

C.1.2 Données chez l'animal

L'AQP4 comprend plusieurs isoformes chez le rat (AQP4a,b,c,d,e,f) (Moe et al., 2008). Parmi elles, les isoformes AQP4b,d,f sont de localisation intracellulaire. L'isoforme AQP4e appelée aussi AQP4-Mz, présente un nouveau domaine N-terminal et est incapable de former des *square arrays* ni de fixer l'anticorps NMO-IgG (Rossi et al., 2011). Par ailleurs, cette isoforme n'est pas exprimée dans le cerveau humain et peu chez le rat. Les isoformes AQP4a et AQP4c correspondent respectivement aux isoformes AQP4-M1 et AQP4-M23 retrouvées chez l'humain. Celles-ci présentent une forte analogie avec les séquences humaines AQP4-M1 (94% d'homologie) et AQP4-M23 (96% d'homologie) (Moe et al., 2008).

C.2 Fonctions de l'AQP4

L'AQP4 est distribuée tout le long de la membrane astrocytaire mais prédomine à l'extrémité de ses prolongements. On la retrouve également en nombre moins important sur les cellules endothéliales et épendymaires. On ne la retrouve pas sur les neurones ni sur les oligodendrocytes (Nagelhus et al., 1998; Nielsen et al., 1997). Sa répartition dans l'encéphale illustre son rôle central dans le échanges hydriques aux différentes interfaces entre le sang, le LCR et le parenchyme cérébral (**figure 2C**).

L'AQP4 est impliquée dans plusieurs fonctions physiologiques :

1. L'homéostasie hydrique. L'AQP4 assure principalement le passage de l'eau à travers la membrane astrocytaire grâce à un gradient de pression osmotique. La modification de l'expression de l'AQP4 a été étudiée lors des oedèmes vasogéniques et cytotoxiques. L'oedème vasogénique entraîne une baisse de synthèse de l'AQP4 alors que l'oedème cytotoxique a tendance à augmenter son expression membranaire (Ke et al., 2001). L'oedème cérébral osmotique est nettement diminué si les souris

sont knock-out (KO) pour l'AQP4 par rapport aux souris sauvages (Thiagarajah et al., 2005). Enfin, à la phase aiguë de l'ischémie cérébrale constituée, son inhibition permet une diminution de l'oedème cérébral cytotoxique (Manley et al., 2004).

2. La transduction du signal neuronal. L'activité neuronale est caractérisée par une dépolarisation des neurones et des cellules gliales adjacentes. Elle se manifeste par une augmentation du glutamate et du potassium extracellulaires qui peuvent synchroniser l'activité neuronale et activer le métabolisme des cellules gliales. Des modèles animaux ont montré qu'une délétion en AQP4 abaissait le seuil épileptogène et majorait l'intensité ainsi que la durée des crises (Binder et al., 2004; Manley et al., 2004). Ces phénomènes pourraient être en rapport avec une diminution de la clairance du potassium mais également du glutamate. En effet, l'analyse des cultures d'astrocytes de souris KO pour l'AQP4 a identifié une diminution de l'expression membranaire du transporteur au glutamate GLT-1, équivalent du transporteur d'acide aminé excitateur Na⁺-dépendant de type 2 (EAAT2) humain, à l'origine d'une augmentation du taux de glutamate extracellulaire (Zeng et al., 2007).

3. La cicatrice gliale. Les mécanismes de cicatrisation cérébrale impliquent la prolifération, l'adhésion puis la migration astrocytaire. Le déficit en AQP4 entraîne un retard important de cicatrisation. En effet, l'étude du néocortex de rats cérébro-lésés, déficients en AQP4, montre un défaut de migration astrocytaire alors que leur adhésion et leur prolifération sont préservées (Saadoun et al., 2005).

C.3 Détection de l'anticorps anti-AQP4

La découverte des anticorps NMO-IgG dans le sang et le LCR des patients et de leur cible, l'AQP4, le principal canal hydrique du SNC, fait de la NMO la première pathologie démyélinisante du SNC avec un auto-anticorps spécifique constituant un

marqueur de la maladie. Sa mise en évidence a été réalisée selon différentes approches reposant en immunohistochimie sur la colocalisation du signal obtenu avec les anticorps NMO-IgG et les anticorps de lapin anti-AQP4, l'absence de signal des tissus de souris KO pour l'AQP4 en présence de NMO-IgG, la fixation de cet anticorps sur les membranes cytoplasmiques de cellules HEK-293 (rein humain) transfectées avec un plasmide GFP-AQP4 (*green fluorescent protein-AQP4*), ainsi que par immunoprécipitation et Western Blot (WB) retrouvant le poids moléculaire de l'AQP4 (Lennon et al., 2005).

Les tests de détection actuels utilisent la technique initiale de Lennon et collaborateurs en immunofluorescence indirecte (IFI) (Lennon et al., 2004). Le sérum des patients est déposé sur des coupes de cervelet de souris et le marquage est révélé par un anticorps secondaire couplé à une molécule fluorescente. L'AQP4 étant présent à la jonction entre le sang et le parenchyme cérébral, la localisation périvasculaire de la fluorescence permet ainsi de suspecter la présence d'anti-AQP4 dans le sérum des patients. Une seconde technique consiste à transfecter des cellules HEK avec un plasmide GFP-AQP4. Ce test cellulaire, appelé *cell based assay* (CBA), montre la fixation des NMO-IgG sur la membrane de ces cellules et pas sur des cellules témoins non transfectées (Marignier et al., 2008).

Les résultats sont d'autant meilleurs que les cellules sont transfectées avec l'isoforme AQP4-M23, capable de former des tétramères assemblés en réseau ou *square arrays* à leur surface, alors que l'isoforme AQP4-M1 n'en est pas capable (Nicchia et al., 2009). Cette donnée suggère que le NMO-IgG reconnaît principalement un antigène conformationnel formé par la structure tridimensionnelle de l'AQP4 en réseau (Pisani et al., 2011; Tani et al., 2009).

Une étude récente a montré une gradation dans la sensibilité et la spécificité de ces différents tests. En effet, la sensibilité et la spécificité du CBA avec l'AQP4-M23 sont supérieures au CBA avec la forme AQP4-M1 (Crane et al., 2011; Mader et al., 2010), qui elles mêmes sont meilleures que celles du test en IFI sur cervelet de souris (Waters and Vincent, 2008).

D'autres tests ont été mis au point par radio-immunoprecipitation (RIPA), fluoro-immunoprecipitation (FIPA), ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), WB ou cytométrie de flux par FACS (*fluorescence-activated cell sorting*). La description de ces tests est résumée dans le **tableau 2**. Leur comparaison confirme les imperfections du test en IFI, pouvant signaler des faux positifs dans 10% des cas et des faux négatifs dans 10 à 50% (Waters and Vincent, 2008). Par conséquent, dès que cela est possible, la détection des anticorps anti-AQP4 devra être réalisée par CBA, ce qui implique d'adresser le sérum des patients à des centres de référence spécialisés dans la réalisation et la lecture du test.

Tests	Substrats	Sensibilité	Spécificité	Avantages	Inconvénients
1. Tissulaires et cellulaires					
• IFI	Coupes de cerveau de souris, rat, singe	38-87%	90-100%	Répandu, permet la détection d'autres anticorps	Semi-quantitatif, opérateur dépendant, peu sensible
• CBA	Cellules HEK transfectées avec AQP4	42-91%	94-100%	Reproductible, meilleure sensibilité surtout avec AQP4-M23	Semi-quantitatif, opérateur dépendant
• FACS	Cellules HEK transfectées avec AQP4	88%	ND	Quantitatif, indépendant de l'observateur	Peu répandu, technique sophistiquée, pas d'analyse qualitative
2. Lysats cellulaires ou protéines purifiées					
• RIPA	AQP4 marquée avec ³⁵ S-méthionine	57%	98%	Quantitatif, indépendant de l'observateur	Peu répandu, technique sophistiquée, pas d'analyse qualitative
• FIPA	AQP4 marquée avec une protéine fluorescente	78%	100%	Quantitatif, indépendant de l'observateur	Peu répandu, technique sophistiquée, pas d'analyse qualitative
• WB	AQP4-M1	81%	97%	Reproductible, facile à utiliser	Non quantitatif, opérateur dépendant
• ELISA	AQP4 de rat purifiée	67%	87%	Quantitatif, indépendant de l'observateur, facile à utiliser	Discordance avec l'IFI, en développement

Tableau 2. Tests développés pour la détection des anticorps anti-AQP4, modifié d'après (Jarius and Wildemann, 2010).

IFI : immunofluorescence indirecte ; CBA : cell based assay ; RIPA : radio-immunoprecipitation ; FIPA : fluoro-immunoprecipitation ; ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay ; WB : western blot ; FACS : fluorescence-activated cell sorting ; ND : non déterminé.

C.4 Rôle de l'anticorps anti-AQP4

C.4.1 In vitro

Dans un modèle de BHE en culture, l'ajout dans le milieu de NMO-IgG produit une internalisation de l'AQP4 ainsi qu'une redistribution de l'AQP4 au dépens des pieds astrocytaires (Vincent et al., 2008). L'ensemble de ces phénomènes est cependant transitoire et il est observé une restitution de l'expression de l'AQP4 sur les pieds astrocytaires 12 heures après retrait du NMO-IgG. L'étude des cellules transfectées avec de l'AQP4, en présence de NMO-IgG seul, a montré une translocation de l'AQP4 dans les endosomes précoces de type 1 (Hinson et al., 2007). L'étude de la réaction immunitaire dans ce modèle cellulaire montre une internalisation de l'AQP4 en l'absence de complément et une lyse astrocytaire en sa présence. De plus, dans le modèle de culture de BHE, le NMO-IgG induit une dégranulation des cellules *natural killer* et une mort astrocytaire anticorps-dépendante associée à un afflux de granulocytes à travers la BHE aidée par le complément. Deux autres études in vitro ont montré une augmentation du glutamate extracellulaire associée pour la première à une diminution de l'expression de l'EAAT2 sur les astrocytes et pour la seconde à une diminution de l'activité astrocytaire de la glutamine synthase et à une toxicité oligodendrogliale (Hinson et al., 2008; Marignier et al., 2010).

Par conséquent, ces données montrent que le NMO-IgG a une action directe *in vitro* sur les astrocytes en induisant tout d'abord une internalisation de l'AQP4, suivie par un dysfonctionnement du cycle glutamatergique et une lyse astrocytaire en présence de complément. Dans ces modèles, la mort des oligodendrocytes et la démyélinisation qui s'en suit est secondaire, liée en partie à la toxicité du glutamate extracellulaire en excès.

Si ces modèles apportent une explication séduisante au rôle des NMO-IgG, il faut cependant souligner leur imperfections. D'une part, les oligodendrocytes murins utilisés pour ces cultures sont plus sensibles à la toxicité du glutamate que les oligodendrocytes humains (Wosik et al., 2004), et d'autre part, le complément est nécessaire dans le modèle de Hinson et collaborateurs, mais ne l'est pas dans le modèle de Marignier et collaborateurs, posant ainsi la question de son rôle précis. Par ailleurs le C5b-9, complexe membranaire terminal de l'activation du complément, est connu pour avoir une double action en favorisant la démyélinisation mais également en protégeant les oligodendrocytes de l'apoptose *in vitro* et *in vivo* (Rus et al., 2006).

C.4.2 In vivo

Des expériences avec un transfert passif de NMO-IgG dans des modèles de rat au cours d'une d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) ont permis de montrer que cet anticorps a une action toxique sur les astrocytes *in vivo* (Bennett et al., 2009; Bradl et al., 2009; Kinoshita et al., 2009). L'histopathologie de ces rats a montré une perte d'expression d'AQP4 et de GFAP prédominant dans la moelle épinière, les nerfs optiques, l'hypothalamus et le plancher du 4^{ème} ventricule ainsi qu'un dépôt d'Ig et de C5b-9 touchant les régions périvasculaires, leptoméningées et la substance grise de façon diffuse. Quelques astrocytes ballonnés ont également été observés en périphérie des lésions, suggérant une souffrance astrocytaire. Cette perte d'expression survenait uniquement si une inflammation locale faite de lymphocytes était au préalable présente, et pas si seule la BHE était altérée. Aucune de ces lésions n'a été observée après injection, selon le même protocole, d'Ig de patients séronégatifs pour le NMO-IgG. (Bradl et al., 2009). De plus, l'injection de NMO-IgG en l'absence de complément ne déclenchait pas la maladie. Le rôle du complément s'est confirmé lors d'une étude consistant en l'injection intracérébrale de NMO-IgG

avec ou sans complément chez une souris sauvage ou KO pour l'AQP4 (Saadoun et al., 2010). La seule configuration qui occasionnait des lésions de type NMO (dépôt de complément et d'Ig périvasculaires, inflammation/démyélinisation et perte de l'expression de l'AQP4 et de la GFAP) était l'injection de NMO-IgG avec du complément d'origine humaine. Chez les souris KO pour l'AQP4, ou chez les souris injectée avec un inhibiteur du complément (C1 inhibiteur), ces lésions n'étaient pas observées. L'absence de lymphocyte T (LT) chez des souris nude dénuées de thymus ne permettait pas de prévenir l'apparition des lésions, suggérant que les LT n'étaient pas indispensables pour la formation des lésions de type NMO dans ce modèle expérimental (Saadoun et al., 2011).

Par conséquent, l'étude des lésions à différents moments après l'injection de NMO-IgG a permis de tracer une cinétique d'apparition des lésions :

1. diminution de l'expression de l'AQP4/GFAP avec un oedème astrocytaire traduisant une souffrance astrocytaire ;
2. début de démyélinisation en présence de complément ;
3. inflammation et extension des zones démyélinisées ;
4. lésions axonales et mort neuronale.

Ces données rejoignent les données *in vitro* montrant que la mort oligodendrocytaire peut être secondaire aux lésions astrocytaires générées par le NMO-IgG. D'autre part, l'action du complément dans la cascade inflammatoire semble se préciser en montrant qu'il est nécessaire à l'apparition de la démyélinisation et du handicap.

C.5 Autre hypothèse pour le rôle des anti-AQP4

Alors que le rôle de l'anticorps anti-AQP4 semble majeur dans la genèse des lésions astrocytaires dans la NMO, plusieurs éléments laissent à penser qu'il n'est

probablement pas à l'origine du mécanisme inflammatoire dans la NMO. D'une part, l'AQP4 est présente dans de nombreuses structures autres que le SNC. Dans ces tissus (rétine, rein, estomac, muscle, poumon...), aucune lésion ni dépôt d'anticorps n'est retrouvé. Par ailleurs, sur ces tissus fixés, le NMO-IgG reconnaît l'AQP4. Deuxièmement, cet anticorps n'est pas retrouvé chez tous les patients, avec notamment 30 à 50% de séronégatifs selon les études. Troisièmement, dans les lésions anatomopathologiques de NMO, les anticorps retrouvés dans les régions périvasculaires sont principalement d'isotype IgM alors que le NMO-IgG est une IgG1. Des dépôts d'IgG ne sont retrouvés qu'en faible quantité dans les lésions et les IgM sériques existent mais à des titres faibles, avec moins de sensibilité et spécificité. Enfin, comme nous l'avons vu plus haut, une EAE avec inflammation lymphocytaire T est nécessaire pour que le NMO-IgG crée des lésions astrocytaires.

Par conséquent, face au rôle supposé des anticorps anti-AQP4, l'hypothèse d'une réaction inflammatoire première contre les antigènes de la myéline est une alternative intéressante. Elle pourrait entraîner par contamination épitopique une réaction immunitaire secondaire contre les astrocytes et générer ainsi des anticorps anti-AQP4. Notamment, de nombreuses études suggèrent un rôle majeur des Th17, population cellulaire distincte des Th1 et Th2, dans la SEP, la NMO et plusieurs modèles d'EAE. Ils sont capables d'induire une rupture de la BHE, une apoptose oligodendrocytaire par stress oxydatif et une hypoxie neuronale (Zepp et al., 2011). Dans le sang, les patients avec une démyélinisation optico-médullaire ont un taux important de Th1, de LT cytotoxique et de Th17 qui pourraient jouer un rôle important en initiant la rupture de la BHE et l'inflammation (Ochi et al., 2001). Les Th17 secrètent de l'IL-17 qui est retrouvée en quantité importante dans le LCR de ces patients où sa présence est corrélée positivement, en association avec une élévation

de l'IL-8, à la taille de la myélite (Ishizu et al., 2005). D'autres molécules inflammatoires comme l'IFN- γ , le G-CSF et le VEGF étaient aussi élevées, quel que soit le taux d'anticorps NMO-IgG chez les patients (Su et al., 2006; Weaver et al., 2007). On peut ainsi suggérer que le niveau d'expression élevé d'IL-17 dans le LCR des patients NMO entraîne une expression locale d'IL-8 et de G-CSF qui en retour recrute et active les granulocytes, représentant les principales cellules infiltrantes des lésions de NMO (Axtell et al., 2011).

Au total, après une inflammation première contre la myéline, les nombreux anticorps générés pourraient modifier les caractéristiques physiopathologiques de la réaction inflammatoire initiale. Dans un tel scénario, la NMO représenterait une extrémité du spectre de la SEP.

CHAPITRE II. EPIDEMIOLOGIE DE LA NMO

A. Épidémiologie descriptive

A.1 Données générales de population

Compte tenu de la grande rareté de la NMO et de son démembrement récent, il n'existe à ce jour que peu de cohortes utilisées dans les études épidémiologiques. On distingue parmi elles, les études utilisant les critères de Kira, Wingerchuck 1999 ou 2006, les études de population, susceptibles de donner des chiffres de prévalence et d'incidence, et les études de plus de 30 patients, dont la puissance permet de tirer des conclusions statistiques (**tableau 3**).

Cohortes	Pays	Étude de population	Effectif	Ethnie dominante	Critères
(Kuroiwa et al., 1975)	Japon	Oui	82	Asiatique	Kira
(O'Riordan et al., 1996)	Angleterre	Non	12	Caucasienne	Kira
(Papais-Alvarenga et al., 2002)	Brésil	Non	24	Afro-brésilienne	Kira
(Wingerchuk and Weinshenker, 2003)	USA	Non	80	ND	1999
(Ghezzi et al., 2004)	Italie	Non	46	Caucasienne	1999
(Rivera et al., 2008)	Mexique	Non	34	Hispanique	1999
(Bichuetti et al., 2009)	Brésil	Non	41	Afro-brésilienne	2006
(Cabrera-Gomez et al., 2009)	Cuba	Oui	58	Caucasienne	1999
(Cabre et al., 2009a)	Cuba et Antilles françaises	Oui	96	Antillaise et Afro-cubaine	1999 ou 2006
(Sahraian et al., 2010)	Iran	Non	44	Caucasienne	2006
(Wang et al., 2011)	Taïwan	Non	34	Asiatique	1999

Tableau 3. Caractéristiques des études épidémiologiques sur la NMO.

ND : non déterminé.

Ces études ont montré que, chez les patients non caucasiens (africains, asiatiques, hispaniques, antillais) atteints de SEP, existait une surreprésentation des localisations optico-médullaires. Ainsi, au Nigeria ont été observés en 12 ans, 95 cas de NMO pour un bassin de 1 million d'habitants (Osuntokun, 1971), alors que la SEP conventionnelle a été identifiée seulement chez deux patients. Au Japon, cette topographie lésionnelle est retrouvée chez 9 à 16% des patients suspects de SEP (Kuroiwa et al., 1975), permettant d'estimer la prévalence de la NMO à environ 1.37/100 000 habitants (Kira, 2003). La prévalence de 4.2/100 000 habitants récemment observée aux Antilles françaises pour la NMO est la plus forte jamais rapportée avec une incidence de 0.2/100 000 habitants, soit un ratio NMO:SEP de 1:7 (Cabre et al., 2009b). A Cuba, cette prévalence est évaluée à 0.52/100 000 habitants et son incidence à 0.053/100 000 habitants, soit un rapport NMO:SEP de 1:29 (Cabrera-Gomez et al., 2009). Dans la population antillaise et cubaine, l'efficacité des traitements immunosuppresseurs semble pouvoir expliquer l'augmentation de la prévalence alors que le taux d'incidence est stable depuis une dizaine d'années. Dans cette population, la prévalence de la NMO est supérieure, quelle que soit la tranche d'âge considérée, dans la population afro-cubaine par rapport à la population hispano-cubaine, témoignant ainsi d'une susceptibilité des populations d'ascendance africaine à la NMO. Cette donnée est également retrouvée dans d'autres études (Mirsattari et al., 2001; Osuntokun, 1971; Phillips et al., 1998).

L'enseignement issu de l'analyse des principales cohortes de patients caucasiens et non-caucasiens est résumé dans le **tableau 4**.

Caractéristiques des patients inclus	Cohorte	Cohorte	Cohorte
	Americaine	Italienne	Antillaise/Cubaine
	2003	2004	2009
Critères diagnostiques	1999	1999	1999/2006/Autopsies
Nombre de patients	80	46	96
Durée moyenne du suivi, an	7.6	8.8	9.5
Médiane des âges au début, an	38	35	29.5
Ratio Femmes/Hommes	2.5/1	4.1/1	11/1
MAI, %	25	22	8
Topographie initiale, %			
Médullaire	-	39.1	-
Optique	-	56.6	-
Médullaire et optique	12.5	4.3	-
Délai séparant les deux premières poussées, m (moy/méd)	-/-	17/-	27.6/11.5
Délai optico-médullaire,[#] m (moy/méd)	-	-	34.8/24
Médianes EDSS, an			
3	-	0,5	-
6	-	7	8
8	-	-	22
Nombre de décès, n (%)	18 (22.5)	6 (13)	24 (25)
Taux médian de rechute annuelle par patient	-	1.3	0.7
NMO-IgG, %	-	-	32
BOC dans le LCR, %	-	34.1	-

Tableau 4. Caractéristiques cliniques des patients NMO issus des trois principales cohortes existantes.

Moy : moyenne; Méd : médiane; MAI : maladie auto-immune; BOC : bandes oligoclonales; LCR : liquide céphalo-rachidien; [#] : délai séparant la première poussée optique et médullaire, quel qu'en soit l'ordre.

Plus les critères d'inclusion sont récents, plus le nombre de patients inclus est élevé, et plus les données sont exploitables. La comparaison des données issues de ce tableau suggère une possible différence ethnique dans l'expression de la NMO avec, chez les non-caucasiens, des formes principalement féminines, débutant plus jeunes et moins souvent associées à d'autres pathologies auto-immunes. Par ailleurs,

plusieurs données suggèrent également que les patients d'ascendance africaine ont une pathologie plus sévère que les patients caucasiens, comme en témoigne le taux élevé de mortalité de 25% chez les patients antillais ou cubains (Cabre et al., 2009a). Au Brésil, une cohorte de 24 patients inclus selon les critères japonais de Kira et comparant 10 caucasiens et 14 afro-américains a montré dans ce dernier groupe des poussées plus sévères suivies d'un handicap plus important (Papais-Alvarenga et al., 2002). Les mêmes constatations ont été faites à Cuba lors d'une analyse en sous-groupes : les patients d'ascendance africaine faisaient plus de poussées, laissant un handicap moteur plus important (Cabrera-Gomez et al., 2009).

A.2 Les formes à début pédiatrique

Les études sur les formes à début pédiatrique, c'est-à-dire débutant avant 18 ans, sont rares. Les résultats préliminaires de deux études nationales en cours confirment la prévalence basse de cette pathologie, représentant 3.2 % des enfants canadiens et 8.5 % des enfants argentins atteints de pathologie inflammatoire du SNC. A part quelques cas reportés, seulement deux études rétrospectives ont contribué à l'étude épidémiologique, clinique et paraclinique de ces enfants ayant une NMO : une à propos de 17 enfants remplissant les critères de 1999 suivis pendant 3 ans (Banwell et al., 2008) et une seconde incluant neuf enfants remplissant les critères de 2006 et suivis pendant 4 ans (Lotze et al., 2008). La NMO chez l'enfant se caractérisait par une atteinte cérébrale fréquente, s'exprimant cliniquement par une encéphalopathie, des crises, une aphasie ou une hémiparésie ainsi que des lésions cérébrales initiales diffuses ressemblant à celles observées dans la SEP, parfois d'allure pseudotumorale (Banwell et al., 2008; Lotze et al., 2008). Dans ces deux études, la NMO avait une prédominance féminine, un âge médian de début entre 11 et 14 ans, avec des

extrêmes allant de 1.9 à 16 ans. Tous les enfants avaient une MLTE, alors que les NMO-IgG étaient présents dans 78% des formes rémittentes mais seulement dans 12.5% des formes monophasiques. Dans ces études, le profil de ces enfants était donc semblable à celui des adultes, avec néanmoins un handicap moins important, compris entre un score de handicap évalué par l'*Expanded Disability Status Scale* (EDSS) (Kurtzke, 1983) de 2.5 à 3 en moyenne au terme du suivi.

B. Particularités génétiques

B.1 Le système HLA

Les antigènes des leucocytes humains (HLA) sont des molécules à la surface des cellules qui permettent l'identification par le système immunitaire. Ces protéines sont nommées « molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ». La première étude du système HLA de patients NMO a été faite au Japon. Elle a comparé 70 patients NMO, dont 38 avec anticorps NMO-IgG, à 125 sujets sains et 52 patients SEP (Matsushita et al., 2009). La fréquence du HLA-DPB1*0501 était significativement augmentée chez les patients séropositifs pour le NMO-IgG par rapport aux sujets sains, mais pas par rapport aux patients NMO séronégatifs ou aux patients SEP. Une étude française a comparé 45 patients NMO, dont 24 NMO séropositifs, à 310 sujets sains et 161 patients SEP (Zephir et al., 2009). Les patients NMO séronégatifs présentaient une fréquence plus élevée de l'allèle HLA-DQA1*102 et les patients séropositifs une fréquence plus élevée de l'allèle HLA-DRB1*03, ceci par rapport aux sujets sains mais pas par rapport aux patients SEP. Par ailleurs, l'allèle trouvé chez les patients japonais n'était pas retrouvé chez ces patients caucasiens. La plus grande fréquence de l'allèle HLA-DRB1*03 vient d'être confirmée dans une population brésilienne de patients avec NMO-IgG (Brum et al.,

2010) et dans une population afro-antillaise séropositive à 45% pour le NMO-IgG (Deschamps et al., 2011). Enfin, l'allèle HLA-DRB1*1501, significativement associé à la SEP, n'était pas associé avec la NMO dans plusieurs études de cohorte, comprenant les deux études citées précédemment (Brum et al., 2010; Deschamps et al., 2011; Matiello et al., 2010).

B.2 Les formes optico-médullaires de SEP au Japon

Historiquement, les premiers cas de SEP optico-médullaire ont été décrits au Japon, permettant de les distinguer des patients NMO, alors caractérisés par une forme bifocale monophasique isolée (Okinaka et al., 1958). Une seconde étude comparant les patients SEP anglais et japonais montra que ces derniers avaient une forme souvent rémittente, rarement progressive, et une atteinte optico-médullaire sévère (Shibasaki et al., 1981). Depuis 1996 dans la population asiatique, les SEP optico-médullaires sont caractérisées par des lésions démyélinisantes récidivantes, confinées au nerf optique et à la moelle épinière, parfois au tronc cérébral (Kira et al., 1996). Les études démographiques, cliniques et génétiques les plus récentes retrouvent de nombreuses différences avec la SEP « conventionnelle » et de nombreux points communs avec la NMO, à l'exception d'un taux plus faible de maladies auto-immunes dans les SEP optico-médullaires que dans les NMO (Kira, 2003). Depuis la découverte des NMO-IgG en 2004, il s'est révélé que 30-60% des patients avec une SEP optico-médullaire avaient cet anticorps, hautement spécifique de la NMO (Lennon et al., 2004; Nakashima et al., 2006). Enfin, chez les patients ayant des SEP optico-médullaires, la présence d'une MLTE était fréquente, souvent associée à la présence de NMO-IgG, d'un handicap important et à la survenue d'une deuxième poussée rapprochée, distinguant ainsi le pronostic de ces patients de celui des

myélites focales que l'on observe classiquement dans la SEP (Ishizu et al., 2009; Matsuoka et al., 2007). Par conséquent, il existe de nombreux arguments en faveur d'une physiopathologie commune entre SEP optico-médullaire et NMO. A l'heure actuelle, le poids de l'histoire au Japon pousse encore les médecins à distinguer ces deux profils de patients qui ont de nombreux points communs démographiques, cliniques, immunologiques et une sévérité du handicap comparable. Cependant, il semble tout de même exister certains patients qui remplissent les critères de NMO et de SEP, ayant un tropisme optico-médullaire préférentiel, une myélite étendue et des lésions cérébrales remplissant les critères de Barkhof pour la SEP. Quand ces patients sont séronégatifs pour les NMO-IgG, leur réponse aux interférons est identique à celle observée chez les patients SEP classiques et pose en effet la question d'une SEP optico-médullaire. En revanche, la présence de NMO-IgG semble être un élément déterminant de mauvaise réponse aux immunomodulateurs, la réponse thérapeutique étant bien meilleure sous immunosuppresseurs (Saida et al., 2005), permettant alors de ranger ces patients dans le groupe NMO.

C. Analyse du pronostic

C.1 Facteurs prédictifs du handicap

Sur la base de trois importantes études de cohortes, différents facteurs pronostiques ont pu être dégagés. Dans l'étude de Wingerchuk et Weinshenker (2003), les risques d'évolution vers une forme rémittente déterminés à l'aide d'un modèle statistique de régression logistique multivariée étaient : un âge de début après 30 ans, le sexe féminin, la longueur de l'intervalle entre les deux événements index et la survenue d'un handicap peu invalidant après une première myélite. L'étude antillaise réalisée à partir d'un modèle statistique de Cox retrouvait un risque accru de décès chez les

patients ayant une NMO rémittente qui avaient un intervalle de temps inférieur à un an entre les deux premières attaques, une première attaque optique ou sphinctérienne et une récupération incomplète après la première attaque. Ces données étaient associées significativement au risque de décès et de façon indépendantes, que les patients aient eu un traitement ou non. L'étude multicentrique italienne avait évalué de façon univariée plusieurs données associées à la survenue d'un handicap EDSS 3 ou 6. Un âge de début supérieur à 40 ans, un intervalle de temps court entre les deux premières attaques et un taux de rechute annualisé supérieur à 0.7 y étaient associés de façon significative.

C.2 Valeur pronostique de l'anticorps anti-AQP4

C.2.1 Dans la NMO

Compte tenu du rôle de l'anticorps NMO-IgG mentionné plus haut, il est légitime de se demander si cet anticorps est à l'origine d'un handicap plus important. Compte tenu du faible nombre de patients séropositifs inclus dans les études, l'analyse de son rôle prédictif dans l'apparition du handicap n'a pu être réalisée. En revanche, plusieurs études descriptives existent et se contredisent sur ce point. Dans une étude incluant 22 patients NMO (dont 20 séropositifs) et 13 patients ayant une possible NMO débutante (dont 11 séropositifs), des taux élevés d'anticorps anti-AQP4 sérique, coïncidaient avec une cécité complète ou une myélite étendue (Takahashi et al., 2007). Une autre étude japonaise comparant 14 patients NMO séropositifs pour les NMO-IgG et 10 patients séronégatifs pour les NMO-IgG, retrouve dans le premier groupe plus de femmes, un taux de rechute plus important et une réponse moins bonne aux interférons béta-1b (Matsuoka et al., 2007). Une autre étude rétrospective incluant six patients NMO et deux patients avec une MLTE séropositive, a retrouvé

un taux d'anticorps anti-AQP4 sérique plus élevé pendant les attaques que pendant les rémissions (Jarius et al., 2008). Dans cette même étude, il est noté que le taux d'anticorps montait progressivement avant une attaque et baissait avec leur traitement. Cependant, dans ces deux études on notera une grande variabilité interindividuelle dans les taux d'anticorps, des périodes de forte ascension sans poussées ainsi que des taux faibles et des poussées. Par ailleurs, la décroissance notée après traitement de la poussée pouvait être due à l'utilisation d'immunosuppresseurs ciblant le LB comme le rituximab, utilisé chez la moitié des patients dans l'étude de Jarius et collaborateurs par exemple. A contrario, plusieurs études n'ont pas mis en évidence de différences cliniques majeures entre les patients séropositifs et séronégatifs. Au contraire, dans la population caucasienne, il n'est pas retrouvé de différence entre ces deux groupes de patients (Marignier et al., 2008). Les 25 patients NMO séropositifs étaient comparables aux 24 patients NMO séronégatifs en termes d'âge de début, de sexe et de durée de la maladie. La fréquence annualisée des rechutes, la sémiologie des événements démyélinisants optiques ou médullaires et le handicap évalué par l'EDSS étaient également identiques.

Enfin, une étude récente suggère qu'il faut différencier le rôle pronostique du NMO-IgG sérique et intrathécal, ce dernier étant mieux corrélé à l'activité clinique de la NMO (Dujmovic et al., 2011).

C.2.2 Dans les myélites extensives ou névrites optiques récidivantes

Une étude récente par le groupe de la Mayo Clinic a suggéré un rôle pronostique des NMO-IgG après la survenue d'une MLTE dans l'apparition d'une NMO rémittente (Weinshenker et al., 2006). Parmi les neuf patients séropositifs pour les NMO-IgG suivis pendant un an, quatre développèrent un nouvel épisode de myélite transverse et un patient une névrite optique. Dans le même temps, aucun des 23 patients NMO-IgG

séronégatifs ne connut de nouvel épisode démyélinisant. La même année, une étude américaine rétrospective sur 45 mois a montré que parmi 22 patients ayant eu une myélite partielle transverse aiguë (MPTA), un seul était NMO-IgG séropositif (Scott et al., 2006). Ce patient fut le seul, pendant la durée du suivi, à développer une NMO. Cette donnée suggère que les MPTA et les MLTE constituent deux entités nosologiques distinctes. Le risque d'évolution vers une NMO est donc plus important en cas de MLTE qu'en cas de MPTA. Par conséquent, les patients ayant une MLTE et des anticorps NMO-IgG constituent un groupe à haut risque de développer une NMO.

Deux études prospectives menées par les équipes de Matiello (Matiello et al., 2008) et de Seze (de Seze et al., 2008) ont comparé le profil évolutif des patients atteints de NO récidivantes d'après leur statut pour les NMO-IgG. Au cours du suivi, 50% des patients séropositifs contre 6 à 10% des patients séronégatifs ont développé une myélite transverse et remplissait les critères de NMO. Par ailleurs, dans l'étude menée par Matiello, l'acuité visuelle de l'œil atteint était inférieure à 20/200 chez tous les patients séropositifs, alors qu'une telle atteinte optique n'était retrouvée que chez 65% des patients séronégatifs. Il semble donc que les patients ayant des NO récidivantes et séropositifs pour les NMO-IgG développent des atteintes visuelles plus sévères et ont un risque plus important d'évolution vers une NMO que les patients séronégatifs.

CHAPITRE III. LES MODELES ANIMAUX DE DEMYELINISATION OPTICO-MEDULLAIRE

A. Les modèles animaux démyélinisants

Les modèles animaux de démyélinisation sont représentés par :

1. les modèles d'EAE ;
2. les modèles présentant des mutations spontanées dans les gènes codant pour les oligodendrocytes ;
3. les modèles viro-induits ;
4. les modèles chimio-induits ;
5. les modèles transgéniques.

Les modèles mêlant inflammation et démyélinisation, se rapprochant ainsi au plus près de ce qui est observé dans la SEP, sont dominés par les modèles d'EAE créés par immunisation passive (injection de cellules ou anticorps à pouvoir démyélinisant *per se*) ou active (injection de molécules suscitant une réaction immunologique à l'origine de la démyélinisation). Dans la majorité des cas, le processus d'immunisation est favorisé par l'injection d'adjuvant dit complet de Freund (CFA) quand il s'agit de *Mycobacterium Tuberculosis* inactivé dans une émulsion d'eau et d'huile, ou incomplet (IFA) quand l'émulsion ne contient pas de *Mycobacterium*. Les EAE sont générées à partir de protéines majeures de la myéline telles la *myelin basic protein* (MBP) ou le *proteolipid protein* (PLP), représentant respectivement 50% et 30% des protéines totales de la myéline du SNC, ou à partir de protéines mineures comme la *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG), représentant 0.05% à 0.1% des protéines myéliniques du SNC.

Générer un modèle d'EAE repose donc sur de nombreux facteurs expérimentaux. Les principaux sont le type d'antigène ou de lymphocyte injecté ainsi que l'espèce et la souche animale concernée. Cependant, d'autres éléments interviennent également comme le type de cellules présentatrices d'antigène (CPA) mobilisé, dépendant entre autre du site d'injection (Adelmann et al., 1995) ou la saison d'immunisation (Teuscher et al., 2004), rendant complexe la génération d'un modèle mimant la pathologie chez l'humain. Tous ces éléments doivent être pris en compte dans l'analyse et l'interprétation des résultats.

B. L'EAE à tropisme optico-médullaire

B.1 Le rôle primordial de la MOG

B.1.1 Structure et fonction chez l'humain

La MOG est une protéine mineure de la myéline appartenant à la superfamille des immunoglobulines à cause de son domaine extracellulaire ressemblant à la partie variable d'une Ig. Cette particularité lui confère des propriétés immunogéniques et un intérêt tout particulier dans l'étude des pathologies auto-immunes de la myéline du SNC, où elle est exprimée à la surface des gaines de myéline et sur les corps cellulaires des oligodendrocytes. Le gène de la MOG se situe sur le chromosome 6 dans la partie télomérique du CMH et code pour au moins 15 isoformes chez l'humain (Delarasse et al., 2006). L'isoforme $\alpha 1$ est la plus fréquente, constituée de 218 acides aminés. Elle comprend un long domaine N-terminal MOG₁₋₁₂₁ de type Ig constitué d'une boucle formée par un pont disulfure qui lui confère sa conformation tridimensionnelle repliée. Cette partie N-terminale de type Ig a une forte homologie structurale avec la butyrophiline (BT), protéine présente dans le lait maternel (Jack

and Mather, 1990). La BT a par ailleurs une forte homologie structurale avec les protéines de la famille B7, impliquées dans la régulation de l'activité lymphocytaire T (Arnett et al., 2009). Par ailleurs, on trouve en position 31 un épitope carbohydate L2/HNK-1 impliqué dans les mécanismes d'adhésion cellulaire. La MOG comprend également deux segments hydrophobes MOG₁₂₂₋₁₅₀ et MOG₁₇₅₋₂₀₀ enchâssés dans la membrane cellulaire, séparés par une boucle hydrophile suivis d'un court domaine C-terminal hydrophile (**figure 3**).

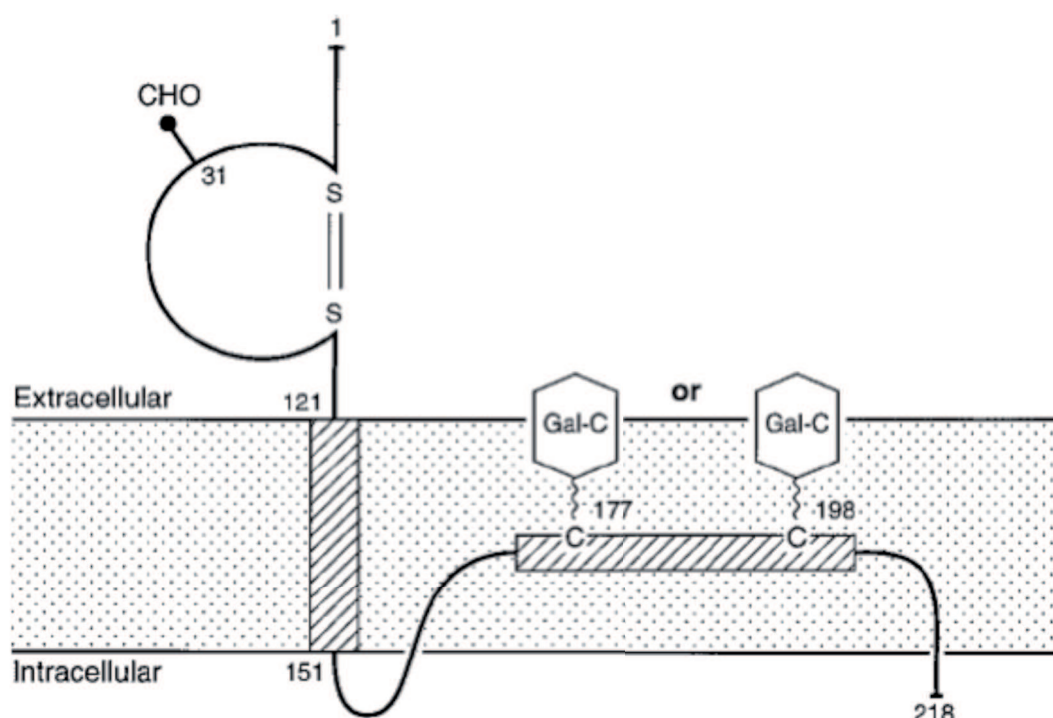


Figure 3. Structure de la *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG), d'après (Johns and Bernard, 1999).

La MOG comprend un domaine N-terminal (1-121) de type immunoglobuline comprenant un groupement carbohydate (CHO) en position 31, deux segments hydrophobes (122-150 et 175-200) séparés par une boucle hydrophile et suivis d'un court domaine C-terminal hydrophile. Les leucines en position 177 et 198 pourraient être palmitoylées et présenter chacune un groupement galactocérebroside (GalC).

Plusieurs fonctions physiologiques sont attribuées à la MOG :

1. Constitution et réparation de la myéline. L'expression développementale tardive de la MOG est corrélée avec le stade tardif de la myélinogénèse, suggérant que celle-ci intervient dans la finition, la compaction et le maintien des gaines de myéline. La MOG est également exprimée sur les progéniteurs oligodendrocytaires de rats adultes (Li et al., 2002), suggérant ainsi un rôle dans le développement et la réparation de la myéline du SNC.

2. D'adhésion cellulaire secondaire à la présence, dans son domaine de type Ig, de l'épitope L2/HNK-1 (Burger et al., 1993). Cet acide glucuronique sulfaté est lié aux résidus lactosamines impliqués dans les mécanismes d'adhésion cellulaire (Quarles, 1997). Par ailleurs, la MOG a été retrouvée sous forme dimérique, la zone de jonction étant réalisée par la superposition tête bêche des deux domaines N-terminaux de chaque monomère impliquant les résidus MOG₁₋₁₁₂ (Clements et al., 2003).

3. Immunitaire due à sa structure d'Ig. Celle-ci a une similarité structurale avec les antigènes B-G du CMH chez le poulet (Miller et al., 1991), le domaine extracellulaire des membres de la famille génomique BT, et les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 (Linsley et al., 1994). Par ailleurs, elle se lie de façon dose dépendante au C1q (Johns and Bernard, 1997) et pourrait ainsi réguler la voie classique du complément.

En conséquence, la MOG, malgré son faible taux dans les gaines de myéline, assure donc son intégrité structurale, permettant notamment le bon déroulement et le maintien de sa compaction. Sur le plan immunitaire, on notera que la MOG n'a pas été détectée chez l'humain dans le thymus par immunohistochimie, WB ou immunoprécipitation, indiquant qu'elle n'est pas capable d'induire une tolérance immunologique centrale. Cette donnée lui confère donc un potentiel particulier dans

le cadre des maladies auto-immunes démyélinisantes du SNC comme la SEP ou la NMO.

B.1.2 La MOG dans l'EAE

La séquence d'acides aminés de la MOG est hautement conservée parmi les espèces. On constate une analogie supérieure à 95% entre les séquences humaines et murines (**figure 4**).

	1					
human	GQFRVIGPRHP	IRALVGDEVE	LPCRISPGKN	ATGMEVGWYR	PPFSRVVHLY	RNGKDQGDQ
bovine	-----G--	-----	-----	-----	-----	-----EE-
rat	-----G--	-----A-	-----	-----	S-----	-----AE-
mouse	-----Y-	-----A-	-----	-----	S-----	-----AE-
	62					
human	APEYRGRTTEL	LKDAIGEGKV	TLRIRNVRFS	DEGGFTCFFR	DHSYQEEAAM	ELKVEDPFYW
bovine	-----Q-	--ET-----	-----	-----	-----	-----
rat	-----	--ES-----	A--Q-----	---Y-----	-----V	-----
mouse	-----E---	--ET-S----	---Q-----	---Y-----	-----	-----
	122	<u>transmembrane domain</u>				
human	VSPGVLVLLA	VLPVLLQIT	VGLVFLCLQY	RLRGKLRAEI	ENLHRTFDPH	
bovine	IN-----I-	-----	-----R	-----W---	-----	
rat	IN----A-I-	LV-M----VS	-----F--H	-----V	-----	
mouse	-----T-I-	LV-TI--VP	-----F--H	-----V	-----	
	172	<u>membrane associated domain</u>				
human	FLRVPCWKIT	LFVIVPVLGP	LVALITCYNW	LHRRLAGQFL	EELRNPF	
bovine	--M-----	-----	-----	-----	-----	
rat	-----	-----	-----	-----	-----	
mouse	-----	-----	-----	-----	-----	

Figure 4. Comparaison des séquences en acide aminé de la MOG dans les espèces humaines, bovines et murines, d'après (Johns and Bernard, 1999).

Une forte homologie de séquence est retrouvée dans les différentes espèces. Elle domine dans le domaine extracellulaire, le second domaine transmembranaire et l'extrémité C-terminale.

Chez la souris et le rat, deux isoformes ont été retrouvées jusqu'à présent, comprenant l'isoforme dominante $\alpha 1$ décrite chez l'humain. Contrairement à l'humain, des transcrits d'ARNm de la MOG ont été détectés dans le thymus et les

organes lymphoïdes secondaires de souris. En revanche, ils ne sont pas capables d'induire une tolérance immunologique (Fazilleau et al., 2006).

Dans l'EAE, la MOG est le seul antigène qui initie conjointement une réponse encéphalitogénique médiée par les LT et une démyélinisation de type humorale médiée par les LB (Wolf, 1996). Cet effet est retrouvé dans plusieurs modèles murins avec la forme native (repliée) ou recombinante (non repliée) de la protéine, des peptides dérivés de la MOG, le transfert passif de LT spécifiques de la MOG avec ou sans anticorps anti-MOG. Plusieurs épitopes de MOG (MOG₁₋₂₂, MOG₃₅₋₅₅, MOG₉₂₋₁₀₆) ont été identifiés mais c'est le peptide MOG₃₅₋₅₅ qui a le plus grand pouvoir encéphalitogène chez la souris. Chez le rat, contrairement à la souris, l'épitope contenant la boucle extracellulaire MOG₉₁₋₁₁₄ est le plus encéphalitogène (Weissert et al., 2001). Cependant, la réactivité des LT contre cet antigène est uniquement retrouvée dans les lésions et non dans le sérum, confirmant la dissociation existant entre la réaction immunitaire périphérique et celle du SNC. D'autre part, les peptides de MOG injectés n'entraînent pas de production d'anticorps. En revanche, la MOG₁₋₁₂₅ recombinante (rMOG) de rat, produite après transfection d'*Escherichia Coli* avec le gène de la MOG, entraîne une EAE sévère associée à une forte production d'anticorps anti-MOG.

Par conséquent l'injection de rMOG₁₋₁₂₅ semble le meilleur antigène pour créer une EAE avec forte participation humorale chez le rat. A ce titre, l'épitope MOG₃₅₋₅₅ humain est moins immunogénique que son équivalent murin. Ceci est dû en partie à la substitution d'une sérine par une proline en position 42, modifiant la conformation tridimensionnelle de la protéine (Albouz-Abo et al., 1997).

B.2 L'espèce et la souche animale

B.2.1 La souris

Chez la souris, les modèles de démyélinisation optico-médullaire sont représentés par un modèle transgénique et un modèle d'EAE avec immunisation active. Ils ont été réalisés avec des souris C57BL/6 :

- **Le modèle transgénique 2D2×TH.** La première étape a consisté à générer un modèle transgénique, appelé 2D2, ayant un récepteur aux LT particulièrement affin pour la MOG (LT TCR^{MOG}). Ces animaux ne développent spontanément pas d'EAE mais une atteinte du nerf optique dans 30% des cas, associée à une infiltration importante de LT TCR^{MOG}. Après immunisation avec du CFA, de la toxine pertussique et de la MOG₃₅₋₅₅, une EAE est constatée chez tous les animaux (Bettelli et al., 2003). La seconde étape a consisté à réaliser une souche dite TH, générant une production massive d'IgM anti-MOG. Cette souche seule ne développe pas de pathologie spontanée. En revanche, le croisement de ces deux modèles, appelé 2D2xTH, a développé, d'une part, une multiplication et une activation des LT TCR^{MOG} et, d'autre part, un changement isotypique des IgM en IgG1, tous deux à l'origine d'une atteinte sélective du nerf optique et de la moelle épinière (Bettelli et al., 2006; Krishnamoorthy et al., 2006).

L'analyse approfondie de ce modèle a permis de soulever trois points physiopathologiques fondamentaux :

1. le rôle des LT TCR^{MOG} est indispensable pour créer le modèle, permettant entre autre la commutation isotypique des IgM anti-MOG en IgG1 anti-MOG. Aucune EAE n'était observée après ouverture de la BHE par LT TCR dirigés contre l'ovalbumine dans la souris TH, suggérant que l'ouverture seule de la BHE n'est pas

suffisante pour déclencher le modèle. De plus, la spécificité des LT TCR^{MOG} est supportée par le fait que d'autres modèles transgéniques avec LT TCR^{MBP} ou LT TCR^{PLP} ne développent pas d'atteinte optique isolée mais une EAE avec atteinte encéphalique diffuse (Lafaille et al., 1994; Madsen et al., 1999) ;

2. le profil cytokinique induit évoque celui observé dans les modèles d'immunisation active chez la même souche de souris, à savoir une sécrétion d'INF- γ , IL-5 et IL-17 ;

3. dans le modèle triple transgénique 2D2xTHxMOG^{-/-}, la présence d'IgM anti-MOG et IgG anti-MOG était détectée à des taux identiques à ceux du modèle 2D2xTH, suggérant que la présence de MOG n'est pas indispensable pour la sécrétion d'anticorps, peut-être à la faveur d'un effet de mimétisme moléculaire avec un autre antigène.

- **Immunisation active avec la MOG₃₅₋₅₅.** Après injection de MOG₃₅₋₅₅, l'animal déclenche une réponse immunitaire avec une dégénérescence neuronale et une inflammation axonale situées précocement dans les voies optiques, cochléo-vestibulaires, lemniscales et spino-cérébelleuses. (Brown and Sawchenko, 2007).

B.2.2 Le rat

Pour un protocole donné, les gènes dépendant du CMH comme le système RT1 chez le rat (équivalent de notre système HLA) semblent impliqués dans le type et la sévérité de l'EAE dans les différentes souches. Ainsi, après immunisation avec de la MOG, les rats congéniques Brown Norway (BN) RT1ⁿ et Lewis (LEW).N RT1ⁿ développent une réponse humorale importante et le même type de démyélinisation optico-médullaire (Stefflerl et al., 1999; Storch et al., 1998). En revanche, cette réponse humorale est faible chez les rats congéniques BN RT1^l et LEW RT1^l qui ne développent pas de démyélinisation (Stefflerl et al., 1999). Cependant, tout comme dans la SEP, d'autres gènes n'appartenant pas au système RT1 sont également

impliqués, et semblent même varier d'une souche à l'autre, rendant ainsi toute sa complexité au déterminisme génétique dans l'EAE (Becanovic et al., 2003; Dahlman et al., 1999; Jagodic et al., 2001). Ceci a notamment été montré après un screening par *microarray*, qui a révélé 51 gènes susceptibles de conférer une prédisposition à l'EAE (Ibrahim et al., 2001).

De façon pragmatique, les modèles d'EAE optico-médullaires développés chez le rat après immunisation active avec de la MOG comprennent principalement les rats BN et Dark agouti (DA) (Storch et al., 1998). Le rat LEW ne développe pas ce phénotype, que l'immunisation soit active ou passive (Adelmann et al., 1995; Storch et al., 1998). Les études comparatives de ces différentes souches pour un même protocole d'immunisation ont montré que la démyélinisation optico-médullaire prédominait chez 77% des rats femelles BN alors qu'elle survenait chez 36% des rats femelles DA. Par ailleurs, le rat BN, probablement parce qu'il contient une importante quantité d'ARN MOG dans le nerf optique et la moelle épinière (Pagany et al., 2003), a montré une susceptibilité accrue à la névrite optique comparativement au rat DA (Sattler et al., 2008).

Ce modèle a été analysé en détail dans l'étude de Storch et collaborateurs, où 45 rats BN ont été injectés avec de la rMOG₁₋₁₂₅ de rat à la base de la queue (Storch et al., 1998).

- **Souche Brown Norway, immunisation active avec la rMOG₁₋₁₂₅.** Parmi les rats injectés, 78% sont tombés malades, dans un intervalle de 34 à 70 jours après immunisation. Parmi eux, 77% ont contracté une atteinte optico-médullaire et 3% une atteinte optique isolée. Autrement dit, 62% des animaux immunisés avaient développé des lésions intéressant uniquement le nerf optique ou la moelle épinière. Ces lésions correspondaient à des plaques actives de démyélinisation chez presque

tous les animaux. Aucune lésion n'était le siège d'une inflammation isolée sans démyélinisation. Comparativement aux autres souches immunisées (LEW et DA), l'intensité de la démyélinisation était nettement plus marquée chez le rat BN. Enfin, dans les lésions étaient retrouvés des dépôts d'Ig, de complément activé ainsi que de nombreuses cellules macrophagiques et des polynucléaires à prédominance éosinophile. Certaines myélites observées étaient particulièrement sévères, associées à une destruction neuronale et astrocytaire au sein des lésions inflammatoires/démyélinisantes. A un stade tardif, il est décrit l'apparition d'une surexpression de la GFAP dans les nerfs optiques, interprétée comme une cicatrice gliale astrocytaire.

Par conséquent, compte tenu de son potentiel à développer une immunité humorale et des lésions optico-médullaires, le modèle d'EAE induit par la MOG chez le rat BN se rapproche le plus de ce que l'on observe dans la NMO humaine et/ou la SEP optico-médullaire. C'est ce modèle que nous avons développé au laboratoire et caractérisé en détail au vu des données actuelles sur la NMO.

B.3 Les modalités d'immunisation

D'autres déterminants jouent également un rôle dans la genèse de l'EAE comme la forme solide ou liquide de l'antigène, le type d'adjuvant utilisé et le site d'injection. En effet, le caractère insoluble de l'antigène ralentit sa diffusion et sa vitesse d'élimination, permettant ainsi de délivrer une quantité faible et continue d'antigène, influençant ainsi le développement lent et progressif d'une réaction immunitaire LT. En conséquence, l'injection, chez le rat de MOG soluble est à l'origine d'une EAE très agressive et souvent létale, caractérisée par une inflammation massive et peu de démyélinisation, alors que la MOG précipitée entraîne une EAE optico-médullaire

non létale, très démyélinisante (Storch et al., 1998). Le CFA, quant à lui, provoque l'agrégation et la précipitation de protéines solubles, facilitant en outre la capture des antigènes par les CPA. De plus, le CFA est à l'origine d'un profil Th1 et l'IFA d'un profil Th2 avec une forte production d'anticorps (Billiau and Matthys, 2001), expliquant les scores de démyélinisation plus élevés avec l'IFA qu'avec le CFA (Storch et al., 1998).

Le site d'injection joue également un rôle dans la réaction immunitaire induite. En effet, un tissu peut avoir plusieurs microenvironnements, chacun ayant sa propre physiologie et son type de réponse immunitaire approprié, lié en grande partie à des CPA qui lui sont spécifiques. Par ailleurs, les endothéliums locaux jouent également un rôle majeur en sélectionnant les leucocytes qui entrent dans le tissu par la sécrétion de différents assortiments de chemokines. Si on prend comme exemple le modèle de rat LEW injecté avec de la rMOG, celui-ci ne développe pas d'EAE si il est injecté à la patte alors que l'injection à la base de la queue la provoque (Adelmann et al., 1995). A l'extrémité du processus, certains tissus comme le cerveau, l'oeil, le testicule, l'utérus ainsi que la poche de la joue du hamster, ne développent pas de réaction immunitaire destructrice après injection d'antigène (Waldmann, 2010).

C. Analogie entre les modèles murins existants et la NMO chez l'humain

Les principaux modèles d'EAE utilisés sont résumés dans le **tableau 5** et montrent une grande variété d'expression selon l'espèce, la souche et l'antigène utilisés.

Modèles	Réaction immunologique	Particularités cliniques et histologiques
Rat Lewis EAE active (Myéline SNC, MBP, MOG, PLP) EAE passive (MBP, S100, MOG, GFAP) EAE active ou passive et co-transfert d'anticorps anti-MOG	Inflammation cellulaire T et faible taux d'anticorps Inflammation cellulaire T importante Inflammation cellulaire T et fort taux d'anticorps	EAE aiguë, monophasique : → Atteinte axonale, peu de démyélinisation → Atteinte axonale, peu de démyélinisation → Démyélinisation transitoire EAE chronique, rémittente, poussées sévères : → Forte démyélinisation et atteinte axonale sévère EAE chronique, rémittente ou progressive : → Démyélinisation, atteinte axonale. Grande variabilité intra et inter souche. Toxine pertussique nécessaire pour plusieurs souches. Pathologies extra-neurologiques.
Lewis congéniques, Dark agouti, Brown Norway EAE active (MOG)	Inflammation cellulaire T et fort taux d'anticorps	
Souris (SJL, PL/J, C57/B16, Biozzi ABH) EAE active (MBP, MOG, PLP)	Inflammation cellulaire T et fort taux d'anticorps	

Tableau 5. Caractéristiques des principaux modèles d'encéphalite autoimmune expérimentale (EAE), modifié d'après (Gold *et al.*, 2006).

MBP : myelin basic protein ; *MOG* : myelin oligodendrocyte glycoprotein ; *PLP* : proteolipid protein ; *GFAP* : glial fibrillary acidic protein.

Alors que les immunisations avec la MBP ou le PLP s'accompagnent d'une EAE avec atteinte encéphalique diffuse, très inflammatoire à prédominance cellulaire, la MOG peut générer une réponse cellulaire et humorale (Gold *et al.*, 2006). Les anticorps anti-MOG entraînent alors une démyélinisation (Linnington *et al.*, 1988) prédominant sur les nerfs optiques et la moelle épinière (Storch *et al.*, 1998). Au vue des données disponibles, le modèle de rat BN immunisé avec de la rMOG₁₋₁₂₅ soluble semble se rapprocher le plus de la NMO humaine. A coté des modèles d'EAE, le modèle double transgénique de souris 2D2xTH a également de nombreux points communs avec la NMO.

Les principaux éléments de comparaison de ces deux modèles avec la NMO humaine sont notés dans le **tableau 6**. Plusieurs points restent à préciser comprenant notamment la fréquence et la topographie détaillée des lésions encéphaliques, l'analyse de l'AQP4 et de la GFAP au sein des lésions, la présence ou non d'anticorps anti-AQP4.

Caractéristiques	Souris 2D2xTH	EAE du rat BN induite par la MOG	Patients NMO
Evolution clinique	Aiguë rémittente	Aiguë rémittente	Aiguë rémittente
Pathologie de la moelle épinière	Inflammation sous-piale, démyélinisation, éosinophiles	Atteinte vasculaire : Inflammation, nécrose, éosinophiles. Destruction de la substance grise et blanche	Atteinte vasculaire : Inflammation, nécrose, éosinophiles, hyalinisation des petits vaisseaux. Destruction de la substance grise et blanche
Extension de la myélite	Un métamère	Au moins deux métamères	Au moins deux métamères
Atteinte encéphalique	Non	Dans 3% des cas touchant le septum et les fimbria des hippocampes	Dans 50% des cas au cours de l'évolution touchant le tronc cérébral, l'hypothalamus, les régions périvertriculaires ou le corps calleux
Pathogénie humorale	Pas de dépôt d'Ig dans les lésions, pas de corrélation avec la sévérité de la pathologie.	Dépôt d'Ig et de complément (C9) dans les lésions.	Dépôt d'Ig et de complément (C9) dans les lésions. Efficacité des échanges plasmatiques.
Anti-AQP4	Absence	Non recherché	Présence

Tableau 6. Données cliniques, anatomopathologiques et immunologiques des principaux modèles de démyélinisation optico-médullaire comparées avec la NMO humaine.

Souris 2D2xTH : souris transgéniques ayant un récepteur aux LT particulièrement affiné pour la MOG et générant une production massive d'IgM anti-MOG; *EAE* : encéphalomyélite auto-immune expérimentale ; *BN* : Brown Norway ; *Ig* : immunoglobuline.

CHAPITRE IV. APPROCHE

TRANSLATIONNELLE DE LA NMO

A. Questions posées

La recherche translationnelle (ou recherche de transfert) doit permettre un flux bidirectionnel des connaissances de la recherche fondamentale vers son application au patient et des observations faites chez le malade vers la recherche fondamentale. Elle implique donc plusieurs compétences et permet d'articuler des savoirs pour se concrétiser par une application clinique utile aux patients.

Dans la NMO, cette recherche a pour but de :

1. Tester la pertinence d'une hypothèse biologique pour le diagnostic, le pronostic, le traitement, la prévention ou l'analyse du risque de développer une NMO.
2. Déterminer les bases biologiques d'une observation faite en clinique dans une population.

A ce titre là, notre travail s'articule autour de deux questions s'appuyant sur une approche clinique et fondamentale :

1. Quelle est l'étendue du spectre phénotypique de la NMO ?
2. Quels sont les facteurs à l'origine du handicap dans la NMO ?

B. Moyens développés

Afin de répondre à ces questions, nous avons constitué une importante cohorte de patients atteints de NMO ou à haut risque de développer une NMO. Les patients NMO ont été sélectionnés selon les critères de Wingerchuk 2006, qui sont jusqu'à présent les plus utilisés et les plus robustes en pratique clinique. Nous avons

également développé dans notre Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives (LINC), UMR 7237 CNRS/UDS, un modèle animal de rat BN immunisé avec de la rMOG₁₋₁₁₆ soluble de rat. Enfin nous avons tissé une collaboration avec l'unité INSERM U842 à Lyon pour la réalisation et l'interprétation des tests de détection d'anticorps anti-AQP4.

Par conséquent, notre travail sera exposé selon deux parties : la première partie comprendra les études détaillées sur l'épidémiologie et la clinique de la NMO et des patients à haut risque dans notre cohorte de patients, la seconde partie exposera les données relatives au modèle animal développé dans notre laboratoire. Nous discuterons chacun de ces articles avant de développer une discussion générale permettant de mieux situer les différents spectres phénotypiques de la NMO et de proposer des hypothèses sur l'origine du handicap dans cette pathologie.

CHAPITRE V. ARTICLES

A. La NMO en France : étude multicentrique de 125 patients (*Article 1*)

Neuromyelitis optica in France

A multicenter study of 125 patients



N. Collongues, MD
 R. Marignier, MD
 H. Zéphir, MD
 C. Papeix, MD
 F. Blanc, MD
 C. Ritleng, PhD
 M. Tchikviladzé, MD
 O. Outteryck, MD
 S. Vukusic, MD, PhD
 M. Fleury, MD
 B. Fontaine, MD, PhD
 D. Brassat, MD, PhD
 M. Clanet, MD, PhD
 M. Milh, MD
 J. Pelletier, MD, PhD
 B. Audoin, MD, PhD
 A. Ruet, MD
 C. Lebrun-Frenay, MD
 E. Thouvenot, MD
 W. Camu, MD, PhD
 M. Debouverie, MD, PhD
 A. Créange, MD, PhD
 T. Moreau, MD, PhD
 P. Labauge, MD, PhD
 G. Castelnovo, MD
 G. Edan, MD, PhD
 E. Le Page, MD
 G. Defer, MD, PhD
 B. Barroso, MD
 O. Heinzlef, MD
 O. Gout, MD
 D. Rodriguez, MD
 S. Wiertlewski, MD
 D. Laplaud, MD, PhD
 F. Borgel, MD
 P. Tourniaire, MD
 J. Grimaud, MD, PhD
 B. Brochet, MD, PhD
 P. Vermersch, MD, PhD
 C. Confavreux, MD, PhD
 J. de Seze, MD, PhD

Address correspondence and reprint requests to Dr. N. Collongues, Department of Neurology, University Hospital of Strasbourg, 1, Place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France
 nicolas.collongues@chru-strasbourg.fr

ABSTRACT

Background: There have been few epidemiologic studies on neuromyelitis optica (NMO) and none used the recent 2006 diagnostic criteria. Here we describe the clinical, laboratory, MRI, and disability course of NMO in a French cohort of 125 patients.

Methods: We performed an observational, retrospective, multicenter study. Data were collected from September 2007 through August 2008, corresponding to the endpoint of the study. We identified 125 patients fulfilling the 2006 NMO criteria. Selection was made using hospital files and a specific clinical questionnaire for NMO.

Results: Mean age at onset was 34.5 years (range 4–66) with a mean disease duration of 1.0 ± 7.8 years at the endpoint. The patients were mainly (87%) Caucasian, with a female:male ratio of 3:1. In 90% of cases, the association of optic neuritis, longitudinal extensive myelitis, and a Paty-negative initial brain MRI was sufficient to fulfill the supportive criteria. Eighty-eight percent of patients were treated with immunosuppressive therapies. Median delay from onset to Expanded Disability Status Scale (EDSS) score 4 was 7 years; score 6, 10 years; and score 7, 21 years. The first episode of myelitis was immediately followed by an EDSS score ≥ 4 in 37.3% of cases, and a severe residual visual loss was observed in 22% of patients after the first episode of optic neuritis. Multivariate analysis did not reveal any predictors of a poor evolution other than a high number of MRI brain lesions at diagnosis, which were predictive of a residual visual acuity $\leq 1/10$.

Conclusions: Our demographic data provide new data on disability in patients with neuromyelitis optica, most of whom were receiving treatment. *Neurology*® 2010;74:736–742

GLOSSARY

CI = confidence interval; EDSS = Expanded Disability Status Scale; LETM = longitudinal extensive transverse myelitis; MS = multiple sclerosis; NMO = neuromyelitis optica; OCB = oligoclonal bands; ON = optic neuritis; SRVL = severe residual visual loss.

Neuromyelitis optica (NMO) is a rare inflammatory and demyelinating disease of the CNS characterized by optic neuritis (ON) and myelitis, mostly extensive longitudinally and transversally (longitudinal extensive transverse myelitis [LETM]). In addition to these clinical data, the finding in 2004 of a specific antibody, called NMO-IgG,¹ was a determining factor in the development of new diagnostic criteria for NMO in 2006.² Previous epidemiologic studies^{3–10} revealed a female:male ratio of 4:1, a median age at onset of around 37 years, and an association with autoimmune disease in approximately 20% of cases. A relapsing-remitting clinical course was observed in more than 80% of NMO cases. In contrast, primary or secondary progression was noted in only 2% of cases.¹¹ The remainder were patients with a monophasic form, defined by the absence of further relapses after the index events of ON and myelitis. Only one study,⁶ with 46 patients, evaluated disability outcome: the median time to reach Expanded Disability Status Scale (EDSS)¹² score 3 was 0.5 years and EDSS score 6 was 7 years. Severe visual loss in at least one eye was observed in half of the patients within 5 years of disease onset.¹⁰ According to the above epidemiologic studies, the clinical manifestations of NMO are severe, with death occurring in 13% to 25% of patients during the follow-up.^{6,8,10}

Authors' affiliations are listed at the end of the article.

Disclosure: Author disclosures are provided at the end of the article.

Table 1 Epidemiologic data derived from the 3 principal cohorts of patients with neuromyelitis optica

	American cohort ¹⁰	Italian cohort ⁶	Mexican cohort ⁹
Diagnostic criteria	1999	1999	1999
Patients, n	80	46	34
Mean time of follow-up, y	7.6	8.8	5.8
Median age at onset, y	38	35	35
Ratio F/M	2.5/1	4.1/1	2.4/1
Associated autoimmune disease	25	22	0
Initial topography, %			
Spinal	NA	39.1	35.3
Optic	NA	56.6	23.5
Optic and spinal	12.5	4.3	41.2
Optico-spinal interval, mo (mean/median)	NA	NA	12.4/3.5
Interval between first and second attack, mo (mean/median)	NA/NA	17/NA	NA
Median time from onset to the assignment of disability score, y			
EDSS score 3	NA	0.5	NA
EDSS score 6	NA	7	NA
EDSS score 8	NA	NA	NA
Death events, n (%)	18 (22.5)	6 (13)	1 (2.9)
Annual rate of relapse (mean)	NA	1.3	NA

Abbreviations: EDSS = Expanded Disability Status Scale; NA = not available.

Although the above epidemiologic studies provide useful data, they have 2 serious limitations: only 3 studies included more than 30 patients^{6,9,10} (table 1) and none of them used the 2006 NMO criteria, and thus did not take into account the new enlarged spectrum of NMO.

We describe a cohort of 125 patients with NMO with a mean disease course of 10 ± 7.8 years.

METHODS We performed an observational and retrospective study of NMO in 25 tertiary medical centers in France. Data were collected from September 2007 through August 2008, corresponding to the endpoint of the study. Through the "Club Francophone de la Sclérose en Plaques" (French network of multiple sclerosis [MS] centers), we identified 200 patients with a suspected diagnosis of NMO. Of these, 125 patients fulfilled the 2006 NMO criteria and were included in the study. Data were obtained from hospital files and a clinical information questionnaire specifically designed for NMO. Any additional data required were obtained from the participating centers by e-mail or telephone. All data used in the study have been entered in the European Database for Multiple Sclerosis (EDMUS), recently adapted to NMO specificities.¹³ Data confidentiality and security are ensured in keeping with the recommendations of the

French data protection authority (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés [CNIL]), which also provides approval. Every effort was made to exclude patients with MS: hospital files of patients with oligoclonal bands (OCB), Barkhof criteria¹⁴ on brain MRI, or nonextensive myelitis were reviewed by an NMO study committee of 7 neurologists.

Epidemiologic data were assessed for each patient including demographic data, medical history, key episodes in the NMO course (relapses, onset of the progressive phase, and dates of assignment of the successive scores of disability), biologic results, neuroimaging data, and treatment. Brain MRIs were classified as normal and abnormal with or without Paty's¹⁵ or Barkhof's criteria. Serum samples from 111 patients were tested for NMO-IgG with an indirect immunofluorescence assay on a substrate of adult rat cerebellum and midbrain, using a previously described technique very similar to the original procedure.^{1,16} The EDSS score was recorded to determine the level of neurologic disability. Severe residual visual loss (SRVL) was defined as a visual acuity $\leq 1/10$ during at least 6 months. We focused on EDSS scores 4, 6, and 7 and the SRVL, since these could be easily ascertained, even by retrospective interview. Visual acuity is included in the visual parameter of the EDSS.

Comparisons of categorical data were made using the χ^2 test. Student *t* test was used for the comparison of quantitative data. The Kaplan-Meier technique was used to estimate the time to the assignment of EDSS scores 4, 6, and 7. Survival curves were compared using the log-rank test. Predictive factors of disability were analyzed using the Cox proportional model. The variables tested were gender, age at onset, disease duration, number of T2 hypersignals on brain MRI at diagnosis, seropositivity for NMO-IgG, presence of OCB and number of white cells in CSF, initial topography of the disease, optico-spinal delay, time between first and second attack, number of attacks during first year after onset, first type of treatment and global treatment received (immunosuppressive treatment [oral or IV], immunomodulatory treatment, or a combination), time between disease onset and first treatment, and number of treatments received. Two-sided *p* values < 0.05 were considered significant. All computations were performed using SPSS for Windows, version 14.0, and curves were realized using GraphPad Prism 4.

RESULTS Clinical and biologic. Clinical and demographic data of patients with NMO are summarized in table 2. The NMO population was mainly Caucasian (87%) with a high proportion of women (female:male ratio, 3:1). Non-Caucasian patients originated from Sub-Saharan Africa (45%), Asia (37%), and Latin America (18%). Mean age at onset was 34.5 ± 13.2 years and in 25.6% of patients onset was either before 18 years (9.6%) or after 50 years (16%). In 90% of patients, the association of optic neuritis, LETM on spinal cord MRI, and Paty-negative initial brain MRI as supportive criteria was sufficient for the diagnosis of NMO according to the 2006 criteria. Thus, NMO-IgG was mandatory for the diagnosis in only 10% of patients. The disease course was relapsing-remitting in 73% and monophasic in 26% of patients, without any difference in terms of gender ($p = 0.33$) or median age at onset (33 years vs 38 years; $p = 0.07$), but a difference was observed in the median time of follow-up

Table 2 Demographic and disease-related characteristics of 125 patients with neuromyelitis optica (NMO)

	NMO
Gender, n (%)	
Female	94 (75.2)
Male	31 (24.8)
Ethnicity, n (%)	
White	74 (87)
Nonwhite	11 (13)
Initial topography, n (%)	
Spinal	57 (45.6)
Optic	46 (36.8)
Optic and spinal	22 (17.6)
Age at onset, y	
Mean \pm SD	34.5 \pm 13.2
Median	34.7
Range	4-66
Distribution, n (%)	
0-18	12 (9.6)
19-29	37 (29.6)
30-49	56 (44.8)
>50 y	20 (16)
Opticospinal interval, mo	
Mean \pm SD	35.6 \pm 48
Median	15
Range	0-264
A1-A2 interval, mo	
Mean \pm SD	30.8 \pm 43.1
Median	12
Range	1-204
Duration of follow-up, y	
Mean \pm SD	10 \pm 7.8
Median	8.7
Range	0.1-39.5
Mean number of attacks after onset	
0-1 y	1.8
0-2 y	2.3
Mean annualized rate of attacks	0.99

Abbreviations: A1 = first attack; A2 = second attack.

(10.7 years vs 7.5 years; $p = 0.04$). Among patients with a monophasic form, 8 (6.4%) experienced only one bifocal attack. A progressive course was observed in 2 patients (1.6%). Of the 111 patients tested, 54% were NMO-IgG-positive. CSF results showed a mean number of lymphocyte cells/mm³ of 23 ± 7.4 , a mean number of polynuclear cells/mm³ of 9 ± 14.7 , a mean protein level of 0.54 ± 0.34 g/L, and OCB in 23.8% of cases. An autoimmune disease was associated in 10.4% of cases, including 4 patients

Table 3 Characteristics of the first spinal and brain MRI in patients with neuromyelitis optica

	Values
Spinal cord	
No. of lesions, mean \pm SD	
Total	1.2 \pm 0.6
Typology of the lesions, n (%)	
Cervical T2	86/103 (83.5)
Cervical T1 gado+	27/45 (60)
Cervical extensive ^a	58/120 (48.3)
Dorsal T2	59/81 (72.8)
Dorsal T1 gado+	21/49 (42.8)
Dorsal extensive ^a	38/120 (31.7)
Brain	
No. of lesions, mean \pm SD	
Total	0.9 \pm 2.4
Periventricular	0.1 \pm 0.6
Juxtacortical	0 \pm 0.1
>9 Lesions	0.1 \pm 0.2
Typology of the lesions, n (%)	
Supratentorial	19/100 (19)
Infratentorial	12/91 (13.2)
Barkhof criteria	2/125 (1.6)
Paty criteria	9/125 (7.2)

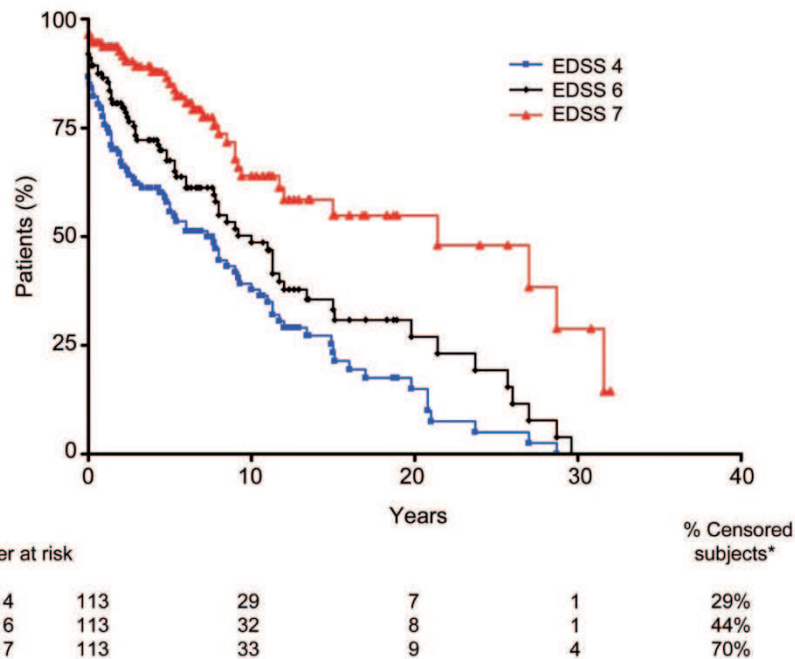
^aMore than 2 vertebral segments.

with lupus erythematosus, 3 with primary Sjögren syndrome, 3 with autoimmune thyroiditis, and 3 with unspecified autoimmune disease.

MRI. Details of the first brain and spinal cord MRI are summarized in table 3. Among the 8 patients with lesions at first brain MRI, without Barkhof or Paty's criteria, aspecific lesions were noted in 2, lesions suggesting vasculitis in 2, and acute disseminated encephalomyelitis with gadolinium enhancement in 4. During the course of the disease, brain MRI remained normal in 93 patients (74.4%). In the remaining 25.6% of patients, we found a mean 3.66 ± 3.22 lesions; among these patients, only 3 (2.4%) met Barkhof's criteria. During the follow-up, 122 patients (97%) presented LETM on at least one spinal cord MRI. Of these 122 patients, 16 were negative for LETM on the first spinal cord MRI.

Course of NMO and disability. During the follow-up, we observed a decrease in the mean number of attacks after 2 years ($p < 0.01$). The mean interval between the 2 first attacks was shorter if the initial topography was bifocal (11.1 months), compared to the spinal form (33.1 months, $p = 0.04$) or the optic

Figure Actuarial survival analysis of patients with neuromyelitis optica (NMO)



Kaplan-Meier estimates of the age of the patients with NMO at the time of assignment of the scores of Expanded Disability Status Scale (EDSS) 4, 6, and 7, according to the initial course of NMO. Among 113 patients, the median time from the onset of NMO to the assignment of EDSS scores 4, 6, and 7 was as follows: score 4, 7 years; score 6, 10 years; score 7, 21 years. *Data on patients who had not reached an endpoint were censored at the time of the last clinical evaluation.

form (34 months, $p = 0.01$). In the whole population of patients with NMO, 80 (70.8%) reached EDSS score 4, 63 (55.8%) reached EDSS score 6, and 33 (29.2%) reached EDSS score 7. Four patients died, at 28, 37, 43, and 44 years of age, during the follow-up, 2 owing to a diffuse brainstem lesion, including 1 after the first attack, and 2 owing to extraneurologic diseases, after a mean follow-up of 9 years. The median time from onset to EDSS 4, 6, and 7 was 7.3 (95% confidence interval [CI] 4.7–9.9), 10 (95% CI 7.4–12.6), and 21.4 (95% CI 8.3–34.5) years, respectively (figure). No correlation was observed between the topography of the first attack and the subsequent EDSS score. After the first episode of myelitis, the median time to an EDSS score of 4, 6, and 7 was 5 (95% CI 1.6–8.3), 8 (95% CI 4.9–11.1), and 21.4 (95% CI 7.7–35.1) years, respectively. The first myelitis attack was immediately followed by an EDSS score of 4 in 19.5% of cases, an EDSS score of 6 in 12.5% of cases, and an EDSS score of 7 in 5.3% of cases.

Visual acuity assessments were collected in 92 patients. Twenty-nine patients (31.5%) experienced a unilateral and 12 (13%) a bilateral SRVL. At the endpoint, mean visual acuity was 5.9/10 in the left eye and 6.3/10 in the right eye. Median time to SRVL was 11.3 years (95% CI 5.8–16.8). According

to the topography of the first attack, statistical differences in survival curves were observed in terms of SRVL, with a more severe visual disability after an opticospinal event (median time of 5.2 years [95% CI 0–12.1]) than after optic neuritis (median time of 10 years [95% CI 0–20.2]) or after myelitis (median time of 15 years [95% CI 4.8–23.3]) (log rank = 0.017). After the first episode of optic neuritis, the median time to SRVL was 11 years (95% CI 3.6–18.4). Among the 41 patients with SRVL, 20 (48.8%) experienced unilateral or bilateral SRVL after the first episode of optic neuritis.

During the follow-up, patients received a mean 1.9 ± 1.4 lines of treatment, including immunosuppressive or immunomodulatory treatments: cyclophosphamide (26%), mycophenolate mofetil (20%), interferon beta (16%), azathioprine (14%), mitoxantrone (12%), glatiramer acetate (3%), rituximab (2.5%), methotrexate (2%), natalizumab (1.5%), and other treatments (3%). The mean time from onset to first treatment was 4.6 ± 5.9 years, divided into 3 treatment classes: immunomodulatory treatment in 20 patients (19%), oral immunosuppressive treatment in 34 (32%), and IV treatment in 52 (49%). In 8 patients, no treatment had been initiated by the end of follow-up (4.9 ± 3.9 years after onset).

Predictive factors of disability. In the univariate survival analysis of EDSS, a late onset of the disease, a short interval between the first 2 attacks, a high number of attacks during the first year of the disease, and the type of treatments received were significantly predictive of the assignment of an EDSS score of 4, 6, or 7. Using the Cox proportional model, we found that the clinical variables had no influence on the time from the onset of NMO to the assignment of an EDSS score of 4, 6, or 7. Because of the presence of confounding factors, due especially to the treatments received, predictive factors isolated with univariate analysis were not positive with multivariate analysis. Patients who were not treated were assigned an EDSS score comparatively later than treated patients and were more likely to be patients with a less severe form of NMO.

In the univariate analysis of SRVL, data of specific interest were age at onset, initial topography of the disease, and number of lesions on brain MRI. Using the Cox proportional model, we found that a high number of lesions on brain MRI was associated with a shorter time from the onset of NMO to the diagnosis of SRVL ($p < 0.01$).

An analysis of both the relapsing-remitting and monophasic groups of patients with NMO did not reveal any differences compared to the whole cohort.

DISCUSSION Our demographic data are in accordance with those of previous studies, especially as regards NMO in a predominantly Caucasian population: female:male ratio 3:1; median age at onset 34.7 years; a predominantly relapsing-remitting course with extremely rare progressive forms (1.6%). Our study is the first to have evaluated the importance of NMO-IgG for the diagnosis of NMO. In 90% of cases, the association of optic neuritis, Paty-negative initial brain MRI, and LETM criteria was sufficient to diagnose NMO. NMO-IgG was necessary to confirm the diagnosis in only 12 cases (10%). In 26% of patients with NMO, the disease began either before 18 years or after 50 years, which is therefore higher than the corresponding figure of 15% reported in patients with MS.¹⁷ Other important information arising from our study includes the median time between the first 2 attacks and the 2 index events, the median survival time in treated patients, and the search for predictive factors of disability. The median delay before a bifocal location in NMO was approximately 1 year. Considering the severity of the pathology, this delay is particularly long and emphasizes the importance of identifying early predictive factors for developing NMO. To this end, NMO-IgG may be of interest as a means of predicting evolution to definite NMO, as shown in previous studies.¹⁸⁻²⁰

Concerning disease severity, multivariate analysis did not allow us to identify predictors of a poor evolution, other than a high number of MRI brain lesions, which was predictive of a residual visual acuity $\leq 1/10$.

In our cohort, there was a relatively low proportion of cases with a monophasic course compared to other series.^{9,21} It should be noted, however, that in those studies, the longer the follow-up, the lower the proportion of monophasic cases. Another potential source of bias is the severity of the optic and spinal attacks in NMO. The early massive destruction of these areas may lead to further, asymptomatic attacks, despite an ongoing inflammatory process. In a study on a population of Afro-Caribbean patients with NMO, the median time to unilateral SRVL was 2 years, compared to 11 years in our study.²² The apparent good prognosis of optic neuritis in our Caucasian patients may well be linked to the lower rate of optic neuritis attack and the efficacy of the immunosuppressive treatment, since the patients in the non-Caucasian study were not treated. It is noteworthy that the proportion of patients who experienced blindness in at least one eye after the first optic neuritis was similar: 30% in the non-Caucasian NMO population and 22% in our Caucasian NMO population.

Using multivariate analysis, we were unable to identify any risk factors that could predict the EDSS in NMO. To date, only one study has used this statistical approach in order to identify predictive factors for the development of a progressive course.¹¹ The only available data concerning predictive factors for disability were published by the Italian Devic's Study Group,⁶ but were obtained using univariate analysis without consideration of confounding factors. Another approach would be to evaluate predictive factors for treatment efficacy, according to the type of immunosuppressive therapy. In the only published study with data on the median time to EDSS scores 3, 6, and 8, no information was given about the treatments received, thus making it difficult to analyze the results.⁶ A retrospective evaluation of the efficacy of treatment is clearly difficult, with many potential biases. In our retrospective study, the main bias is that treatment was given according to the severity of the NMO. Untreated patients therefore had a less severe disease than treated patients.

We found that the number of lesions on MRI during the disease may be indicative of the outcome of an SRVL. This observation could be a reflection of the intensity of the inflammatory process, as observed in children presenting diffuse cerebral abnormalities on MRI and a high level of autoimmune activity.^{23,24} Another physiopathologic explanation is

the extension of the inflammation behind the optic nerves, involving the optic chiasma or tracts. This finding indicates that the brain tropism of NMO may be a source of visual disability and suggests that particular attention should be given to these patients, who may have been diagnosed with MS.

In 2008, new NMO criteria were proposed.²⁵ In contrast to the 2006 criteria, the 2008 criteria consider LETM and the absence of other autoimmune disease to be strictly required for the diagnosis. Out of our cohort of 125 patients, 16 would not have fulfilled these new criteria: 3 patients without LETM and 13 patients with other autoimmune disease. However, among the 3 patients without LETM, only one had a progressive course. For these 3 patients, the median follow-up was 1.6 years and the rate of relapse was 1.7 attacks/year/patient. The possibility of them subsequently developing more severe attacks with LETM cannot therefore be ruled out. This suggests that the 2008 criteria may lack sensitivity, especially at the beginning of NMO. Furthermore, the importance of NMO-IgG for NMO diagnosis should not be overestimated; in our study the test was positive in only 54% of the 111 patients tested and was necessary in order to confirm the diagnosis in only 10% of the whole cohort of patients.

In addition to being retrospective, our study has other limitations. First, we included only patients who were hospitalized at least once during the follow-up. Second, the low proportion of deaths compared to other studies may have been due to a selection bias, since all of our patients were being followed up at the start of the study. Third, the delayed survival time observed for an EDSS score of 7 may have been overestimated because of a bias. Disease severity in the high number of censored patients 10 years after NMO onset is unknown and may have influenced the survival curves after this point.

However, our study contains the largest body of data published to date on patients with NMO. Our demographic data confirm the results of previous studies and provide new data on disability in a treated population. Our results argue in favor of early intensive treatment, especially in patients with frequent relapses at the beginning of the disease. The number of brain lesions on MRI during the follow-up should be seen as an indication of the risk of severe visual loss. A prospective study is now needed to define the course of the disease and provide an accurate assessment of the impact of immunosuppressive therapies in NMO.

AUTHOR AFFILIATIONS

From the Department of Neurology (N.C., F. Blanc, M.F., J.d.S.), Strasbourg University Hospital; Department of Neurology (R.M., S.V., C.R., C.C.), Lyon University Hospital; Department of Neurology (H.Z., O.O.,

P.V.), Lille University Hospital; Federation of Neurology (C.P., B.F.), Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris; Department of Neurology (M.T.), Saint-Joseph Hospital, Paris; Department of Neurology (D.B., M.C.), Toulouse University Hospital; Departments of Pediatrics (M.M.) and Neurology (J.P., B.A.), Marseille University Hospital; Department of Neurology (A.R., B. Brochet), Bordeaux University Hospital; Department of Neurology (C.L.-F.), Nice University Hospital; Department of Neurology (E.T., W.C.), Montpellier University Hospital; Department of Neurology (M.D.), Nancy University Hospital; Creteil Hospital (A.C.); Department of Neurology (T.M.), Dijon University Hospital; Department of Neurology (P.L., G.C.), Nîmes University Hospital; Department of Neurology (G.E., E.L.P.), Rennes University Hospital; Department of Neurology (G.D.), Caen University Hospital; Pau Hospital (B. Barroso); Poissy Hospital (O.H.); Department of Neurology (O.G.), Rothschild Foundation Hospital, Paris; Department of Neurology (D.R.), University Hospital of Trousseau, Paris; Department of Neurology (S.W., D.L.), Nantes University Hospital; the Department of Neurology (F.B.), Grenoble University Hospital; Avignon Hospital (P.T.); and Chartres Hospital (J.G.), France.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Vidjeyabardi Brice for technical and material support, Dr. Ilhem Slassi and Dr. Stéphane Berroir for providing clinical information on individual cases, and Prof. Pierre Weber for statistical assistance. Statistical analysis was performed by C. Ritleng, Neuroepidemiology and Neuropharmacology Unit, Hospital Pierre Wertheimer, Lyon; and Prof. P. Meyer, Public Health Center, Hospices Civils, Strasbourg, France.

DISCLOSURE

Dr. Collongues, Dr. Marignier, Dr. Zéphir, Dr. Papeix, Dr. Blanc, Dr. Ritleng, Dr. Tchikviladze, and Dr. Outteryck report no disclosures. Dr. Vukusic has received travel expenses and/or honoraria for lectures or educational activities not funded by industry; has received funding for travel from Biogen Idec and Merck Serono; and has received honoraria from the Serono Symposia MS Foundation. Dr. Fleury reports no disclosures. Dr. Fontaine serves on the editorial boards of *Gene and Immunity*, the *Journal of Neurology*, *Neurosurgery and Psychiatry*, *Revue Neurologique*, and the *Journal of Neurology*; receives research support from Biogen Idec, sanofi-aventis, Merck Serono, INSERM (National Research Agency), the University Pierre and Marie Curie, Association Française contre les myopathies, and Association pour la Recherche sur la Sclérose en Plaques (ARSEP). Dr. Brassat receives research support from the French Ministry of Health, the French Multiple Sclerosis Society 2005, and the European Union. Dr. Clanet serves on an independent data monitoring committee for Genmab A/S; serves as Clinical Editor of the *International MS journal* and on the editorial board of *Revue Neurologique*; and has received honoraria from Bayer Schering Pharma. Dr. Milh reports no disclosures. Dr. Pelletier serves on scientific advisory boards for Biogen Idec and Novartis and has received research support from ARSEP. Dr. Audoin and Dr. Ruet report no disclosures. Dr. Lebrun-Frenay has received travel expenses and/or honoraria for lectures or educational activities not funded by industry; serves on the editorial board of *Revue Neurologique*; has received speaker honoraria from Biogen Idec, Bayer Schering Pharma, Merck Serono, sanofi-aventis, and Teva Pharmaceutical Industries Ltd.; and serves as a consultant to Institut National de Recherche en Informatique et en Automatique (INRIA). Dr. Thouvenot receives research support from ARSEP. Dr. Camu has received consulting fees from sanofi-aventis and Merck Serono. Dr. Debouverie has served on a scientific advisory board for Bayer Schering Pharma; has received travel expenses and/or honoraria for lectures or educational activities not funded by industry; and has received honoraria for speaking engagements or educational activities for Biogen Idec, Merck Serono, Bayer Schering Pharma, Teva Pharmaceutical Industries Ltd., and sanofi-aventis. Dr. Créange serves on a scientific advisory board for Bayer Schering Pharma; serves on the editorial advisory board of *Revue Neurologique* and has received honoraria for speaking engagements or educational activities for Biogen Idec, LFB, Merck Serono, Bayer Schering Pharma, Teva Pharmaceutical Industries Ltd., and sanofi-aventis. Dr. Moreau has served on scientific advisory boards for Bayer Schering Pharma and sanofi-aventis; has received travel expenses and/or honoraria for lectures or educational activities not funded

by industry; has received honoraria for speaking engagements or educational activities for Biogen Idec, Merck Serono, Bayer Schering Pharma, Teva Pharmaceutical Industries Ltd., and sanofi-aventis; and serves as Chief Editor for *La Lettre du Neurologue*. Dr. Labauge and Dr. Castelnovo report no disclosures. Dr. Edan serves on scientific advisory boards for Bayer Schering Pharma, LFB, Biogen Idec, and Teva Pharmaceutical Industries Ltd.; has received speaker honoraria from the Serono Foundation; has received/receives research support to his institution from Merck Serono, Teva Pharmaceutical Industries Ltd., and Bayer Schering Pharma; and receives research support from PHRC: Programme de Recherche Clinique (health ministry) and ARSEP. Dr. Le Page reports no disclosures. Dr. Defer serves as a Chief Associated Editor of *Revue Neurologique*; serves on scientific advisory boards for Biogen Idec, Novartis, and Teva Pharmaceutical Industries Ltd.; has received funding for travel and/or speaker honoraria from Merck Serono, Biogen Idec, and Teva Pharmaceutical Industries Ltd.; and has received research support to his department from Merck Serono, Biogen Idec and sanofi-aventis. Dr. Barroso serves on a scientific advisory board for Biogen Idec and has received honoraria from the Serono Foundation. Dr. Gout serves on scientific advisory boards for Merck Serono, Biogen Idec, Teva Pharmaceutical Industries Ltd., and sanofi-aventis; and has received funding for travel and/or speaker honoraria from Merck Serono, Biogen Idec, Bayer Schering Pharma, and Teva Pharmaceutical Industries Ltd. Dr. Rodriguez, Dr. Wiertelwski, Dr. Laplaud, Dr. Borgel, and Dr. Tourniaire report no disclosures. Dr. Grimaud has received funding for travel from Bayer Schering Pharma; serving on the editorial committee of *La Lettre du Neurologue*; and has received honoraria for educational activities not funded by industry. Dr. Brochet serves on a scientific advisory board for Bayer Schering Pharma; has received travel expenses for lectures or educational activities not funded by industry; serves as a Associate Editor of *SEP et Neurosciences*; has received speaker honoraria from Novartis, Teva Pharmaceutical Industries Ltd., and sanofi-aventis; and receives research support to his institution from Merck Serono and Bayer Schering Pharma. Dr. Vermersch serves on scientific advisory boards for Merck Serono, Biogen Idec, Bayer Schering Pharma, Teva Pharmaceutical Industries Ltd., and sanofi-aventis; has received funding for travel and/or speaker honoraria from Merck Serono, Biogen Idec, and Bayer Schering Pharma; and receives research support from Merck Serono and Biogen Idec. Dr. Confavreux has received travel expenses and/or honoraria for lectures or educational activities not funded by industry; has received honoraria from the Serono Symposia Foundation; serves as a consultant for sanofi-aventis, Genzyme Corporation, UCB, Roche, and Novartis; and has received research funds from Biogen Idec, Bayer Schering Pharma, Merck Serono, Teva Pharmaceutical Industries Ltd., and sanofi-aventis to support the EDMUS project (European Database for multiple Sclerosis). Dr. de Seze serves on scientific advisory boards for and has received honoraria from Biogen Idec, LFB, Merck Serono, sanofi-aventis, and Bayer Schering Pharma; and serves on the editorial board of *Revue Neurologique*.

Received July 29, 2009. Accepted in final form December 2, 2009.

REFERENCES

- Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 2004;364:2106–2112.
- Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 2006;66:1485–1489.
- Bichueti DB, Oliveira EM, Souza NA, Rivero RL, Gabbai AA. Neuromyelitis optica in Brazil: a study on clinical and prognostic factors. *Mult Scler* 2009;15:613–619.
- Cabre P, Heinzle O, Merle H, et al. MS and neuromyelitis optica in Martinique (French West Indies). *Neurology* 2001;56:507–514.
- de Seze J, Stojkovic T, Ferriby D, et al. Devic's neuromyelitis optica: clinical, laboratory, MRI and outcome profile. *J Neurol Sci* 2002;197:57–61.
- Ghezzi A, Bergamaschi R, Martinelli V, et al. Clinical characteristics, course and prognosis of relapsing Devic's neuromyelitis optica. *J Neurol* 2004;251:47–52.
- O'Riordan JI, Gallagher HL, Thompson AJ, et al. Clinical, CSF, and MRI findings in Devic's neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;60:382–387.
- Papais-Alvarenga RM, Miranda-Santos CM, Puccioni-Sohler M, et al. Optic neuromyelitis syndrome in Brazilian patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;73:429–435.
- Rivera JF, Kurtzke JF, Booth VJ, Corona VT. Characteristics of Devic's disease (neuromyelitis optica) in Mexico. *J Neurol* 2008;255:710–715.
- Wingerchuk DM, Weinshenker BG. Neuromyelitis optica: clinical predictors of a relapsing course and survival. *Neurology* 2003;60:848–853.
- Wingerchuk DM, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Lennon VA, Weinshenker BG. A secondary progressive clinical course is uncommon in neuromyelitis optica. *Neurology* 2007;68:603–605.
- Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33:1444–1452.
- Confavreux C, Compston DA, Hommes OR, McDonald WI, Thompson AJ. EDMUS, a European database for multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:671–676.
- Barkhof F, Filippi M, Miller DH, et al. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* 1997;120:2059–2069.
- Paty DW, Oger JJ, Kastrukoff LF, et al. MRI in the diagnosis of MS: a prospective study with comparison of clinical evaluation, evoked potentials, oligoclonal banding, and CT. *Neurology* 1988;38:180–185.
- Marignier R, De Seze J, Vukusic S, et al. NMO-IgG and Devic's neuromyelitis optica: a French experience. *Mult Scler* 2008;14:440–445.
- Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000;343:1430–1438.
- de Seze J, Arndt C, Jeanjean L, et al. Relapsing inflammatory optic neuritis: is it neuromyelitis optica? *Neurology* 2008;70:2075–2076.
- Matiello M, Lennon VA, Jacob A, et al. NMO-IgG predicts the outcome of recurrent optic neuritis. *Neurology* 2008;70:2197–2200.
- Weinshenker BG, Wingerchuk DM, Vukusic S, et al. Neuromyelitis optica IgG predicts relapse after longitudinally extensive transverse myelitis. *Ann Neurol* 2006;59:566–569.
- Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology* 1999;53:1107–1114.
- Merle H, Olindo S, Bonnan M, et al. Natural history of the visual impairment of relapsing neuromyelitis optica. *Ophthalmology* 2007;114:810–815.
- Lotze TE, Northrop JL, Hutton GJ, Ross B, Schiffman JS, Hunter JV. Spectrum of pediatric neuromyelitis optica. *Pediatrics* 2008;122:1039–1047.
- McKeon A, Lennon VA, Lotze T, et al. CNS aquaporin-4 autoimmunity in children. *Neurology* 2008;71:93–100.
- Miller D, Weinshenker B, Filippi M, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler* 2008;14:1157–1174.

**B. Suivi à long terme des patients ayant une NMO à
début pédiatrique (*Article 2*)**

Long-term follow-up of neuromyelitis optica with a pediatric onset

N. Collongues, MD
 R. Marignier, MD
 H. Zéphir, MD
 C. Papeix, MD
 B. Fontaine, MD, PhD
 F. Blanc, MD
 D. Rodriguez, MD
 M. Fleury, MD
 S. Vukusic, MD
 J. Pelletier, MD, PhD
 B. Audoin, MD, PhD
 E. Thouvenot, MD
 W. Camu, MD
 B. Barroso, MD
 A. Ruet, MD
 B. Brochet, MD, PhD
 P. Vermersch, MD, PhD
 C. Confavreux, MD,
 PhD
 J. de Seze, MD, PhD

Address correspondence and reprint requests to Dr. N. Collongues, Department of Neurology, University Hospital of Strasbourg, 1, Place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France
 nicolas.collongues@chru-strasbourg.fr

ABSTRACT

Background: Neuromyelitis optica (NMO) is a rare inflammatory disease. Average age at onset is 35 years. Few data exist on patients with pediatric-onset NMO (p-NMO), with disease onset before age 18 years. We report the clinical and paraclinical features and long-term outcome of patients with p-NMO and compare them with a large adult-onset NMO (a-NMO) cohort.

Methods: We performed a retrospective, multicenter study of patients with p-NMO in pediatric and adult medical centers. We identified 125 patients with NMO (12 p-NMO; 113 a-NMO) fulfilling the 2006 criteria. Data were collected using hospital files and standardized assessment forms for NMO.

Results: Patients with p-NMO were followed up during a mean 19.3 years. Median age at onset was 14.5 years (4.1–17.9) with a female:male ratio of 3:1. Three patients (25%) fulfilled Paty criteria for multiple sclerosis on first brain MRI, including one patient with acute disseminated encephalomyelitis. Median interval between onset and residual Expanded Disability Status Scale (EDSS) score 4 was 20.7 years, score 6 was 26 years, and score 7 was 28.7 years. Median interval between onset and residual visual loss $\leq 1/10$ was 1.3 years. Compared with a-NMO, p-NMO showed a longer time to EDSS scores 4 and 6, largely explained by the severity of the first myelitis in the a-NMO group. Time to first treatment was longer in the p-NMO group (13.1 vs 3.4 years).

Conclusion: Patients with p-NMO can present a diffuse inflammatory process on first brain MRI and have a longer time to disability than patients with a-NMO. *Neurology*® 2010;75:1084–1088

GLOSSARY

a-NMO = adult-onset neuromyelitis optica; **EDSS** = Expanded Disability Status Scale; **IgG** = immunoglobulin G; **LETM** = longitudinal extensive transverse myelitis; **MS** = multiple sclerosis; **NMO** = neuromyelitis optica; **p-NMO** = pediatric-onset neuromyelitis optica; **SRVL** = severe residual visual loss.

Neuromyelitis optica (NMO) is a rare inflammatory disease occurring at an average age of 35 years (range 4–66).^{1–3} Apart from case reports,^{4,5} only 2 recent retrospective studies have contributed to epidemiologic and laboratory data on children with NMO: one on 17 children fulfilling the 1999 NMO criteria followed up for an average of 3 years and the other on 9 children fulfilling the 2006 NMO criteria followed up for an average of 4 years.^{1,6}

Pediatric-onset NMO (p-NMO) is especially characterized by frequent brain involvement at presentation, expressed clinically by encephalopathy or seizure associated with multiple sclerosis (MS)-like lesions on brain MRI.^{1,6} Laboratory findings revealed a high prevalence of NMO-immunoglobulin G (IgG) positivity (78%) in the relapsing population but NMO-IgG positivity was estimated at 12.5% in the population with a monophasic disease course.¹

However, there are currently no data on time to disability in patients with p-NMO during a long follow-up. Furthermore, no study has compared p-NMO with adult-onset NMO (a-NMO), analyzed with the same design and using the same inclusion criteria.

We report the clinical and paraclinical features and long-term outcome of patients with p-NMO and compare them with a large a-NMO cohort.

From the Strasbourg University Hospital (N.C., F.B., M.F., J.d.S.), Strasbourg; Lyons University Hospital (R.M., S.V., C.C.), Lyons; Lille University Hospital (H.Z., P.V.), Lille; Pitié-Salpêtrière Hospital (C.P., B.F.), Paris; Trousseau University Hospital (D.R.), Paris; Marseille University Hospital (J.P., B.A.), Marseille; Montpellier University Hospital (E.T., W.C.), Montpellier; Pau Hospital (B. Barroso), Pau; and Bordeaux University Hospital (A.R., B. Brochet), Bordeaux, France.

Disclosure: Author disclosures are provided at the end of the article.

Table 1 Demographic, clinical, and paraclinical characteristics of patients with pediatric-onset NMO

Patient no.	Sex	Age at onset, y	Race	Follow-up, y	Topography of the first attack	Opticospinal interval, mo	First interattack interval, mo	ARR	CSF			First spinal MRI		First brain MRI		Treatments used
									NMO-IgG	OCB	WBC/mm ³	No. of lesions	Location of LETM	No. of lesions	MS criteria (Paty/Barkhof)	
1	F	4.1	Asian	3.7	ON	12	12	0.8	+	-	28	2	C+T	1	-/-	-
2	F	7.8	White	32.7	ON	264	154	0.3	+	-	5	1	-	0	-/-	INF, AZA
3	F	8	Black	9.3	SC	7	7	0.9	+	-	12	1	-	2	-/-	INF, CYC, MMF
4	F	10.3	White	28.7	SC	12	12	0.5	+	-	11	1	C	4	+/-	AZA
5	M	11.9	White	15.2	ON	18	8	1.6	-	-	3	1	C	0	-/-	MITO, AZA, MMF
6	F	14.5	American Indian	28.7	OS	0	48	0.1	+	-	4	1	T	0	-/-	CYC
7	M	14.7	Asian	23.7	ON	75	75	0.2	+	-	128	1	CT	0	-/-	CYC, RTX
8	F	15.3	White	24.7	SC	137	137	0.6	-	-	110	2	C	6	+/-	INF, MMF, CYC
9	F	16.1	White	31.3	ON	15	15	0.4	+	+	4	2	C	10	+/-	AZA
10	F	17	White	13.7	ON	22	22	0.8	-	+	0	1	-	0	-/-	INF
11	M	17.2	White	15.7	SC	12	12	0.2	-	ND	ND	2	T	0	-/-	CYC, MMF
12	F	17.9	White	4.3	SC	70	17	1.2	+	+	3	1	C	1	-/-	GA, INF

Abbreviations: ARR = annualized relapse rate of attacks; AZA = azathioprine; C = cervical; CT = cervicthoracic; CYC = cyclophosphamide; GA = glatiramer acetate; IgG = immunoglobulin G; INF = interferon; LETM = longitudinal extensive transverse myelitis; MITO = mitoxantrone; MMF = mycophenolate mofetil; MS = multiple sclerosis; ND = not done; NMO = neuromyelitis optica; OCB = oligoclonal bands; ON = optic nerve; OS = opticospinal; RTX = rituximab; SC = spinal cord; T = thoracic; WBC = white blood cells.

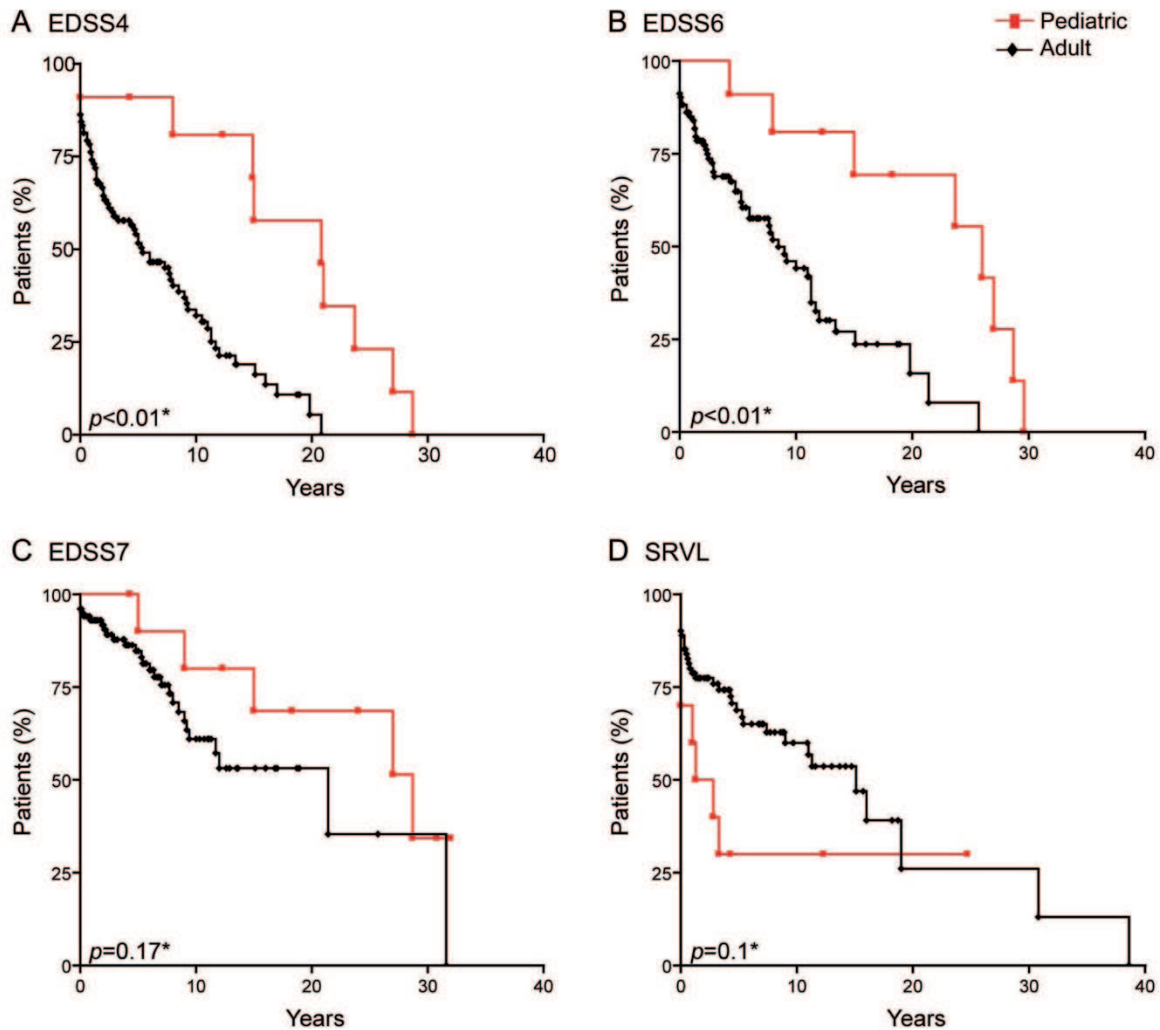
METHODS We retrospectively studied patients with p-NMO in 25 pediatric and adult medical centers in France. Through the Club Francophone de la Sclérose en Plaques, a French network of MS centers, we identified 200 patients with suspected NMO from September 2007 through August 2008, the study endpoint. Seventy-five experienced isolated optic neuritis/longitudinal extensive transverse myelitis (LETM) or MS. The remaining 125 fulfilled the 2006 criteria for NMO, namely optic neuritis, myelitis, and at least 2 of the following 3 items: LETM, NMO-IgG seropositivity, and brain MRI not meeting Paty criteria for MS.⁷ In this cohort, we identified 12 patients with p-NMO (onset before 18 years of age) and 113 with a-NMO. Data were collected from hospital files or using standardized assessment forms designed for NMO and have been entered in the European Database for MS, adapted to NMO specificities.⁸ Ethical approval, data confidentiality, and security were ensured in keeping with the recommendations of the French data protection authority, which approved the study.

For each patient, we recorded demographic data (gender, race, age at onset, follow-up), medical history of attacks and disability, laboratory data (NMO-IgG, CSF), MRI data (number and location of lesions), and treatments (type and number). Brain MRIs were classified as either not fulfilling or fulfilling MS criteria (Barkhof or Paty) and were performed a mean 84 ± 139 months after the first clinical event. Spinal cord MRIs were performed a mean 26 ± 13 months after the first clinical event. Sera of 111 patients were tested for NMO-IgG in Lyon, France, using an indirect immunofluorescence assay, as previously described.⁹ Residual disability was assessed during at least 6 months in terms of Expanded Disability Status Scale (EDSS) score and severe residual visual loss (SRVL), defined as a visual acuity $\leq 1/10$ (corresponding to +1 on logMAR or 20/200 on Snellen visual acuity charts).

Categorical data were compared using the χ^2 test and quantitative data using the Mann-Whitney test. The Kaplan-Meier technique was used to estimate time to assignment of EDSS scores. Survival curves were compared using the log-rank test. Two-sided *p* values < 0.05 were considered significant. All computations were performed using SPSS for Windows, version 14.0.

RESULTS Characteristics and long-term outcome of patients with p-NMO. Twelve children were followed up during a mean 19.3 years. Table 1 shows their clinical and paraclinical characteristics. Three patients (25%) fulfilled Paty criteria for MS on first brain MRI, including one patient with acute disseminated encephalomyelitis. During the course of the disease, patient 10 developed LETM and patient 8 experienced a regression of the brain MRI lesions, and both were also considered as NMO. The course of NMO was relapsing-remitting in all p-NMO cases. The median interval between onset and disability was 20.7 years for EDSS score 4, 26 years for EDSS score 6, and 28.7 years for EDSS score 7, and was 1.3 years for SRVL (figure). The median interval between the first myelitis and the assignment of EDSS scores 4, 6, and 7 was as follows: 15 years for score 4, 23.7 years for score 6, and 27 years for score 7. No patient reached an EDSS score ≥ 4 immediately after the first myelitis. After the first optic neuritis, median time to SRVL was 1.3 years.

Figure Actuarial survival analysis of patients with neuromyelitis optica (NMO), according to age at onset



Kaplan-Meier estimates of time from NMO onset to the assignment of Expanded Disability Status Scale (EDSS) scores 4 (A), 6 (B), and 7 (C) and to severe residual visual loss (SRVL) (D) in patients with NMO with pediatric (p-NMO) or adult onset (a-NMO). Compared to patients with a-NMO ($n = 101$), patients with p-NMO ($n = 12$) had a longer median time to EDSS 4 (20.7 vs 5.3 years; $p < 0.01$) and EDSS 6 (26 vs 8.5 years; $p < 0.01$), whereas no difference was found for median time to either EDSS 7 (28.7 vs 21.4; $p = 0.17$) or SRVL (1.3 vs 15.1; $p = 0.1$). *Log-rank test was used to compare survival curves.

Comparison between p-NMO and a-NMO cohorts.

Table 2 compares the p-NMO and a-NMO cohorts. Brain MRI fulfilled Paty criteria in 3 patients (25%) in the p-NMO group and 8 patients (7.1%) in the a-NMO group, but the difference did not reach significance. No differences were found in either the number or aspect of spinal cord lesions on MRI.

Compared to patients with a-NMO, patients with p-NMO had a longer interval before EDSS scores of 4 and 6 but not 7 (figure). The interval between the first myelitis and EDSS score assignment was longer in the p-NMO than in the a-NMO cohort for EDSS scores 4 (15 vs 4.4 years; $p = 0.04$) and 6 (23.7 vs 7.7 years; $p < 0.01$), but not 7 (27 vs 21.5 years; $p = 0.22$). The first myelitis attack was immediately followed by EDSS scores of 4 in 21.6%,

6 in 13.7%, and 7 in 5.9% of a-NMO cases. After the first optic neuritis, time to SRVL was 1.3 years in the p-NMO and 11.3 years in the a-NMO cohort ($p = 0.06$).

DISCUSSION Our study underlines 2 points: the first brain MRI in p-NMO can show a diffuse inflammatory process, such as MS lesions (2 patients) or acute disseminated encephalomyelitis (1 patient); similarly to pediatric MS, p-NMO seems to have a better prognosis than a-NMO in terms of disability: time from onset to EDSS scores 4 and 6 was longer in patients with p-NMO, largely explained by the severity of the first myelitis in the a-NMO group.

To date, there is no explanation for the high level of inflammation in the brain of children with

Table 2 Demographic, disease-related, and paraclinical characteristics of the 125 patients with NMO, as a function of age at onset

	Pediatric (n = 12)	Adult (n = 113)	p
Demographic data			
Female:male ratio	9:3	85:28	0.74 ^a
White:nonwhite ratio ^b	8:4	66:7	0.07 ^a
Age at onset, y, median (range)	14.5 (4.1–17.9)	33.8 (19.1–66.3)	
Duration of follow-up, y, median (range)	19.3 (3.7–32.7)	8.8 (0.1–39.5)	<0.01 ^c
Clinical history			
Patients with spinal attack as first event, n (%)	5 (41.7)	52 (46)	0.51 ^a
Patients with ON attack as first event, n (%)	6 (50)	40 (35.4)	
Patients with optospinal attack as first event, n (%)	1 (8.3)	21 (18.6)	
Optospinal interval, mo, median (range)	18 (0–264)	15 (0–204)	0.29 ^c
First interattack interval, mo, median (range)	17 (7–154)	12 (1–204)	0.08 ^c
Mean annualized rate of attacks	0.6	1	0.28 ^c
Treatments			
Patients treated first with IM, n (%)	1 (8.3)	6 (5.3)	0.75 ^a
Patients treated first with IS, n (%)	8 (66.7)	71 (62.8)	
Patients treated first with IM and IS, n (%)	2 (16.6)	29 (25.7)	
Time from onset to first treatment, y, mean ± SD	13.1 ± 9.3	3.4 ± 4.8	<0.01 ^c
No. of treatments used, mean ± SD	1.7 ± 1.2	2.2 ± 1.7	0.23 ^c
Laboratory findings			
Patients with NMO-IgG, ^d n (%)	8 (66.7)	52 (52.5)	0.43 ^a
Patients with OCB, ^e n (%)	3 (27.3)	21 (26.2)	0.96 ^a
No. of WBC in CSF, ^f mean ± SD	28 ± 45.8	33.6 ± 65.2	0.59 ^c
First brain MRI			
No. of lesions, mean ± SD	2 ± 3.2	0.7 ± 2.2	0.06 ^c

Abbreviations: IgG = immunoglobulin G; IM = immunomodulatory; IS = immunosuppressive; NMO = neuromyelitis optica; OCB = oligoclonal bands; ON = optic neuritis; WBC = white blood cells.

* Significant.

^a χ^2 test.

^b Data were available for 85 patients, including all pediatric NMO cases.

^c Mann-Whitney test.

^d NMO-IgG was tested for 111 patients, including all pediatric NMO cases.

^e OCB was tested for 91 patients, including 11 pediatric NMO cases.

^f WBC in CSF was available for 76 patients, including 11 pediatric NMO cases.

NMO.^{1,3,6} The short time to SRVL in the patients with p-NMO is in accordance with the predictive role of the number of lesions on brain MRI for SRVL in NMO and a possible susceptibility of the optic nerve to inflammation.²

The good prognosis of patients with p-NMO is in line with a retrospective chart review, in which 9 patients with p-NMO experienced good visual and motor recovery after corticotherapy, with the absence of sequelae during an average 5-year follow-up.¹⁰ However, response to treatment is unlikely to be the sole explana-

tion for the good prognosis, given the long interval before the first treatment in the p-NMO group.

Due to the retrospective design of this study, selection bias may limit the interpretation of the results. We cannot exclude the possibility that patients with severe p-NMO had died or were otherwise lost to follow-up at the time of the study. The predominant recruitment of patients in adult centers may have led to benign forms of p-NMO being underrepresented. No difference was found in the number of brain MRI lesions between the a-NMO and p-NMO groups. This may be due to a lack of statistical power due to the small number of p-NMO cases and the long delay in some cases between the first clinical event and the first brain MRI. Finally, the outcome of treatment is difficult to assess given the many different treatments used in the patients with p-NMO.

Prospective studies are needed to determine the disease course in children and assess the impact of immunosuppressive therapies in p-NMO.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Vidjeyabaradi Brice for technical and material support, Prof. Pierre Meyer for statistical assistance, and Nick Barton for language editing.

DISCLOSURE

Dr. Collongues, Dr. Marignier, Dr. Zéphir, and Dr. Papeix report no disclosures. Dr. Fontaine serves on the editorial boards of *Gene and Immunity*, the *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *Revue Neurologique*, and the *Journal of Neurology*; and receives research support from Biogen Idec, Sanofi-Aventis, Merck Serono, INSERM (National Research Agency), the University Pierre and Marie Curie, Association Française contre les myopathies, and Association pour la Recherche sur la Sclérose en Plaques (ARSEP). Dr. Blanc, Dr. Rodriguez, and Dr. Fleury report no disclosures. Dr. Vukusic has received travel expenses and/or honoraria for lectures or educational activities not funded by the industry; has received funding for travel from Biogen Idec and Merck Serono; and has received honoraria from the Sero Symposia MS Foundation. Dr. Pelletier serves on scientific advisory boards for Biogen Idec and Novartis and has received research support from ARSEP. Dr. Audoin reports no disclosures. Dr. Thouvenot receives research support from ARSEP. Dr. Camu has received consulting fees from Sanofi-Aventis and Merck Serono. Dr. Barroso serves on a scientific advisory board for Biogen Idec and has received honoraria from the Sero Foundation. Dr. Ruet reports no disclosures. Dr. Brochet serves on a scientific advisory board for Bayer Schering Pharma; serves as a Associate Editor of *SEP et Neurosciences*; has received speaker honoraria from Novartis, Teva Pharmaceutical Industries Ltd., and Sanofi-Aventis; and receives research support to his institution from Merck Serono and Bayer Schering Pharma. Dr. Vermersch serves on scientific advisory boards for Merck Serono, Biogen Idec, Bayer Schering Pharma, Teva Pharmaceutical Industries Ltd., and Sanofi-Aventis; has received funding for travel and/or speaker honoraria from Merck Serono, Biogen Idec, and Bayer Schering Pharma; and receives research support from Merck Serono and Biogen Idec. Dr. Confavreux has received honoraria from the Sero Symposia Foundation; serves as a consultant for Sanofi-Aventis, Genzyme Corporation, UCB, Roche, and Novartis; and has received research funds from Biogen Idec, Bayer Schering Pharma, Merck Serono, Teva Pharmaceutical Industries Ltd., and Sanofi-Aventis to support the EDMUS project (European Database for multiple Sclerosis). Dr. de Seze serves on scientific advisory boards for and has received honoraria from Biogen Idec, LFB, Merck Serono, Sanofi-Aventis, and Bayer Schering Pharma; and serves on the editorial board of *Revue Neurologique*.

Received January 19, 2010. Accepted in final form May 26, 2010.

REFERENCES

1. Banwell B, Tenenbaum S, Lennon VA, et al. Neuromyelitis optica-IgG in childhood inflammatory demyelinating CNS disorders. *Neurology* 2008;70:344–352.
2. Collongues N, Marignier R, Zephir H, et al. Neuromyelitis optica in France: a multicenter study of 125 patients. *Neurology* 2010;74:736–742.
3. McKeon A, Lennon VA, Lotze T, et al. CNS aquaporin-4 autoimmunity in children. *Neurology* 2008;71:93–100.
4. Hudson LA, Bernard TJ, Tseng BS, Miller BR, Corboy JR. Neuromyelitis optica immunoglobulin G in a child. *Pediatr Neurol* 2006;35:370–372.
5. Loma IP, Asato MR, Filipink RA, Alper G. Neuromyelitis optica in a young child with positive serum autoantibody. *Pediatr Neurol* 2008;39:209–212.
6. Lotze TE, Northrop JL, Hutton GJ, Ross B, Schiffman JS, Hunter JV. Spectrum of pediatric neuromyelitis optica. *Pediatrics* 2008;122:e1039–e1047.
7. Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 2006;66:1485–1489.
8. Confavreux C, Compston DA, Hommes OR, McDonald WI, Thompson AJ. EDMUS, a European database for multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:671–676.
9. Marignier R, De Seze J, Vukusic S, et al. NMO-IgG and Devic's neuromyelitis optica: a French experience. *Mult Scler* 2008;14:440–445.
10. Jeffery AR, Buncic JR. Pediatric Devic's neuromyelitis optica. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1996;33:223–229.

C. Les formes dites « bénignes » de NMO (*Article 3*)

ORIGINAL CONTRIBUTION

A Benign Form of Neuromyelitis Optica

Does It Exist?

Nicolas Collongues, MD; Philippe Cabre, MD, PhD; Romain Marignier, MD; Hélène Zéphir, MD; Caroline Papeix, MD; Bertrand Audoin, MD, PhD; Christine Lebrun-Frenay, MD; Jean Pelletier, MD, PhD; Bertrand Fontaine, MD, PhD; Patrick Vermersch, MD, PhD; Christian Confavreux, MD, PhD; Jérôme de Seze, MD, PhD
Group Members for NOMADMUS and CF-SEP

Background: Few data exist on a possible benign form of neuromyelitis optica (NMO).

Objectives: To identify NMO with a good outcome (go-NMO) among a large population of patients and to describe demographic and clinical variables associated with go-NMO vs standard NMO and benign multiple sclerosis.

Design: Observational retrospective multicenter study.

Setting: Twenty-five medical centers in metropolitan France (MF) and 3 medical centers in the French West Indies (FWI).

Patients: A total of 175 patients with NMO were retrospectively analyzed from 2 cohorts: 125 in MF and 50 patients of nonwhite race/ethnicity in the FWI. Patients in MF fulfilled the 2006 NMO criteria, whereas patients in the FWI fulfilled the 1999 or 2006 NMO criteria. Neuromyelitis optica and multiple sclerosis databases were reviewed, and patients with a score of 3 or lower on the Expanded Disability Status Scale after a 10-year follow-up period were considered to have go-NMO.

Main Outcome Measures: Clinical, laboratory, and magnetic resonance imaging data and course of disability.

Results: In MF, go-NMO was observed in 11 patients, including 3 untreated patients. In the FWI, NMO was severe because of disability related to optic neuritis. Compared with standard NMO, go-NMO was associated with a lower annualized relapse rate (0.3 vs 1.0, $P < .01$), and 8 of 11 patients with go-NMO showed complete regression of myelitis on magnetic resonance imaging during the disease course. Three patients experienced a disabling attack of NMO after 15 years of follow-up. A good outcome occurred less frequently among patients with NMO than among patients with multiple sclerosis (12.0% vs 22.4%, $P = .03$).

Conclusions: Among patients in MF, go-NMO occurs rarely. However, because a disabling attack may occur after a long follow-up period, a benign form of NMO cannot be defined.

Arch Neurol. 2011;68(7):918-924

NEUROMYELITIS OPTICA (NMO) is a relapsing and disabling autoimmune disease of the central nervous system, characterized by severe optic neuritis and extensive myelitis. A direct consequence of NMO is disability, including complete vision loss or paraplegia, which may be lethal in 2.9% to 25% of patients, mainly through brainstem involvement.¹⁻³ Optic neuritis is initially followed by severe residual vision loss (visual acuity [VA], ≤ 0.1 minutes of arc [corresponding to 20/200 on Snellen visual acuity charts]) in 30% of patients descended from nonwhite populations and in 22% of patients descended from the white population.⁶ After a first episode of myelitis, ambulation is limited to 500 m, corresponding to a re-

sidual Expanded Disability Status Scale (EDSS) score of 4 or higher, in 37.3% of patients.² These data argue for development of severe disabling inflammatory disease in the absence of immunosuppressive therapies among patients with NMO.

Despite the putative severity of NMO, there are rare reports of a benign course in patients with NMO.⁷⁻⁹ Such patients developed NMO secondary to celiac disease⁷ or dengue infection.⁹ In a third case report, NMO was observed in a patient without evidence of systemic autoimmune or infectious disease.⁸ These reported cases fulfilled the 2006 diagnostic criteria for NMO.¹⁰ Cohort investigations that included more than 30 patients with NMO have not estimated the proportion of patients with good outcome NMO (go-NMO) (ie, those with a

Author Affiliations are listed at the end of this article.
Group Information: The NOMADMUS and CF-SEP Study Group members are listed on page 923.

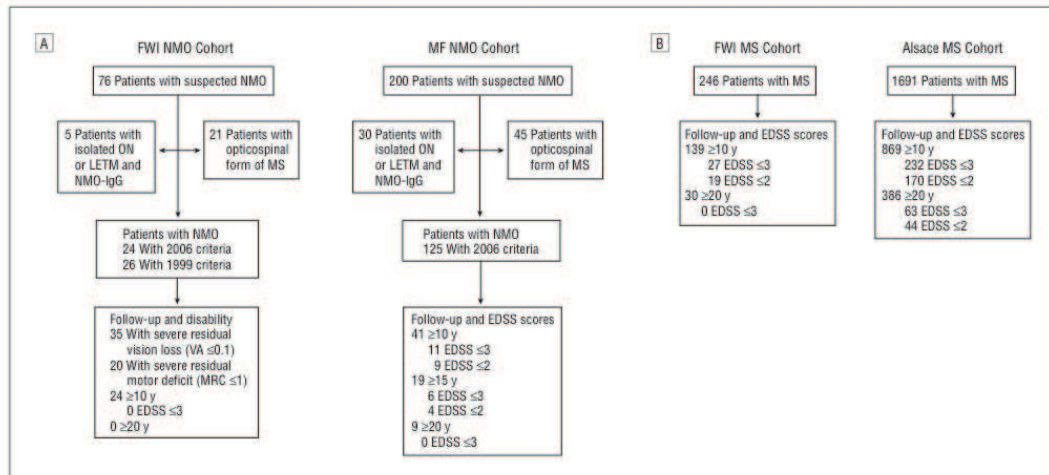


Figure 1. Selection of patients with neuromyelitis optica (NMO) (A) and with multiple sclerosis (MS) (B) in the French West Indies (FWI) and in metropolitan France (MF). A, Patients with NMO were analyzed for a good outcome based on the follow-up period and the level of disability (Expanded Disability Status Scale [EDSS] score, visual acuity [VA], and Medical Research Council [MRC] score). B, Patients with MS were selected for a benign form based on the follow-up period and the level of disability (EDSS score). In MF, MS data were obtained from the database for Alsace, a representative French region. ON indicates optic neuritis; LETM, longitudinal extensive transverse myelitis.

score of ≤ 3 on the EDSS after a 10-year follow-up period). Evaluation of disability in these cohorts suggests that the disease may be less severe among patients of white^{3,5,11} vs nonwhite^{1,4} race/ethnicity.

We analyzed 2 NMO cohorts, one in metropolitan France (MF) with 125 patients and the other in the French West Indies (FWI) with 50 patients of nonwhite race/ethnicity, to identify patients with go-NMO. We further describe demographic and clinical variables associated with go-NMO vs standard NMO and benign multiple sclerosis (MS) in these geographic areas to develop hypotheses about benign inflammatory disease of the central nervous system.

METHODS

We performed an observational retrospective multicenter study of NMO in France, including MF and the FWI. Data were collected from September 1, 2007, through September 1, 2010, corresponding to the end point of the study. In MF, 25 tertiary hospital centers recruited 200 patients with a suggested diagnosis of NMO; 125 of these fulfilled the 2006 NMO criteria and were included in the study. Data derived from this cohort have been published elsewhere.² In the FWI, 3 tertiary hospital centers recruited 76 patients with a suggested diagnosis of NMO; 50 of these were included in the study (26 fulfilled the 1999 NMO criteria and 24 fulfilled the 2006 NMO criteria). Selection of patients with NMO for the study is shown in **Figure 1A**. Selection of patients with benign MS for the study is shown in **Figure 1B**. Data were derived from hospital medical records and from a clinical information questionnaire specifically designed for NMO. If needed, additional data were obtained from the participating centers by e-mail or by telephone. All data were entered in the European Database for Multiple Sclerosis, recently modified to include NMO.¹² In MF, MS data were obtained from the database for Alsace, a representative French region. In the FWI, MS data were obtained from the geographic Caribbean database. Data confidentiality and security were en-

sured consistent with recommendations of the French data protection authority (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés), which also approved the study.

Assessed for each patient with NMO were demographic data, medical history, treatment, laboratory test results, neuroimaging data, and key episodes in the course of NMO (relapses and successive disability score dates). In patients with go-NMO, initial spinal cord magnetic resonance (MR) imaging was performed a mean (SD) of 7.8 (6.5) years after disease onset, 4.8 (4.1) years after the first episode of myelitis. Imaging was performed immediately after the first episode of myelitis in patients 1, 2, 3, and 5 (**Table 1**). Initial brain MR imaging was performed a mean (SD) of 7.3 (6.2) years after disease onset and was classified as normal in the presence of criteria by Paty et al¹³ or by Barkhof et al¹⁴ or as abnormal in the absence of those criteria. Serum samples from 111 patients in MF and from 24 patients in the FWI were tested for NMO-IgG with an indirect immunofluorescence assay on a substrate of adult rat cerebellum and midbrain using a previously described technique.^{15,16} Among the MF cohort of patients with go-NMO in whom the immunofluorescence assay was negative (patients 1, 2, 3, and 11), anti-aquaporin 4 antibody detection was performed using a routinely used cell-based assay with aquaporin 4-transfected cells.¹⁷ For the other patients, the NMO-IgG test was unavailable at NMO onset and was not necessary to diagnose NMO according to the 1999 or 2006 criteria. Residual disability was assessed during at least 6 months using EDSS score and VA. An EDSS score of 3 corresponded to benign MS, and an EDSS score of 2 reflected better vision. Visual acuity was included in the vision variable of the EDSS score.¹⁸ An EDSS score of 3 was compatible with a maximum VA of 0.1 or less (20/200 Snellen) in the worse eye, and an EDSS score of 2 indicated a large scotoma or a maximum VA of 0.33 to 0.2 (20/60 to 20/100 Snellen) in the worse eye.

Comparisons of categorical data were performed using χ^2 test. Comparisons of quantitative data were conducted using Mann-Whitney test. Kaplan-Meier technique was used to estimate time to the second episode and time to initial treatment. Survival curves were compared using log-rank test. Two-

Table 1. Demographic and Clinical Characteristics of Patients Having Neuromyelitis Optica (NMO) With a Good Outcome

Patient No./Sex/ Race/Ethnicity/ Age at Onset, y/ Follow-up, y	Topography of First Attack	Opticospinal Interval, mo	First Interattack Interval, mo	Annualized Relapse Rate, Mean	NMO-IgG	Cerebrospinal Fluid, OCB/WBC Count, Cells/mm ³	Abnormal Spinal MR Imaging, No. of Lesions/ Location of LETM	First Brain MR Imaging, No. of Lesions ^a	Treatment
1/F/W/17.0/15.2	ON	22	22	0.7	+	+/0	1/CT	0	Interferon
2/M/W/51.2/14.3	SC	4	4	0.4	-	-/29	1/CT	1	Azathioprine
3/M/W/27.4/16.4	SC	108	108	0.2	-	+/0	2/C	0	...
4/M/W/37.8/19.2	ON	48	36	0.4	-	-/5	1/C	0	Interferon, glatiramer acetate
5/F/W/20.2/15.3	ON	96	24	0.3	-	-/3	3/C, T	1	...
6/F/W/24.8/25.4	ON	120	60	0.3	+	-/0	2/C, T	0	Interferon, cyclophosphamide
7/M/A/14.7/18.2	ON	75	75	0.3	+	-/128	1/CT	0	Cyclophosphamide
8/F/W/29.8/11.4	SC	119	119	0.2	+	+/16	1/...	0	...
9/F/B/35.5/14.3	ON	48	12	0.5	+	+/4	1/C	0	Interferon, mycophenolate mofetil
10/F/W/52.3/13.7	ON	3	3	0.2	-	-/5	1/C	0	Azathioprine
11/F/W/36.7/16.3	ON	48	48	0.4	+	-/12	1/T	0	Cyclophosphamide

Abbreviations: A, Asian; C, cervical; CT, cervicothoracic; ellipsis, not applicable; LETM, longitudinal extensive transverse myelitis; MR, magnetic resonance; OCB, oligoclonal bands; ON, optic nerve; SC, spinal cord; T, thoracic; WBC, white blood cell; +, positive; -, negative.

^aSI conversion factor: To convert white blood cell count to $\times 10^9/L$, multiply by 0.001.

^bFor criteria by Paty et al¹³/by Barkhof et al,¹⁴ all results were negative/negative.

sided $P < .05$ was considered statistically significant. All analyses were performed using commercially available statistical software (SPSS for Windows, version 14.0; SPSS Inc, Chicago, Illinois).

RESULTS

PATIENTS WITH go-NMO

Good-outcome NMO was observed in 11 patients, all of whom were in the MF cohort (Figure 1A). When 33 patients with an unknown long-term clinical course (ie, < 10 years' follow-up and EDSS score of ≤ 3) were excluded, 11 of 92 patients with go-NMO represented 12.0% of the NMO cohort. Table 1 gives individual demographic and clinical characteristics of 11 patients with go-NMO. The first episode of myelitis was characterized by an isolated sensitive symptom in 5 patients and by a sensorimotor deficit in 6 patients (5 with sphincter impairment). After intravenous corticotherapy, recovery from myelitis was complete in 5 patients, including 3 patients with myelitis at NMO onset. The initial episode of clinical optic neuritis was bilateral in 1 patient. Visual acuity was 0.1 or worse ($\leq 20/200$ Snellen) in 6 patients, and the mean VA was 0.2 (20/100 Snellen) in the disabled eye. After intravenous corticotherapy, recovery from optic neuritis was complete in 9 patients. After a mean (SD) follow-up period of 16.4 (3.9) years, the course of NMO was relapsing-remitting in 10 patients and monophasic in patient 8, who was lost to follow-up because of suicide 11.7 years after disease onset. Using an EDSS cutoff score of 2, patients 10 and 11 were not considered to have go-NMO. At the end of the follow-up period, patient 3 had an EDSS score of 7 because of severe myelitis, and patients 6 and 7 had EDSS scores of 4.5 and 5, respectively, because of combined severe VA loss and myelitis. Residual VA of 0.1 or worse ($\leq 20/200$ Snellen) in 1 eye was observed in patients 7 and 8, but the mean VAs among the entire go-NMO cohort at the end of the follow-up period were 0.8 (20/25 Snellen) in both eyes.

Longitudinal extensive transverse myelitis was observed a mean (SD) of 9.7 (5.8) years after NMO onset and a mean (SD) of 5.8 (4.3) years after the first episode of myelitis and was observed in 7 patients on initial spinal cord MR imaging. Patient 8 was free of extensive myelitis at the end of the follow-up period. Apparent complete regression of myelitis (Figure 2) was observed in 8 of 11 patients with go-NMO.

In the FWI cohort, no go-NMO was observed. Most patients had severe optic neuritis with residual VA of 0.1 or worse ($\leq 20/200$ Snellen), despite immunosuppressive therapy (Figure 1A).

DEMOGRAPHIC AND CLINICAL VARIABLES ASSOCIATED WITH NMO VS BENIGN MS

Demographic and clinical data associated with NMO vs benign MS are summarized in Table 2. Excluding demographic data (higher ratios of female to male patients and nonwhite to white races/ethnicities in the FWI), disease-related characteristics of standard NMO were similar in the FWI and MF cohorts and allow a comparison between go-NMO and standard NMO. Compared with standard NMO, go-NMO was associated with a lower annualized relapse rate and demonstrated a trend to delayed time from onset to a second episode. Whereas patients with standard NMO were often treated with immunosuppression, 3 patients with go-NMO required no treatment, and 2 patients with go-NMO needed only immunomodulatory therapy.

A lower percentage of patients having NMO experienced a good outcome of the disease compared with patients having benign MS in Alsace (12.0% vs 22.4%, $P = .03$). Except for a predominance of nonwhite patients in the FWI cohort, demographic and clinical characteristics of patients with benign MS were identical in Alsace and in the FWI. Similar results were noted when the cutoff for go-NMO was an EDSS score of 2 or lower.

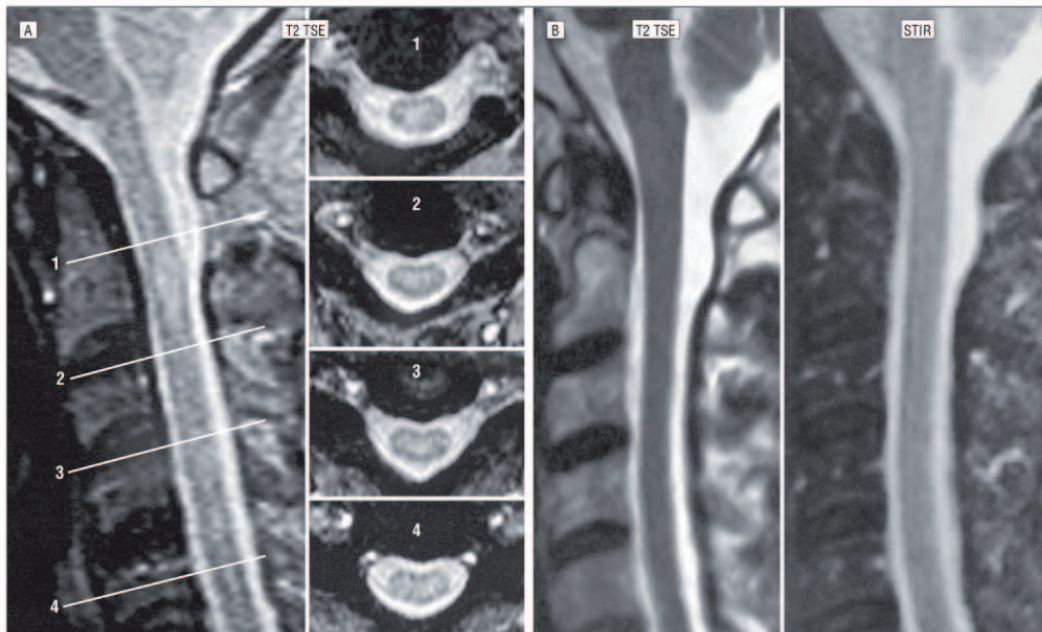


Figure 2. Apparent regression of spinal cord magnetic resonance imaging hypersignal during the follow-up period in patient 4 (Table 1) having neuromyelitis optica with a good outcome. A, Longitudinal extensive transverse myelitis was diagnosed on a longitudinal section of a 0.5-T T2-weighted turbo spin-echo sequence (TSE/M) in 1999 (left). Transverse sections of the lesions at different levels confirmed extensive transverse myelitis, with a length of 3 or more vertebral segments (right). B, Longitudinal section on a 1.5-T T2-weighted TSE/M (left) and a short tau inversion recovery (STIR) sequence (right) in 2004 showed complete regression of myelitis.

COMMENT

Our study found go-NMO in 12.0% of patients among the MF NMO cohort. No patients in the FWI NMO cohort had a good outcome because of severe optic neuritis among this population. Compared with patients having standard NMO, patients having go-NMO had a lower annualized relapse rate, and complete regression of myelitis on spinal cord MR imaging was observed in 8 of 11 patients with go-NMO.

Based on our results, it is difficult to conclude that a benign form of NMO exists. First, the term *benign* is based on an assessment of the natural history of the disease, whereas only 3 patients in our cohort with go-NMO were untreated. Second, the expression “benign form” implies a permanent condition, whereas patients with NMO may have a good outcome for many years and then have a disabling attack, as observed in 3 patients after 15 years of follow-up.

To date, the so-called benign form of NMO has been described only in case reports. Patients with opticospinal demyelination secondary to celiac disease or dengue infection dramatically improved after causative treatment and a short course of corticotherapy.^{7,9} Primary benign NMO has been described in a patient with opticospinal demyelination, longitudinal extensive transverse myelitis, and normal brain MR imaging.⁸ The disease was characterized by a 6-year interval between the first 2 attacks and by marked swelling of a cervical lesion, which

was initially suggestive of a low-grade tumor. The patient responded to corticotherapy and experienced progressive improvement after a few months. Six years after this event, spinal cord MR imaging showed complete regression of the initial lesion. This is in accord with our description of go-NMO, including spontaneous improvement, regressive myelitis, and a low annualized relapse rate. In contrast, clinical predictors of death among the FWI cohort with NMO included a high frequency of episodes during the first year of disease, blindness or sphincter signs at onset, and lack of recovery after the first attack.¹ Among the MF cohort, independent risk factors for EDSS scores of 4, 6, and 7 were not identified, but a large number of lesions on brain MR imaging during the disease course of NMO may predict a VA outcome of 0.1 or worse ($\leq 20/200$ Snellen).²

Results of this study suggest some possible explanations for low disability among patients with NMO. The most important of these relate to the low annualized relapse rate and the complete regression of myelitis on MR imaging in 8 of 11 patients with go-NMO. These observations indicate that disability may be exclusively linked to relapses in NMO, without progressive aggravation of disability between relapses. The findings underline a major difference in the pathophysiological processes between NMO and MS, in which a progressive course is common.^{2,19} Regression of myelitis on MR imaging in inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system has been described in acute disseminated

Table 2. Characteristics of Patients Having Neuromyelitis Optica (NMO) in Metropolitan France (MF) and in the French West Indies (FWI) and of Patients Having Benign Multiple Sclerosis (MS) in Alsace and in the FWI^a

Characteristic	NMO in FWI (n=50)	Standard NMO in MF (n=81)	go-NMO in MF (n=11)	P Value ^b	Benign MS in Alsace (n=232)	P Value ^c	Benign MS in FWI (n=27)	P Value ^d
Female-male ratio	9:1	2.5:1	1.75:1	.85	2.8:1	.70	8:1	.13
White-nonwhite ratio	0.50	9:1	4.5:1	.79	28:1	.10	0.27	<.01
Age at onset, mean (SD), y	31.8 (13.0)	35.2 (14.0)	31.6 (12.6)	.36	29.4 (8.7)	.71	26.3 (8.9)	.13
Disease course monophasic:remitting ratio	0.50	1:4	1:10	.66	0.232	.03	0.27	<.01
Time from onset to second attack, mean (SD), mo	23.3 (45.0)	31.2 (44.6)	46.5 (40.2)	.08	59.5 (32.7)	.17	58.9 (64.2)	.17
Annualized relapse rate, mean (SD), mo	0.9 (0.7)	1.0 (1.5)	0.3 (0.1)	<.01	0.4 (0.2)	.24	0.4 (0.2)	.19
Patients receiving treatments, No. (%)	39 (78.0)	76 (93.8)	8 (72.7)	.08	181 (78.0)	.97	20 (74.0)	.82
No. of treatments received, mean06	...	<.0131
IM	1	3	2	...	148	...	19	...
IS	30	48	4	...	7	...	0	...
IM+IS	8	25	2	...	26	...	1	...
Time to first treatment, median (95% CI), y	4.5 (2.3-6.7)	2.1 (1.4-2.7)	12.0 (8.3-15.7)	.03	11.0 (5.0-17.0)	.65	11.0 (9.6-12.4)	.50
NMO-IgG, No. (%)	15 (62.5) (n=24)	34 (50.0) (n=68)	6 (54.5)	.96

Abbreviations: CI, confidence interval; ellipsis, not applicable; go-NMO, NMO with a good outcome; IM, immunomodulatory treatment; IS, immunosuppressive treatment.

^a Patients with an Expanded Disability Status Scale score lower than 3 and with less than 10 years' follow-up are excluded.

^b Comparison between NMO subgroups in MF.

^c Comparison between go-NMO and benign MS in Alsace.

^d Comparison between benign MS in Alsace and in the FWI.

encephalomyelitis and in the pseudotumoral form of MS.²⁰ Such observations are uncommon in classic MS, whatever the course of the disease. In NMO, this point is poorly documented, but reported cases demonstrate that marked swelling in myelitis can shrink after high-dose corticotherapy.^{8,21} In a study by Cassinotto et al²¹ that included 17 patients with NMO, complete regression was observed in only 2 patients after a 26-month follow-up period. In most cases, these spinal cord lesions progress to atrophy and necrosis, leading to syrinxlike cavities on T1-weighted images. From a pathological point of view, it would be relevant to correlate transient myelitis in NMO with the presence of NMO-IgG, which can appear and disappear during the course of the disease.²² Involvement of immunosuppressive therapies in this transitory detection was not demonstrated in a large prospective follow-up study,² but our data show that the phenomenon can occur without any treatment.

Good-outcome NMO was observed in the MF cohort but not in the FWI cohort. Differences in genetic backgrounds may be a key factor in accounting for these results, as suggested by the low proportion of nonwhite patients with go-NMO in the MF cohort. Despite immunosuppressive therapy, the median time in the FWI cohort from NMO onset to an EDSS score of 3 was 1 year, and death occurred in 25% of patients.¹ In other NMO cohorts of primarily white race/ethnicity, percentages of patients with NMO-related death were as follows: 2.9% in a Mexican cohort,⁴ 3.2% in an MF cohort,² 13% in an Italian cohort,³ and 22.5% in a North American cohort.³ The apparent severity of NMO in the North American cohort may be related to the following: (1) the high proportion of untreated patients in 1999, when the new NMO spectrum was first described; (2) a selection bias for severe hospitalized cases; and (3) the unspecified proportion of nonwhite patients in this population. The severe disability in our FWI cohort was mainly because of early

and severe vision impairment, characterized by a permanent loss of vision after 2 attacks in a given eye and by a median time of 2 years from onset to monocular vision loss.⁶ Nevertheless, some patients in the FWI cohort experienced complete regression of their myelitis and remained fully ambulatory. These data raise questions about the validity of the vision scale used to calculate the EDSS score when applied to patients with NMO.

Several biases may limit interpretation of our study results. First, we may have inadvertently selected patients with good prognosis in the MF cohort, as demonstrated by the low proportion of deaths compared with that in the FWI cohort. This could have occurred because of selection bias, as all patients in the MF cohort were being followed up at the start of the study and the 2006 NMO criteria were used in this population. In contrast to the 1999 NMO criteria used in the FWI cohort, the 2006 NMO criteria do not include the severity of motor disability and vision impairment in the diagnosis and may select less disabled patients.²³ Second, whereas the collected data among this NMO cohort were among the most complete in the literature, the retrospective study design induced a lack of power in the search for predictive factors of disability. For example, good recovery after the first clinical event reported among patients with go-NMO cannot be compared with that among patients of the entire MF and FWI cohorts because of the wide range of treatments used after the first event, as well as the difficulty of assessing this in patients with a 10-year follow-up period. Third, the definition used for go-NMO was derived from that used for MS. Visual acuity was included in the EDSS score, and a converted vision score of 3 was compatible with a maximum VA of 0.1 or worse ($\leq 20/200$ Snellen) in the worse eye, which raises questions about whether symptoms were benign. That is why we also considered an EDSS score of 2 compatible with a large scotoma or a maximum VA of 0.33 to

0.2 (20/60 to 20/100 Snellen) in the worse eye. However, such considerations do not alter the results of the study.

Because a disabling attack may occur after a long follow-up period, a benign form of NMO cannot be defined. However, results of this study show that go-NMO exists. This finding is applicable to a small percentage of patients with NMO descended from white populations with a low annualized relapse rate of NMO. The result is independent of NMO-IgG seropositivity, which does not affect the course of NMO.^{1,2,16,22} As in MS, a long first interattack interval could be indicative of a less disabling course of NMO.²⁴ Furthermore, the resolution of myelitis without sequelae on MR imaging (spontaneously or after a short course of oral corticotherapy) may suggest a potentially good outcome of NMO. When NMO is suspected, complete regression of symptoms and of signal abnormalities on MR imaging may also be indicative of a good outcome. These considerations are valid only in the absence of the predictors of severity mentioned herein.

Accepted for Publication: February 11, 2011.

Author Affiliations: Hôpital Universitaire de Strasbourg, Service de Neurologie et Centre d'Investigation Clinique INSERM 1002, Strasbourg (Drs Collongues and de Seze); Hôpital Universitaire de Lyon, Service de Neurologie A et centre de coordination EDMUS, Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer, Lyon (Drs Marignier and Confavreux); Hôpital Universitaire de Lille nord de France, Service de Neurologie, Hôpital Robert Salengro, Lille (Drs Zéphir and Vermersch); groupe hospitalier universitaire est, Fédération des Maladies Rares Neurologiques et Neuro-Musculaires, Fort de France, Martinique (Dr Cabre), French West Indies.

Correspondence: Nicolas Collongues, MD, Hôpital Universitaire de Strasbourg, Service de Neurologie et Centre d'Investigation Clinique INSERM 1002, 1 Place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France (nicolas.collongues@chru-Strasbourg.fr).

Author Contributions: Dr Collongues had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. *Study concept and design:* Collongues, Vermersch, and de Seze. *Acquisition of data:* Collongues, Cabre, Marignier, Zéphir, Papeix, Audoin, Lebrun-Frenay, Pelletier, Fontaine, Vermersch, and Confavreux. *Analysis and interpretation of data:* Collongues and Marignier. *Drafting of the manuscript:* Collongues, Marignier, Zéphir, Pelletier, and Confavreux. *Critical revision of the manuscript for important intellectual content:* Collongues, Cabre, Marignier, Papeix, Audoin, Lebrun-Frenay, Pelletier, Fontaine, Vermersch, and de Seze. *Statistical analysis:* Collongues. *Obtained funding:* Confavreux. *Administrative, technical, and*

material support: Collongues, Audoin, Lebrun-Frenay, Pelletier, Fontaine, Vermersch, and Confavreux. *Study supervision:* Collongues, Cabre, Marignier, Vermersch, and de Seze.

Group Members: The list of the NOMADMUS and CF-SEP Study Group members for 2010 is as follows: *NOMADMUS:* Bertrand Audoin, MD, PhD; David Brassat, MD, PhD; Bruno Brochet, MD, PhD; Philippe Cabre, MD, PhD; Jean-Philippe Camdessanche, MD; William Camu, MD, PhD; Olivier Casez, MD; Giovanni Castelnovo, MD; Michel Clanet, MD, PhD; Pierre Clavelou, MD, PhD; Nicolas Collongues, MD; Christian Confavreux, MD, PhD; François Cotton, MD, PhD; Alain Creange, MD, PhD; Gilles Defer, MD, PhD; Jérôme de Seze, MD, PhD; Marc Debouverie, MD, PhD; Gilles Edan, MD, PhD; Olivier Gout, MD; Guillemette Jousserand, MD; Philippe Kirschen, MD; Pierre Labauge, MD, PhD; Christine Lebrun-Frenay, MD; David Laplaud, MD; Romain Marignier, MD; Thibault Moreau, MD, PhD; Caroline Papeix, MD; Jean Pelletier, MD, PhD; Lucien Rumbach, MD, PhD; Bruno Stankoff, MD, PhD; Ayman Tourbah, MD, PhD; Patrick Vermersch, MD, PhD; Sandra Vukusic, MD, PhD; and Hélène Zéphir, MD. *CF-SEP MD Coordinators:* Anne Olivier, MD; Bertrand Audoin, MD, PhD; Florent Borgel, MD; David Brassat, MD, PhD; Bruno Brochet, MD, PhD; Philippe Cabre, MD, PhD; William Camu, MD, PhD; Pierre Clavelou, MD, PhD; Alain Créange, MD, PhD; Marc Coustans, MD, PhD; Marc Debouverie, MD, PhD; Gilles Defer, MD, PhD; Jérôme de Seze, MD, PhD; Olivier Gout, MD; Jérôme Grimaud, MD, PhD; Patrick Haute-coeur, MD; Olivier Heinzlef, MD; Pierre Labauge, MD, PhD; David Laplaud, MD; Christine Lebrun-Frenay, MD; Emmanuelle le Page, MD; Claude Mekies, MD; Thibault Moreau, MD, PhD; Caroline Papeix, MD; Jean Pelletier, MD, PhD; Sophie Pittion, MD; Lucien Rumbach, MD; Pierrette Seelldrayers, MD; Ilham Slassi, MD, PhD; Bruno Stankoff, MD, PhD; Ayman Tourbah, MD, PhD; Patrick Vermersch, MD, PhD; Sandra Vukusic, MD, PhD; Sandrine Wiertlevski, PD; and Hélène Zéphir, PD.

Financial Disclosure: Dr Papeix serves on advisory boards for Biogen Idec, Merck Serono, Bayer Schering Pharma, Teva Pharmaceutical Industries Ltd, sanofi-aventis, Novartis, and Roche; has spoken at symposia during the last 2 years for Bayer Schering Pharma, Biogen Idec, Teva Pharmaceutical Industries Ltd, and sanofi-aventis; and performs therapeutic investigations for Biogen Idec, Merck Serono, Teva Pharmaceutical Industries Ltd, sanofi-aventis, Novartis, and Roche. Dr Lebrun-Frenay has received travel expenses and/or honoraria for lectures or educational activities not funded by industry; serves on the editorial board of *Revue Neurologique*; has received speaker honoraria from Biogen Idec, Bayer Schering Pharma, Merck Serono, sanofi-aventis, and Teva Pharmaceutical Industries Ltd; and serves as a consultant to Institut National de Recherche en Informatique et en Automatique. Dr Pelletier serves on scientific advisory boards for Biogen Idec and Novartis and has received research support from the Association Pour la Recherche sur la Sclérose en Plaques (ARSEP). Dr Fontaine serves on the editorial boards of *Gene and Immunity*, the *Journal of Neurology*, *Neurosurgery and Psychiatry*, *Revue Neurologique*, and the *Journal of Neurology* and has received

research support from Biogen Idec, sanofi-aventis, Merck Serono, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (French National Research Agency), the University Pierre and Marie Curie, and ARSEP. Dr Vermersch serves on a scientific advisory board for Merck Serono, Biogen Idec, Bayer Schering Pharma, Teva Pharmaceutical Industries Ltd, and sanofi-aventis; has received funding for travel and/or speaker honoraria from Merck Serono, Biogen Idec, and Bayer Schering Pharma; and receives research support from Merck Serono and Biogen Idec. Dr Confavreux has received travel expenses and/or honoraria for lectures or educational activities not funded by industry; has received honoraria from the Serono Symposia Foundation; serves as consultant for sanofi-aventis, Genzyme Corporation, UCB, Roche, and Novartis; and has received research funds from Biogen Idec, Bayer Schering Pharma, Merck Serono, Teva Pharmaceutical Industries Ltd, and sanofi-aventis to support the European Database for Multiple Sclerosis project. Dr de Seze serves on scientific advisory boards for and has received honoraria from Biogen Idec, LFB, Merck Serono, sanofi-aventis, and Bayer Schering Pharma and serves on the editorial board of *Revue Neurologique*. **Funding/Support:** This study was supported in part by the French Ministry of Health (Projet Hospitalier de recherche clinique 2010) and the ARSEP foundation.

REFERENCES

- Cabre P, González-Quevedo A, Bonnan M, et al. Relapsing neuromyelitis optica: long term history and clinical predictors of death. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;80(10):1162-1164.
- Collongues N, Marignier R, Zéphir H, et al. Neuromyelitis optica in France: a multicenter study of 125 patients. *Neurology*. 2010;74(9):736-742.
- Ghezzi A, Bergamaschi R, Martinelli V, et al; Italian Devic's Study Group (IDESG). Clinical characteristics, course and prognosis of relapsing Devic's neuromyelitis optica. *J Neurol*. 2004;251(1):47-52.
- Rivera JF, Kurtzke JF, Booth VJ, Corona T. Characteristics of Devic's disease (neuromyelitis optica) in Mexico. *J Neurol*. 2008;255(5):710-715.
- Wingerchuk DM, Weinshenker BG. Neuromyelitis optica: clinical predictors of a relapsing course and survival. *Neurology*. 2003;60(5):848-853.
- Merle H, Olindo S, Bonnan M, et al. Natural history of the visual impairment of relapsing neuromyelitis optica. *Ophthalmology*. 2007;114(4):810-815.
- Bergamaschi R, Jarius S, Robotti M, Pichiecchio A, Wildemann B, Meola G. Two cases of benign neuromyelitis optica in patients with celiac disease. *J Neurol*. 2009;256(12):2097-2099.
- Köller H, Neuen-Jacob E, Saleh A, Kieseier BC, Jander S, Hartung HP. A patient with a benign course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome) over 12 years: MRI follow up and histological findings. *J Neurol*. 2006;253(6):819-820.
- Miranda de Sousa A, Puccioni-Sohler M, Dias Borges A, Fernandes Adorno L, Papais Alvarenga M, Papais Alvarenga RM. Post-dengue neuromyelitis optica: case report of a Japanese-descendent Brazilian child. *J Infect Chemother*. 2006;12(6):396-398.
- Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology*. 2006;66(10):1485-1489.
- Sahraian MA, Moifar Z, Khorramnia S, Ebrahim MM. Relapsing neuromyelitis optica: demographic and clinical features in Iranian patients. *Eur J Neurol*. 2010;17(6):794-799.
- Confavreux C, Compston DA, Hommes OR, McDonald WI, Thompson AJ, EDMUS, a European Database for Multiple Sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992;55(8):671-676.
- Paty DW, Oger JJ, Kastrukoff LF, et al. MRI in the diagnosis of MS: a prospective study with comparison of clinical evaluation, evoked potentials, oligoclonal banding, and CT. *Neurology*. 1988;38(2):180-185.
- Barkhof F, Filippi M, Miller DH, et al. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain*. 1997;120(pt 11):2059-2069.
- Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet*. 2004;364(9451):2106-2112.
- Marignier R, de Seze J, Vukusic S, et al. NMO-IgG and Devic's neuromyelitis optica: a French experience. *Mult Scler*. 2008;14(4):440-445.
- Marignier R, Nicolle A, Watrin C, et al. Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury. *Brain*. 2010;133(9):2578-2591.
- Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an Expanded Disability Status Scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-1452.
- Wingerchuk DM, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Lennon VA, Weinshenker BG. A secondary progressive clinical course is uncommon in neuromyelitis optica. *Neurology*. 2007;68(8):603-605.
- Cañellas AR, Gols AR, Izquierdo JR, Subirana MT, Gairin XM. Idiopathic inflammatory-demyelinating diseases of the central nervous system. *Neuroradiology*. 2007;49(5):393-409.
- Cassinotto C, Deramond H, Olindo S, Aveillan M, Smadja D, Cabre P. MRI of the spinal cord in neuromyelitis optica and recurrent longitudinal extensive myelitis. *J Neuroradiol*. 2009;36(4):199-205.
- Jarius S, Aboul-Enein F, Waters P, et al. Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica. *Brain*. 2008;131(pt 11):3072-3080.
- Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology*. 1999;53(5):1107-1114.
- Langer-Gould A, Popat RA, Huang SM, et al. Clinical and demographic predictors of long-term disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a systematic review. *Arch Neurol*. 2006;63(12):1686-1691.

D. Commentaires à propos des trois études issues de l'analyse de la cohorte nationale de patients NMO

D.1 Nouvelles données épidémiologiques et cliniques en France

Le recensement des patients NMO à l'échelle nationale n'est pas exhaustif mais a mobilisé 25 hôpitaux répartis sur l'ensemble du territoire français (**figure 5**).

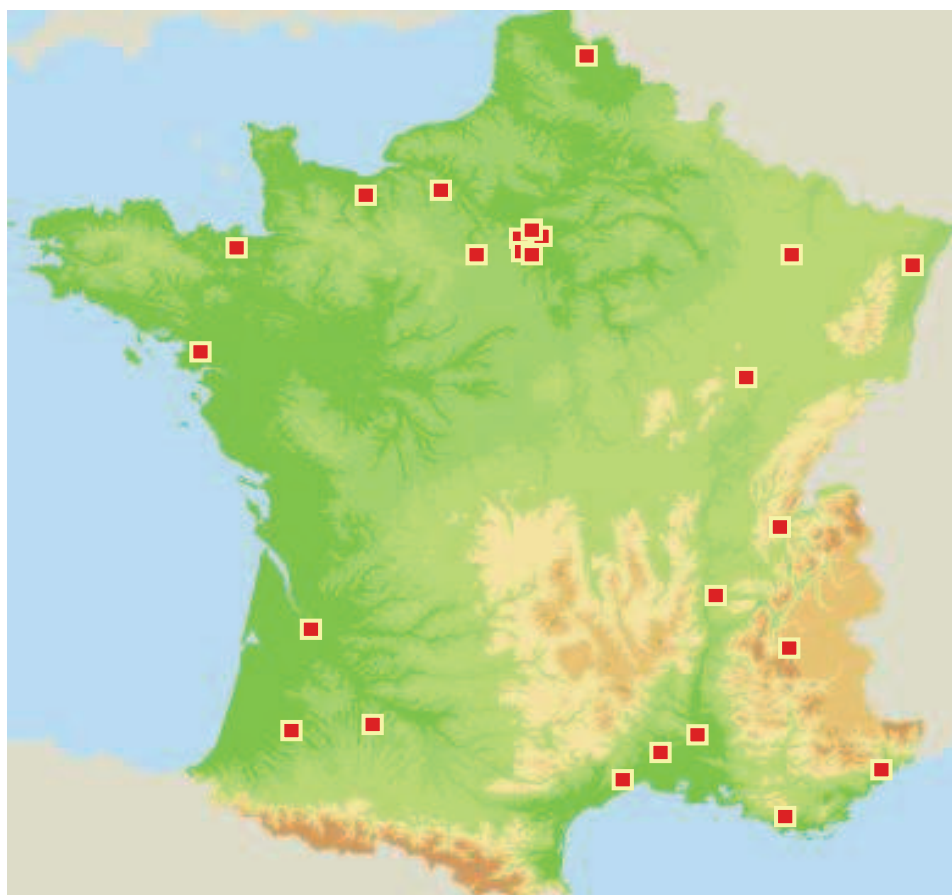


Figure 5. Répartition des 25 centres hospitaliers français impliqués dans l'enquête épidémiologique nationale sur la NMO.

Ce recensement a permis d'estimer, pour la première fois en France, la prévalence de la pathologie à environ 0.3/100 000 habitants (données démographiques INSEE 2010), ce qui correspond à une ratio NMO:SEP de 1:300, soit 10 fois plus faible qu'à Cuba et 40 fois plus faible qu'aux Antilles françaises.

Ces études épidémiologiques ont permis de mieux documenter le profil clinique de ces patients. Elles ont notamment permis de préciser leurs caractéristiques démographiques et de déterminer le délai médian au diagnostic (séparant l'atteinte optique de l'atteinte médullaire) qui est évalué autour de un an. Ces données sont mentionnées dans le **tableau 7** et permettent ainsi une meilleure comparaison des différentes populations étudiées.

Caractéristiques des patients inclus	Cohorte Américaine 2003	Cohorte Italienne 2004	Cohorte Antillaise/ Cubaine 2009	Cohorte Française 2010
Critères diagnostiques	1999	1999	1999/2006	2006
Patients, n	80	46	96	125
Suivi, an (moy)	7.6	8.8	9.5	10.4
Age au début, an (méd)	38	35	29.5	34.5
Ratio Femmes/Hommes	2.5/1	4.1/1	11/1	3/1
MAI, %	25	22	8	10
Topo. initiale prédo.	-	Optique	Optique	Médullaire
Délai P1-P2, m (moy/méd)	-/-	17/-	27.6/11.5	30.8/12
Délai OM,[#] m (moy/méd)	-	-/-	34.8/24	35.6/15
EDSS 6, an	-	7	8	10
Décès, n (%)	18 (22.5)	6 (13)	24 (25)	4 (3.2)
TAP, (méd)	-	1.3	0.7	0.99
NMO-IgG, %	-	-	32	54
BOC dans le LCR, %	-	34.1	-	23.8

Tableau 7. Comparaison des principales études épidémiologiques sur la NMO incluant la cohorte française.

Moy : moyenne; Méd : médiane; MAI : maladie auto-immune; P1 : première poussée; P2 : deuxième poussée; ;[#] : délai séparant la première poussée optique et médullaire, quel qu'en soit l'ordre; TAP : taux annualisé de poussée; BOC : bandes oligoclonales; LCR : liquide céphalo-rachidien.

Un élément notable dans notre cohorte est représenté par la tranche d'âge de début de la maladie, comprise entre 4 et 66 ans, soit dans 26% des cas avant 18 ans ou après 50 ans. Cette proportion représente 15% des patients atteints de SEP et constitue là un différence notable entre les deux pathologies. Nos études épidémiologiques ont

permis de tester l'application des critères diagnostiques de 2006, réputés jusqu'alors comme étant les plus sensibles et les plus spécifiques. Nous avons retrouvé que, dans 90% des cas, l'association d'une MLTE et d'une IRM cérébrale initiale ne remplissant pas les critères de Paty suffisait au diagnostic, la positivité des NMO-IgG étant déterminante dans le diagnostic de NMO que dans les 10% restants. Nous avons également montré après une durée de suivi de plus de 10 ans en moyenne, que l'évolution de cette pathologie se faisait essentiellement par poussée, les formes d'allure progressive intéressant moins de 2% des patients.

D.2 La NMO est une maladie sévère

Concernant l'étude du handicap, nous avons été gêné dans l'interprétation des résultats par le fait que nous avons inclus des sujets traités, et que l'efficacité des thérapeutiques immunosuppressives est démontrée dans cette pathologie. Cependant, deux situations incluaient des sujets non traités, permettant ainsi de mieux se représenter l'histoire naturelle de la maladie : d'une part celle de la première poussée, d'autre part, celle concernant les rares patients avec une évolution spontanément favorable. L'étude de la sévérité de la première poussée a permis de constater une forte altération de la fonction visuelle, 22% des patients ayant une acuité visuelle résiduelle (persistante à 6 mois) ≤ 0.1 . Cette donnée est retrouvée dans la cohorte antillaise et atteint même 30% des patients après la première névrite optique (Merle et al., 2007). La première myélite était également suivie d'un handicap sévère, suivie d'un EDSS ≥ 4 dans 37% des cas et représentait le facteur de handicap le plus important dans la NMO à l'âge adulte.

L'étude des formes de bon pronostic a révélé la possibilité de poussées très handicapantes pouvant survenir après 15 ans d'évolution favorable chez 3/11

patients. Chez ces patients, tous avaient connus une poussée médullaire sévère associée pour deux d'entre eux à un handicap visuel important. Un quatrième patient avait un EDSS <3 mais une cécité complète d'un oeil. Au total, seulement deux patients sur l'ensemble de la cohorte des 125 patients NMO avaient une évolution favorable en l'absence de toute thérapeutique et deux patients avaient évolué favorablement sous immunomodulateurs, qui semblent cependant moins efficaces que les immunosuppresseurs dans cette pathologie (Papeix et al., 2007; Uzawa et al., 2010).

D.3 Le handicap est principalement visuel chez l'enfant et médullaire chez l'adulte

Tout d'abord, nous avons montré que la première myélite était la principale source de handicap à l'âge adulte. Ensuite, nous avons constaté que l'atteinte visuelle était plus marquée chez l'enfant chez qui le délai médian pour atteindre un déficit visuel profond et permanent était de 1.3 ans contre 11.3 ans dans le groupe débutant la NMO à l'âge adulte. Cette différence notable n'était pourtant pas significative avec le test du log-rank, probablement à cause d'un manque de puissance compte tenu du peu d'enfants inclus. Si cette donnée peut donc paraître peu robuste, il est à noter qu'elle est en accord avec l'analyse des facteurs pronostiques d'une atteinte visuelle sévère dans la cohorte globale. Celle-ci retrouvait une corrélation entre l'importance de la charge lésionnelle à l'IRM cérébrale et le degré du handicap visuel, pouvant ainsi expliquer le rôle d'une charge lésionnelle à l'IRM cérébrale initiale plus importante chez l'enfant que chez l'adulte.

D.4 Le handicap est lié aux poussées dans la NMO

L'étude des formes de bon pronostic a montré qu'elles étaient caractérisées par un taux annualisé de poussée (TAP) plus faible que les formes dites « standard » et nous avons également montré une tendance chez ces patients à un délai séparant les deux premières poussées plus long. Ces données n'ont pas été retrouvées dans l'étude des facteurs pronostiques dans la cohorte globale, probablement par manque de puissance d'une part et surtout probablement à cause de l'effet des thérapeutiques immunosuppressives largement utilisées après les premières poussées handicapantes et modifiant significativement le TAP. En effet, nous avons observé que le TAP passait de 1.72 sur les deux premières années à 0.64 sur les trois années suivantes ($p < 0.01$). L'ensemble de ces données suggère donc que le handicap dans la NMO est lié aux poussées, le TAP des formes de bon pronostic étant particulièrement bas et diminuant de façon significative après traitement immunosuppresseur dans les formes standard, associé alors à un long délai au handicap comme le montre l'évaluation des scores EDSS chez ces patients traités.

D.5 Les différences ethniques dans la NMO

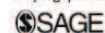
Plusieurs éléments sont en faveur d'une différence dans l'expression de la NMO chez les patients d'ascendance africaine comparée aux patients d'ascendance caucasienne. L'analyse des cohortes les plus complètes, c'est à dire aux Antilles/Cuba (AC) et en France métropolitaine (FM), montre en effet que les patients issus de la cohorte AC sont en grande majorité des femmes, débutant la maladie plus jeunes et moins souvent séropositives pour les NMO-IgG que les patients de la cohorte FM (**tableau 7**). Par ailleurs, le taux de mortalité dans la cohorte AC (25%) est bien supérieur à celui de la cohorte FM (3%). Une première explication est l'utilisation dans plus de

80% des cas de traitement immunosuppresseur dans la cohorte FM et seulement dans environ 30% des cas dans la cohorte AC. Il se peut également que les patients d'ascendance africaine soient des patients plus à risque de développer une forme sévère de NMO. On notera un chiffre de mortalité de 22.5% dans la cohorte américaine de 2003 susceptible de s'opposer à cette conclusion. Cependant, l'ethnie de ces patients américains n'était pas mentionnée dans l'étude, ne permettant pas d'interpréter les résultats dans ce sens. L'hypothèse d'une NMO plus grave chez les ascendants africains est confortée par l'analyse en sous-groupe ethnique des cohortes brésiliennes (Papais-Alvarenga et al., 2002) et cubaines (Cabrera-Gomez et al., 2009), mentionnées dans l'introduction, et qui vont dans ce sens. Ces études suggèrent, dans cette population d'ascendance africaine, une prédisposition génétique à la NMO.

**E. Étude descriptive et comparative des patients à
haut risque de développer une NMO (*Article 4*)**

High-risk syndrome for neuromyelitis optica: a descriptive and comparative study

Multiple Sclerosis Journal
17(6) 720–724
© The Author(s) 2011
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1352458510396923
msj.sagepub.com



N Collongues¹, R Marignier², H Zéphir³, F Blanc¹, S Vukusic²,
O Outteryck³, M Fleury¹, A Ruet⁵, F Borgel¹⁰, E Thouvenot⁷,
T Moreau⁸, G Defer⁹, N Derache⁹, J Pelletier⁴, B Audoin⁴,
M Debouverie¹¹, P Labauge¹², O Gout⁶, W Camu⁷, D Brassat¹³,
B Brochet⁵, P Vermersch³, C Confavreux² and J de Seze¹

Abstract

Background: Neuromyelitis optica (NMO) frequently begins with a monofocal episode of optic neuritis or myelitis. A concept named high-risk syndrome (HRS) for NMO has been proposed for patients with monofocal episodes and NMO-IgG antibodies.

Objective: To describe HRS patients and compare them with NMO patients.

Methods: We identified 30 patients with HRS: 18 with extensive myelitis (HRM) and 12 with optic neuritis (HRON), in a database pooling patients from 25 centres in France. Clinical, laboratory/magnetic resonance imaging (MRI) data and outcome were analysed and compared with a national cohort of 125 NMO patients extracted from the same database.

Results: Mean follow-up was 4.8 years. Mean age at onset was 42.8 years (range: 12.4–70) with a female:male ratio of 0.9. Asymptomatic lesions were reported on visual evoked potentials in 4/8 tested HRM patients and on spinal cord MRI in 2/7 HRON patients. Three patients died, two owing to a cervical lesion. HRS and NMO patients had similar clinical/paraclinical data, except for a predominance of men in the HRS group and a later mean age at onset in the HRM subgroup.

Conclusion: The description of HRS patients is compatible with a monofocal form of NMO. Asymptomatic lesions could be included in a new set of NMO diagnostic criteria.

Keywords

Cohort study, Devic's syndrome, high-risk syndrome, NMO-IgG, optic neuritis, transverse myelitis

Date received: 15th October 2010; revised: 24th November 2010; accepted: 12th December 2010

Introduction

The bifocal location in neuromyelitis optica (NMO) is a necessary condition according to all diagnostic criteria.^{1,2} A specific serum autoantibody, NMO-IgG,³ which binds to the dominant central nervous system water channel protein aquaporin-4 (AQP4), has recently been identified in 50–70% of patients with NMO,^{3,4} but also in 5–10% of patients with multiple sclerosis (MS).^{5–7}

As suggested in small cohorts, a concept named high-risk syndrome (HRS) has been proposed for patients with a monofocal episode of longitudinal

¹Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France.

²Lyon University Hospital, Lyon, France.

³Lille University Hospital, Lille, France.

⁴Marseille University Hospital, Marseille, France.

⁵Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France.

⁶Rothschild Foundation Hospital, Paris, France.

⁷Montpellier University Hospital, Montpellier, France.

⁸Dijon University Hospital, Dijon, France.

⁹Caen University Hospital, Caen, France.

¹⁰Grenoble University Hospital, Grenoble, France.

¹¹Nancy University Hospital, Nancy, France.

¹²Nîmes University Hospital, Nîmes, France.

¹³Toulouse University Hospital, Toulouse, France.

Corresponding author:

Dr N Collongues, Department of Neurology, University Hospital of Strasbourg, I, Place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France
Email: nicolas.collongues@chru-strasbourg.fr

extensive transverse myelitis (LETM) (high-risk myelitis: HRM) or optic neuritis (ON) (high-risk optic neuritis: HRON) and testing positive for NMO-IgG antibodies.^{8–10} These patients are considered at high risk to develop NMO.

The aim of this study was to complete these data by (1) providing detailed clinical and paraclinical data of a large group of HRS patients, and (2) comparing HRM with HRON patients and HRS with NMO patients in the same cohort.

Patients and methods

We performed an observational and retrospective study of NMO in 25 tertiary medical centres in France from September 2007 to September 2008. Two hundred patients with a suspected diagnosis of NMO or HRS were identified. Of these, 125 patients fulfilled the 2006 NMO criteria² and 30 patients presented LETM ($n=18$) or ON ($n=12$) and positive NMO-IgG serology,⁴ as indicated in Figure 1. LETM was defined by spinal cord magnetic resonance imaging (MRI) signal abnormalities extending over more than two vertebral segments, and ON was defined by clinical visual impairment and altered visual evoked potentials (VEP). Data were collected from hospital files or using standardized assessment forms designed for NMO and have been entered in the European Database for MS, adapted to NMO specificities.¹¹ The study was approved by the local ethics committee and data confidentiality and security were ensured in keeping with the recommendations of the French data protection authority, which approved the study.

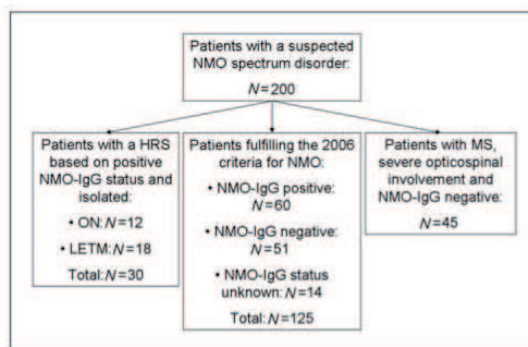


Figure 1. Selection of patients with a high risk syndrome (HRS) for neuromyelitis optica (NMO). Patients in 25 centres in France with a suspected NMO spectrum disorder were divided into the following groups: 1. HRS patients; 2. NMO patients fulfilling the 2006 NMO criteria; 3. MS patients with severe opticospinal involvement and negative NMO-IgG status. ON, optic neuritis; LETM, longitudinal extensive transverse myelitis; MS, multiple sclerosis.

For each patient, we recorded demographic data (gender, race/ethnicity, age at onset, follow-up), medical history of attacks and disability, laboratory data (NMO-IgG, VEP, oligoclonal bands (OCB) in cerebrospinal fluid (CSF)), MRI data and treatments. We excluded other known causes of myelitis and ON. Brain MRI was performed in all patients, spinal cord MRI in 25 patients and VEP in 20 patients. Serum samples were tested for NMO-IgG by an indirect immunofluorescence (IIF) assay on a substrate of adult rat cerebellum and midbrain following the original technical procedures.^{3,5} The Expanded Disability Status Scale (EDSS) score was recorded to determine the extent of the neurological disability.

Categorical data were compared using the chi-squared test, and quantitative data using the Mann–Whitney test. The Kaplan–Meier technique was used to estimate time to assignment of the second attack and the EDSS scores. Survival curves were compared using the log-rank test. Two-sided p values <0.05 were considered statistically significant. All computations were performed using SPSS for Windows, version 14.0.

Results

The clinical characteristics of the HRM and HRON subgroups are summarized in Table 1. One patient had a primary Sjögren's syndrome and one patient had cryoglobulinaemia type III. OCB in CSF were found in 7/18 (38.9%) patients in the HRM subgroup and 5/12 (41.7%) patients in the HRON subgroup. In the HRM subgroup, VEP were altered in four of the eight patients tested. These four were tested 1, 3, 25 and 78 months after disease onset, respectively. In the HRON subgroup, a single, asymptomatic, short central or posterior cervical T2-hyperintense lesion on spinal cord MRI was observed in two patients, 7 and 12 years after the disease onset, respectively. Initial brain MRI can show T2-hyperintense lesions but was normal in nine patients (50%) with HRM and in eight patients (66.7%) with HRON (Table 1). Two patients (10%), both in the HRM subgroup, experienced both OCB and brain MRI lesions.

Eight patients with HRS experienced only one attack and 22 patients had a relapsing–remitting disease course. Monophasic and relapsing patients were similar in terms of demographic, clinical and paraclinical data, but mean follow-up was shorter in monophasic than in relapsing patients (3.9 vs. 5.1 years, $p=0.06$). Six patients with HRM and four patients with HRON were followed up for more than 5 years and had a mean annualized relapse rate of 0.46 ± 0.55 . No progressive course was observed. In the HRS group, EDSS score 4 was reached by 15 patients (50%), score 6 by nine patients (30%) and score 7 by seven

Table 1. Characteristics of the 30 patients with high-risk myelitis (HRM) and optic neuritis (HRON)

	HRM (N = 18)	HRON (N = 12)	p
Demography, n			
Female: male ratio	8:10	6:6	0.76 [§]
White: non-white ratio	16:2	10:2	0.76 [§]
Age at onset (years)			
Mean ± SD	46.4 ± 17.5	37.4 ± 17.4	0.16 [#]
Median [range]	48 [12.4–70]	32.4 [15.1–67.7]	
Distribution, n (%)			
0–18	1 (5.6)	1 (8.3)	0.23 [§]
19–29	3 (16.7)	6 (49.8)	
30–49	6 (33.3)	2 (16.6)	
≥50 years	8 (44.4)	3 (24.9)	
Associated AID, n (%)	1 (5.6)	1 (8.3)	0.65 [§]
Lesions on first brain MRI, n			
0/1–2/3–8/≥9	9/3/3/3	8/3/0/1	0.48 [§]
Follow-up (years)			
Mean ± SD	3.8 ± 2.9	6.3 ± 5.5	0.44 [#]
Median [range]	3.8 [0–11.7]	5 [1.5–18.7]	
Course of the disease			
Relapsing–remitting: Monophasic	11:6	10:2	0.4 [§]
Mean number of attacks after onset			
0–1 year	1.7	1.9	0.37 [#]
0–2 years	1.8	2.1	0.32 [#]
Mean annualized rate of attacks	0.75	0.97	0.58 [#]
First inter-attack interval (months)			
Median [95% CI]	27 [16.2–37.8]	6 [0–16.2]	0.09 [§]
Median time from onset to EDSS 4/6/7 (years)	2.3/3.7/10	7.8/NA/NA	0.06 [§]
Death, n (%)	2 (11.1)	1 (8.3)	0.8 [§]

AID, autoimmune disease; EDSS, Expanded Disability Status Scale; MRI, magnetic resonance imaging; SD, standard deviation; NA, not available. For statistical analysis: [§]chi-squared test, [#]Mann–Whitney test, [§]log-rank test. [°]log-rank was used for EDSS 4 comparison only.

patients (23.3%), though at different interval times (see Table 1). The first myelitis attack was immediately followed by an EDSS score of 4 in 7.7%, 6 in 11.1% and 7 in 33.3% of cases. The high number of censored patients in the HRON subgroup for EDSS scores 6 and 7 is because the interval time to disability was not evaluated. Three patients died, two owing to a diffuse cervical lesion (a 63-year-old woman after the first attack and a 52-year-old woman after a follow-up of 3.5 years) and a 76-year-old man who died from extra-neurological diseases after a mean follow-up of 8.3 years. Among the 30 HRS patients, 25 were treated with immunosuppressive therapies, including the three patients who died. According to the severity of the disease, 14 patients with HRM and eight with HRON were treated with immunosuppressive therapies after the first attack, including five monophasic HRM

patients. Three patients with HRM and two with HRON remained free of treatment after a mean follow-up of 6.7 years, including one patient with monophasic HRM and two patients with monophasic HRON.

Compared with NMO patients, HRS patients had similar demographic and clinical data, except on two points; first, there was a significant predominance of men in the HRS group, especially when compared with the NMO-IgG-positive subgroup of patients with NMO; second, there was a higher mean age at onset, but only in the HRM subgroup (Tables 1 and 2), whatever the NMO-IgG status of the NMO patients. No difference was found when female and male seropositive NMO-IgG patients were compared in the NMO and HRS cohorts. The other points of comparison are mentioned in Table 2.

Table 2. Comparison between NMO and high-risk syndrome (HRS) patients

	NMO (N = 125)	HRS (N = 30)	p
Demography, n			
Female: male ratio	94: 31	14: 16	0.002*
White: non-white ratio	74: 11	26: 4	0.36*
Age at onset (years)			
Mean \pm SD	34.5 \pm 13.2	42.8 \pm 17.7	0.02 [#]
Median [range]	34.7 [4–66]	44.5 [12.4–70]	
Topography of the first attack, n (%)			
Spinal	57 (45.6)	18 (60)	0.8 [#]
Optic	46 (36.8)	12 (40)	
OCB in CSF, n (%)	25 (23.4)	12 (40)	0.27 [#]
Lesions on first brain MRI, n			
Mean \pm SD	0.9 \pm 2.4	1.6 \pm 3.3	0.52 [#]
Follow-up (years)			
Mean \pm SD	10 \pm 7.8	4.8 \pm 4.2	<0.001 [#]
Median [range]	8.7 [0.1–39.5]	3.5 [0–18.8]	
Mean number of attacks			
0–1 year	1.8	1.8	0.5 [#]
0–2 years	2.3	1.9	0.26 [#]
Annualized relapse rate	0.99	0.8	0.66 [#]
First inter-attack interval (months)			
All patients, median [95% CI]	12 [9–15]	22 [8.4–35.6]	0.62 [§]
Patients with relapse, median [95% CI]	12 [9.2–14.8]	10 [1.7–18.3]	0.1 [§]
Time from onset to disability (years)			
EDSS 4, median [95% CI]	7.3 [4.7–9.9]	7.4 [0.1–14.7]	0.25 [§]
EDSS 6, median [95% CI]	10 [7.4–12.6]	8.3 [0.1–16.5]	0.98 [§]
EDSS 7, median [95% CI]	21.4 [7.7–35.1]	10 [7.5–12.5]	0.27 [§]
Censored patients for EDSS scores of 4/6/7	33/50/80	15/21/23	
Death, n (%)	4 (3.2)	3 (10)	0.11 [#]

CSF, cerebrospinal fluid; EDSS, Expanded Disability Status Scale; MRI, magnetic resonance imaging; OCB, oligoclonal bands; SD, standard deviation; CI, confidence interval. For statistical analysis: *chi-squared test, [#]Mann-Whitney test, [§]log-rank test.

Discussion

HRS patients seemed to be similar to definite NMO patients in terms of clinical and paraclinical data, except for a monofocal clinical expression, a predominance of men and, but only in the HRM subgroup, an older mean age at onset. These similarities are supported by the discovery of asymptomatic lesion in HRS patients, which could shorten the time for the diagnosis of NMO according to the bifocal condition of the disease. Importantly, HRS patients also seemed to have a poor prognosis for disability taking into account the two patients who died owing to a diffuse cervical lesion.

Our demographic data show a predominance of men and a late mean age at onset (43 years) in the HRS

group. The sex and age profiles of HRS patients are difficult to interpret because of the small size of the HRS cohort. However, it should be noted that these data argue against a first attack of MS, in which the first demyelinating event predominantly occurs in women around 30 years old. It might appear that a late onset of the disease in men could represent a specific subgroup in which central nervous system inflammation is limited to a monofocal form. However, the following data argue against this hypothesis: first, these demographic data have either not been reported in previous HRS studies^{8–10} or were not reported to be a good prognostic factor for disability;^{4,12} second, no difference was observed between male and female seropositive NMO-IgG patients in the NMO and HRS groups. Therefore, we cannot exclude the possibility that these

particularities were the result of a selection bias due to the size of the HRS cohort.

Considering the high specificity of NMO-IgG and the similarity between the HRS and NMO groups, HRS can be categorized as an NMO spectrum disorder in which: (1) most patients do not present both ON and myelitis within a short time period; and (2) some patients may have a clinical course characterized by recurrent ON or relapsing myelitis only. Furthermore, we found that the HRS group likely corresponded to NMO spectrum patients with a subclinical bifocal disease, as suggested by the altered asymptomatic VEP in HRM patients or by T2-hyperintense spinal cord lesion in HRON patient. In view of these new findings, we propose that asymptomatic lesions could be included in a new set of NMO diagnostic criteria.

To date, only four clinical studies, each including fewer than 15 HRS patients, have been published. Despite the small size of their HRS cohorts, these studies appear to show that HRS patients are likely to develop NMO or recurrent attacks of myelitis/ON. One study found that after a 1-year follow-up of nine patients with HRM, a new transverse myelitis attack had occurred in four patients and ON in one patient¹⁰. More rarely, recurrent episodes of LETM have been described in a patient with acute partial transverse myelitis, defined as short asymmetric lesions (≤ 2 vertebral segments).¹³ Two retrospective studies reported that after a mean follow-up of 5 and 6 years, 50% of the patients with recurrent HRON, compared with fewer than 20% of seronegative patients, developed NMO and that visual acuity was more severe in the seropositive group.^{8,9} These clinical approaches are supported by the neuropathological findings in a patient with HRM, including a pattern of loss of AQP4 expression in demyelinated areas identical to that of NMO patients.¹⁴

Our results confirm, in a large cohort of patients, that HRS corresponds to an NMO spectrum disease and should therefore be an indication for early immunosuppressive therapy. In our study, this conclusion is corroborated by the poor prognosis for disability in HRS patients. To shorten the time for the diagnosis of NMO, we propose that asymptomatic lesions in HRS patients could be included in a new set of NMO diagnostic criteria.

Acknowledgements

The authors would like to thank Vidjeyabaradi Brice for technical and material support, Prof. Pierre Meyer for statistical assistance and Nick Barton for correcting the English.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC and Weinshenker BG. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology* 1999; 53: 1107–1114.
2. Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF and Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 2006; 66: 1485–1489.
3. Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 2004; 364: 2106–2112.
4. Collongues N, Marignier R, Zephir H, et al. Neuromyelitis optica in France: A multicenter study of 125 patients. *Neurology* 2010; 74: 736–742.
5. Marignier R, De Seze J, Vukusic S, et al. NMO-IgG and Devic's neuromyelitis optica: a French experience. *Mult Scler* 2008; 14: 440–445.
6. Nakashima I, Fujihara K, Miyazawa I, et al. Clinical and MRI features of Japanese patients with multiple sclerosis positive for NMO-IgG. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77: 1073–1075.
7. Waters P and Vincent A. Detection of anti-aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica: current status of the assays. *Int MS J* 2008; 15: 99–105.
8. de Seze J, Arndt C, Jeanjean L, et al. Relapsing inflammatory optic neuritis: is it neuromyelitis optica? *Neurology* 2008; 70: 2075–2076.
9. Matiello M, Lennon VA, Jacob A, et al. NMO-IgG predicts the outcome of recurrent optic neuritis. *Neurology* 2008; 70: 2197–2200.
10. Weinshenker BG, Wingerchuk DM, Vukusic S, et al. Neuromyelitis optica IgG predicts relapse after longitudinally extensive transverse myelitis. *Ann Neurol* 2006; 59: 566–569.
11. Confavreux C, Compston DA, Hommes OR, McDonald WI and Thompson AJ. EDMUS, a European database for multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55: 671–676.
12. Cabre P, Gonzalez-Quevedo A, Bonnan M, et al. Relapsing neuromyelitis optica: long term history and clinical predictors of death. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009; 80: 1162–1164.
13. Scott TF, Kassab SL and Pittock SJ. Neuromyelitis optica IgG status in acute partial transverse myelitis. *Arch Neurol* 2006; 63: 1398–1400.
14. Yanagawa K, Kawachi I, Toyoshima Y, et al. Pathologic and immunologic profiles of a limited form of neuromyelitis optica with myelitis. *Neurology* 2009; 73: 1628–1637.

F. Commentaires

F.1 Les patients avec une MLTE et des NMO-IgG ont des myélites sévères

Dans cette cohorte de patients dits « à haut risque » de développer la NMO, les premières myélites étaient sévères, suivies d'un EDSS ≥ 4 dans 52% des cas. Parmi eux, deux patients sont décédés des conséquences directes de leur myélite, immédiatement ou après 3 ans de suivi. Ensuite, la comparaison du handicap de ces patients avec les patients NMO de notre cohorte nationale, n'a pas retrouvé de différence. Cette donnée est également valable pour les différents groupes comparés, que l'anticorps NMO-IgG soit présent ou non. Ces données, mentionnées dans l'étude, sont détaillées dans le **tableau 8**.

	NMO séropositifs	NMO séronégatifs	Syndromes à haut risque de NMO
Nombre de patients	60	51	30
Médiane des âges au début, an	33.5 \pm 13.7	35.1 \pm 12.8	42.8 \pm 17.7
Ratio Femmes/Hommes	51/9	32/19	14/16
Ratio Caucasiens/Non caucasiens	34/10	23/1	26/4
Ratio Rémittent/Monophasique	49/11	41/10	22/8
Délai médian séparant les deux premières poussées, mois	15	11	22
Taux moyen de rechute annuelle par patient	0.88	1	0.8
Délai médian pour EDSS 4/6, an	7.8/8.3 (n=53)	9/11.1 (n=47)	7.4/8.3 (n=30)
Nombre de décès	2	0	3

Tableau 8. Comparaison des différents groupes de patients NMO inclus dans les études cliniques, d'après leur statut en NMO-IgG.

ND : non disponible.

F.2 Fréquence des lésions cérébrales

Parmi les patients de l'étude, sept patients avaient plus de trois lésions à l'IRM cérébrale initiale, remplissant ainsi les critères de Paty (Paty et al., 1988) pour cinq et de Barkhof (Barkhof et al., 1997) pour deux d'entre eux. Parmi ces patients, un patient remplissant les critères de Paty est décédé des conséquences de sa première myélite. Cette constatation nous conduit à penser qu'il faut traiter tôt ces patients par immunosuppresseur, dès que la positivité des NMO-IgG est acquise et ce quel que soit l'aspect de l'IRM cérébrale. Il nous semble dangereux, pour le patient, de s'appuyer sur les critères de SEP pour éluder le diagnostic de NMO, certains de nos patients NMO remplissant les critères de dissémination temporelle et spatiale selon McDonald 2005 de la SEP (Polman et al., 2005).

Dans notre cohorte de patients NMO, l'absence de différence selon les groupes, que le patient soit séropositif pour les NMO-IgG ou non, ainsi que le taux important de 46% de séronégatif, suggère que le NMO-IgG puisse être un marqueur de la pathologie mais pas un élément prédictif du handicap. Comme l'ont montré d'autres études mentionnées dans l'article, il est un élément prédictif de rechute ou de conversion en NMO et constitue par là un argument fort pour traiter nos patients avec une forme monofocale de NMO. Ces patients sont identifiables quant ils ont les NMO-IgG mais restent difficiles à identifier quant ils ne l'ont pas. Mieux caractériser ces patients séronégatifs constitue donc un enjeu majeur pour les années à venir, ce d'autant que, si certains patients séropositifs monofocaux remplissent les critères de SEP, certains patients séronégatifs peuvent être pris pour d'authentiques SEP.

**G. Le modèle de démyélinisation optico-médullaire
chez le rat Brown Norway : caractérisation
phénotypique et corrélation avec le handicap (*Article*
5)**

The Brown Norway optospinal model of demyelination: does it mimic multiple sclerosis or neuromyelitis optica?

N. Collongues ^{a,b,c*}, F. Blanc ^{a,b}, J.B. Chanson ^{a,b}, J. Steibel ^a, C.D. Lam ^a, E. Trifilieff
^a, J. Honnorat ^d, D. Pham-Dinh ^{e,f}, M.S. Ghandour ^a, J. de Seze ^{a,b,c}

^a Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, UMR 7237 CNRS/UDS,
Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, 4 rue Kirschleger, Strasbourg, France

^b Centre Hospitalier Universitaire et Département de Neurologie, 1 place de l'Hôpital,
Strasbourg, France

^c Centre d'Investigation Clinique INSERM 1002, 1 place de l'Hôpital, Strasbourg,
France

^d INSERM U842, 7-11 rue Guillaume Paradin, Lyon, France

^e INSERM U546, Hôpital Armand Trousseau, Paris, France

^f AP-HP Service de neuropédiatrie, Hôpital Armand Trousseau, Paris, France

*Corresponding author: Dr. N. Collongues, Department of Neurology, University
Hospital of Strasbourg, 1, Place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France.

Tel.: +33 88116670; Fax: +33 88116343. E-mail: [nicolas.collongues@chru-
Strasbourg.fr](mailto:nicolas.collongues@chru-Strasbourg.fr)

Running title: The BN optospinal model of demyelination

Keywords: Neuromyelitis optica; Opticospinal multiple sclerosis; Experimental
autoimmune encephalomyelitis; Aquaporin-4; MOG; Brown Norway rat.

Abstract

Opticospinal demyelinating diseases in humans are mostly characterized by the opticospinal form of multiple sclerosis (MS) and neuromyelitis optica (NMO). Increasing attention has been focused recently on astrocyte markers, aquaporin-4 (AQP4) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in these diseases. We induced an opticospinal demyelination in Brown Norway rats with soluble recombinant rat myelin oligodendrocyte glycoprotein (1-116) and incomplete Freund's adjuvant. Clinical, MRI, neuropathological and immunological evaluations were performed, with a focus on AQP4 and GFAP. We confirm the opticospinal phenotype, including extensive myelitis, but also show the involvement of the periventricular area characterized by MRI. Expression level of myelin, AQP4 and GFAP show an early involvement of astrocytes before demyelination in optic nerve. The overexpression of AQP4 was particularly pronounced in spinal cord and was concomitant with demyelination. The disability scores were correlated with demyelination and inflammation but not with AQP4/GFAP expression. No antibodies against the linear and conformational epitopes of AQP4 were detected. Whereas a NMO-like phenotype is observed in this model, the AQP4/GFAP expression during the disease process is most closed to opticospinal MS than NMO astrocytopathy. However, this model ask the question of a continuum between opticospinal MS and seronegative NMO subtype.

Introduction

Opticospinal inflammatory/demyelinating diseases in humans are mostly characterized by two distinct entities, the opticospinal form of multiple sclerosis (MS) and neuromyelitis optica (NMO). NMO is usually a more severe pathology than MS, characterized by disabling optic neuritis and longitudinally extensive transverse myelitis. It is confirmed by autopsy cases which have shown that NMO is characterized by extensive demyelination of the optic nerves and spinal cord, on the basis of the major myelin protein loss that occurs in both the white and grey matter. Contrary to MS, brain MRI is often normal at disease onset in NMO, but brain lesions appear in about 50% of patients during the disease, with the involvement of periependymal regions such as the hypothalamus, corpus callosum, periaqueductal brainstem and periventricular areas (Pittock et al., 2006).

Recently, the involvement of astrocyte aquaporin-4 (AQP4), the dominant central nervous system (CNS) water channel protein, has been demonstrated in NMO. A specific and pathogenic serum autoantibody, called NMO-IgG, recognizing AQP4, has been reported in 50 to 70% of NMO patients but only in 10% of MS patients (Collongues et al., 2010; Lennon et al., 2005; Lennon et al., 2004; Marignier et al., 2008). Neuropathological studies of glial fibrillary acidic protein (GFAP), a specific marker of astrocytes, and AQP4, particularly abundant in the optic nerves, spinal cord and periependymal regions (Nagelhus et al., 1998; Pittock et al., 2006; Vitellaro-Zuccarello et al., 2005), have demonstrated a decreased expression of AQP4 and GFAP in the optic nerve and spinal cord of NMO patients before demyelination (Misu et al., 2007; Roemer et al., 2007; Sinclair et al., 2007). This pattern of immunoreactivity seems different from that encountered in MS by a loss of AQP4 found mainly in strongly demyelinated regions in intensive and acute MS lesions,

whereas overexpression of AQP4 has mostly been observed in other chronic demyelinated tissue due to astrogliosis.

Animal models of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) suggest an important role of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in opticospinal demyelination (Sakuma et al., 2004; Stefferl et al., 1999; Storch et al., 1998). A model in a Brown Norway (BN) rat strain was induced by immunization with rat MOG (1-125) (rMOG) in incomplete Freund's adjuvant (IFA) (Storch et al., 1998). This animal model, characterized by a major antibody-mediated inflammation, showed myelitis and optic neuritis between 30 and 70 days postimmunization (PI). Furthermore, as in NMO, a perivascular deposition of immunoglobulin and complement C9 antigen has been detected in this model. Another model, involving Lewis rats immunized with rMOG in complete Freund's adjuvant (CFA), also resulted in myelitis and optic neuritis, (Sakuma et al., 2004) but with a lower anti-MOG antibody titre than the BN model (Stefferl et al., 1999). More recently, a double-transgenic mouse strain TCR^{MOG} and IgH^{MOG} was engineered, which spontaneously develops a form of EAE similar to NMO (Bettelli et al., 2006; Krishnamoorthy et al., 2006). Besides the role of MOG antigen in inducing opticospinal demyelination, the BN animal model differs from the others by its particular immunological process. It has been demonstrated that activation of B lymphocytes was less pronounced in Lewis rats than in BN rats (Stefferl et al., 1999) and that MOG antigen was more abundant in the optic nerves and spinal cord of BN rats than in Lewis rats (Pagany et al., 2003). Unlike the Lewis or Dark Agouti rat models, the BN rat model with its capacity to generate an antibody response to MOG, induces NMO-like lesions. However, none of the above-mentioned animal models

has been characterized by MRI or by the description of AQP4/GFAP expression during pathogenesis.

In view of the reported similarities between the BN MOG-induced model and opticospinal disease in humans, we used this model to explore the opticospinal phenotype, to report neuropathological evaluations of myelin, AQP4 and GFAP expression and to look for correlations with disability.

Material and methods

Animals

Immunization with MOG: experiments were performed on 8- to 10-week-old female BN rats (130-150 g) obtained from Janvier (France). A total of 32 rats were analyzed in the present study. During the observation period the rats were kept under environmentally controlled conditions. The experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23, revised 1996); the Institutional Animal Care and Use Committee of Strasbourg University approved all the experiments.

Reagents

Recombinant MOG rat protein corresponding to the N-terminal sequence of rat MOG (1-116) (rMOG) was prepared as previously described (Delarasse et al., 2003). IFA was purchased from Sigma-Aldrich (France). Recombinant rMOG and AQP4 peptides were used for the enzyme-linked immunoassay (ELISA) test. Seven AQP4 peptide sequences were selected (Table 1): intracellular peptides (IP1 to 5) and two extracellular peptides (EP1 and EP2). The peptides were synthesized by the

proteomic platform of Neuroscience IFR 37 (Strasbourg, France) and purified by RP-HPLC. The purity of the peptides was more than 95% and their identities were confirmed by mass spectrometry.

Induction and evaluation of EAE

Twenty-five rats were immunized at the base of the tail with 100 μ l of rMOG emulsified with the same volume of IFA in a total volume of 200 μ l, corresponding to 100 μ g of rMOG per rat. Anaesthesia for immunization and blood collection was induced by intra-peritoneal injection of 37 mg/kg of ketamine (Ketalar, Parke-Davis) and 5.5 mg/kg of xylazine (Rompun, Bayer). Seven rats were used as controls and were immunized with IFA alone.

The animals were weighed and examined daily for EAE clinical signs and scored on the following scale: 0 = no weakness; 1 = weakness of the tail only; 2 = walking disability without any motor dysfunction; 3 = walking disability with motor dysfunction; 4 = paraplegia; 5 = tetraplegia; 6 = death. Relapse and remission were defined respectively as an increase or a decrease in clinical score of at least one point for at least two days. Consecutive relapses or remissions were considered as a single event.

MRI

The brains, optic nerves and spinal cords were assessed *in vivo* by MRI at different time intervals. Three time-points were chosen on the basis of clinical disability as described in the literature, (Storch et al., 1998) corresponding to the early stage (days 0 to 29), the disease stage when clinical signs were visible (days 30 to 70) and the late stage (after 70 days), when no further clinical signs were noted. Four rats were

examined by MRI and then sacrificed during the early stage of the disease at day 10 and day 25 and during the disease stage at day 45. Longitudinal follow-up by MRI was performed for three rats from the disease stage, at day 30 and day 45 until the late stage, at day 100 (Fig. 1). Two IFA-injected rat were used as controls for each MRI time-point. The rats were anaesthetized with a mixture of isoflurane and oxygen at 5% for induction and 1.5% for maintenance. Imaging was performed using a 4.7 Tesla MR magnet, equipped with self-shield gradient coils from Magnex Sci. Ltd. (Oxford, United Kingdom) and an MR spectrometer from S.M.I.S. Ltd. (now M.R.R.S., Guildford, United Kingdom). The animals were placed in a stereotaxic device to immobilize the head, with an integrated heating facility to maintain the body temperature at 37°C. An anatomically shaped ¹H surface coil for small animals (Rapid Biomedical GmbH, Würzburg, Germany) was placed over the head to serve as a receiver for the magnetic resonance signal. The system was then placed into a ¹H resonator (Rapid Biomedical GmbH) for rats and mice, which was slid into the magnet. Multiparametric T2-weighted MRI was performed with a repetition time of 3800 ms and an echo time of 30 ms in the control and MOG-immunized rats. The slice thickness was 1 mm and field of view (FOV) ranged from 25 to 50 mm according to the anatomic areas explored. For an FOV 25 x 25 mm² with data matrix 256 x 256 (zero filled to 512 x 512), the in-plane resolution was 50 µm.

Histopathology and immunohistochemistry

After MOG injection, rats were killed at different time point: eight at the early stage, eight at the disease stage and nine at the late stage (Table 3). Seven control rats were used as follows: two at the early and disease stage, three at the late stage. For tissue fixation, the rats were perfused via the heart with 4% paraformaldehyde. Brains, optic

nerves and spinal cords were removed and postfixed in the same fixative. Paraffin-embedded tissues were then processed for conventional light microscopy. Eight-micrometre-thick sections were used for demyelination evaluation with luxol fast blue/cresyl violet (LFB/c) and inflammation was evaluated with haematoxylin/eosin (HE).

In adjacent serial sections, immunohistochemistry was performed on paraffin sections using indirect immunofluorescence or a peroxidase-biotinylated antibody for the amplification technique (Vector VIP SK-4600, Vector Laboratories). The primary antibodies used are listed in Table 2. The anti-MOG monoclonal antibody was a gift from Dr. Linnington (Linnington et al., 1984). Control sections were incubated in the absence of primary antibody or with non-immune rabbit serum.

Myelin basic protein (MBP) and LFB/c were used for demyelination. An extensive demyelination was noted when a transverse spinal cord or bilateral optic nerve demyelination was observed. HE and ED1 were used to characterize the extent of inflammation. A marked inflammation was noted when the number of infiltrating cells was ≥ 20 cells in a surface of $100 \times 100 \mu\text{m}^2$, determined by using the NIS.Elements D3.2 imaging software (Nikon Inc., New York, USA). AQP4 and GFAP expression was evaluated using the following scores: -2, marked decreased expression; -1, mild decreased expression; 0, similar to control; +1, mild increased expression; +2, marked increased expression. Histological scores were established compared to controls IFA-injected rats. For each rat, three sections/area (including the optic nerves, the spinal cord and the periventricular areas) were used. This scale was calculated from results obtained by blind tests of tissue sections by two independent observers.

Enzyme-linked immunoassay (ELISA)

Blood was collected either from the tail vein or by cardiac puncture immediately before perfusion with the fixative. After clotting at 4°C the sera were collected by centrifugation and stored at -20°C. Antigens were coated on 96-well plates. Antigens were diluted at 20 µg/ml in a coating buffer solution and incubated for one hour at 37°C. Antigen-coated plates were incubated with 1:10 to 1:1000 serial dilutions of sera from normal and immunized animals for one hour at 37°C. After washing, an appropriate dilution of peroxidase-conjugated anti-rat IgG (A9037, Sigma) was applied at 1:10000 for one hour. The reaction product was then visualized after incubation of the substrate ortho-phenylene-diamine diluted at 1.5 mg/ml, for 30 minutes. The optical density (OD) was measured at 450 nm. The results are given as a mean of triplicate values. Cut-off was determined as the mean OD in the IFA group with three standard deviations. Separate assays were carried-out for each individual AQP4 peptide noted in Table 1. Control wells were incubated without primary antibodies.

AQP4-Ig assay

All serum samples were examined for the presence of NMO-IgG using the described immunofluorescence technique on AQP4 transfected cells, developed by INSERM U842 laboratory (Lyon, France) (Lennon et al., 2004). Briefly, a full-length human AQP4 cDNA (NM_001650, Origene, Rockville, USA) was amplified by PCR and inserted directionally into the Bgl2 and Kpn1 restriction sites of the pEGFP-C1 vector (Clontech, France). The identity of AQP4 was confirmed by protein sequencing. The purified plasmid was used to transfect human embryonic kidney cells (HEK 293) using the calcium phosphate method in compliance with the

manufacturer's protocol (Invitrogen, France). Twenty-four hours post transfection, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde, washed in PBS and blocked with PBS containing 2% BSA and 0.1% Triton X-100. Rat sera were incubated overnight at a dilution of 1:50. Alexa fluor 546 anti-human IgG (Invitrogen, France) was used as secondary antibody. Positive controls were performed using a rabbit anti-rat AQP4 polyclonal antibody (Millipore, France) and a human serum clearly positive for NMO-IgG.

Statistical analysis

Mann-Whitney *U* test was used to analyze MOG immunoreactivity in serum samples of rat immunized with MOG, as a function of postimmunization time. Spearman's rank correlation test was used to test a sequence of pairs of values including the clinical score, the OD, the presence of demyelination, inflammation and the histological scores of AQP4 and GFAP in optic nerves, spinal cord and periventricular areas for all the rats at each stage of the disease. Bonferroni correction was made because of multiple comparisons performed for statistical correlation. Two-sided *p* values <0.005 were considered statistically significant. Statistical analysis was performed using SPSS 14.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, USA).

Results

Clinical course of MOG-induced EAE

All animals were evaluated daily using the clinical scale described in Animals and methods. In the control groups, no disability was detected. Clinical data for MOG-immunized rats at different time point (early, disease and late stages) are summarized in Table 3. After immunization with MOG, the mean time to the first clinical score

was 41 ± 14 days and 46 ± 16 days to the maximal clinical score. As expected, only two MOG-immunized rats developed clinical signs during the early stage of the disease. MOG-induced EAE was observed in 82% of rats at the two subsequent stages of the disease. A single clinical event was observed in 93% of rats, followed by an onset of recovery. Only one rat experienced a relapsing course, with two distinct clinical events five days apart. No progressive course was noted. No rats died during the clinical course.

Lesion topography

Topography of the lesions by MRI

No abnormality was observed in control rats at the different stages of the experimental procedure. In MOG-injected rats, during the early stage, the animals were healthy and the MRI scans were normal (Fig. 2A-C). In three rats examined in the disease stage at day 30, T2-hypersignal abnormalities were observed in the periventricular zone (Fig. 2D) and optic nerve (Fig. 2E) in two rats and one rat showed abnormalities in spinal cord (Fig. 2F). MRI follow-up of these rats showed a persisting T2-hypersignal in the spinal cord whereas other abnormalities disappeared after day 45, when the clinical disability score was dramatically reduced. MRI examination of four additional rats at day 45 showed T2-hypersignal in the spinal cord of two rats only. After day 70, no abnormal T2-hypersignal was identified in these regions of interest.

Topography of demyelination and inflammation

No histopathological signs of EAE were observed in the control group. Chronological evaluation of demyelination and inflammation in the rats immunized with MOG is

reported in Table 3. In these rats, the brain was always spared whereas signs of demyelination were found in spinal cord, optic nerves/tracts and optic chiasms at the disease and late disease stages. None of the rats sacrificed at the early stage presented demyelination or inflammation in optic nerve. During the disease stage, demyelination was noted in more than 80% of optic nerves (Fig. 3A, B) and spinal cords (Fig. 3F, G). Most of them were strongly infiltrated by inflammatory ED1 positive cells in demyelinated areas of the optic nerve (Fig. 3C-E) and spinal cord (Fig. 3H-J). Of seven animals with optic nerve involvement, demyelination was bilateral in two animals. In spinal cord, three rats experienced an extensive demyelination with transverse myelitis affecting the cervical, thoracic and lumbosacral regions. At the late stage, we mainly observed isolated demyelination without inflammatory cells and bilateral optic nerve demyelination was noted in two rats whereas no extensive myelitis was observed.

Expression of AQP4 and GFAP

The analysis of the intensity of immunostaining was performed using antibodies against AQP4 to examine AQP4 expression during the development of the disease, whereas antibodies against GFAP were used to evaluate astrocyte expression. Scores were calculated on the basis of AQP4 and GFAP immunostaining in IFA rats at the different stages of experimentation (see Material and methods). AQP4 and GFAP histological scores are presented in Table 3. In the optic nerve, immunoreactivity to AQP4 and GFAP was mild decreased at the early stage, before the onset of a visible demyelination and inflammation. During the disease stage, AQP4 level continued to decrease while GFAP level increased significantly and remained high until the late stage of the disease. AQP4 and GFAP levels in spinal cord and periventricular area

were increased constantly during the all three stages but the level in the periventricular area showed lower scores when compared with spinal cord.

Optic nerve transverse sections of MOG-immunized rats, at the early stage, showed a reduced AQP4 and GFAP immunostaining in 3/8 rats examined (Fig. 4B, F). At the disease stage, a decrease in the expression of AQP4 was observed in 7/8 rats (Fig. 4C). In comparison, GFAP expression increased in 5/8 and 5/9 animals at both the disease stage (Fig. 4G) and late stage (Fig. 4H). AQP4 immunostaining intensity remained lower for a longer time than GFAP in some animals, with 3/9 rats showing decreased levels and 3/9 showing increased levels at the late stage (Fig. 4D).

In spinal cord of affected rats, an increase in AQP4 immunostaining level was accompanied by an increase in GFAP immunoreactivity at the early stage in 3/8 rats. At the disease stage, both AQP4 and GFAP immunostaining intensity was increased in 7/8 rats and 6/8 rats, and was observed in both grey and white matter of the spinal cord (Fig 5B, D). The immunoreactivity was particularly strong at the disease stage and accompanied by an astrocytic hypertrophy (Fig 5D) when compared to controls (Fig 5C). At the late stage, both AQP4 and GFAP immunostaining intensity was increased in 5/9 rats and 8/9 rats. Brain periventricular areas showed a slight increase in AQP4 and GFAP immunostaining at the early stage. The level of both markers continued to increase during the disease stage (Fig. 6B, D) and remained high until the late stage.

Immunological evaluation

ELISA detection of immunoreactivity against MOG and AQP4

ELISA experiments confirmed that immunization with rMOG induced an increasing antibody response from day 0 to day 46, when the maximal OD was noted (Fig. 7).

No significant immunoreactivity against individual AQP4 peptides described in Table 1 was found by ELISA.

AQP4-Ig assay detection of immunoreactivity against AQP4

Rat sera tested against conformational AQP4 using the immunofluorescence and immunocytochemical techniques with human AQP4 transfected cell line were also negative (data not shown).

Correlations between the clinical and histological scores and MOG antibody level

Using a nonparametric test, we observed a correlation between the high clinical score at sacrifice and the increase of histological scores for demyelination and inflammation in optic nerve ($p < 0.001$) and spinal cord ($p < 0.001$). The modification of histological scores for AQP4 was not correlated with clinical scores in spinal cord ($p = 0.02$), optic nerve ($p = 0.02$) and in the periventricular area ($p = 0.1$). The modification of histological scores for GFAP was not correlated with clinical scores in spinal cord ($p = 0.51$), optic nerve ($p = 0.74$) and the periventricular area ($p = 0.84$). No correlation was found between the clinical scores and the level of MOG antibodies in immunized rat sera ($p = 0.1$).

Discussion

In this study, we characterized by MRI and histology the opticospinal phenotype of the BN MOG-induced model of demyelination. We added to its previous description the involvement of the periventricular area and we recorded the expression of myelin, AQP4 and GFAP in the optic nerves, spinal cords and periventricular areas. The modification of AQP4 level occurred despite the absence of antibodies tested against

linear and conformational epitopes of AQP4. Furthermore, the elevation of disability scores in rats was only synchronized with the severity of demyelination/inflammation in the optic nerve and spinal cord but not with the modification of AQP4 or GFAP expression.

In the present study, we added the involvement of the periventricular area to the opticospinal phenotype in the BN MOG-induced animal model. This area was free of any demyelination during the disease process but showed T2-hypersignal on MRI at the disease stage. This observation indicated a water flux abnormality in this area and was supported by a local modification of AQP4 expression, playing a crucial role in water transport across the blood-brain barrier. With optic nerve and spinal cord, the periventricular area underlines the implication of regions containing high level of AQP4 in this model (Nielsen et al., 1997; Venero et al., 1999).

AQP4 immunostaining showed different patterns of expression in the three regions of interest. During the disease process in the optic nerve, we observe a transient low level of AQP4, which starts before demyelination, and can be attributed to vasogenic oedema, blood-brain-barrier impairment and/or inflammation that may lead to astrocyte degeneration (Ke et al., 2001; Sattler et al., 2008). In view of the excess fluid seen in the white matter and the regressive T2-hypersignal observed at the disease stage in optic nerve, vasogenic oedema seems to be the main actor in the AQP4 physiopathological process. During the later stage, a healing process may explain the extensive gliosis and increased AQP4 expression. In contrast, astrocytes in the spinal cord and the periventricular areas of the brain became hypertrophic early in grey and white matter and expressed higher immunoreactivity to AQP4 throughout the disease course. This finding may have resulted from cytotoxic oedema fluid, characterized by astrocyte hypertrophy, which is known to accumulate in both grey

and white matter (Papadopoulos et al., 2004). This hypothesis is also supported by the persistent T2-hypersignal MRI in spinal cord at the late stage, whereas the course of the vasogenic oedema is usually regressive after the inflammatory process. Further experimentation with diffusion and gadolinium MRI is in progress in our laboratory to try to resolve this question.

As expected, disability was correlated with the presence of demyelinating and inflammatory lesion. At the opposite, disability was not correlated with AQP4 response as attested by the increasing immunostaining level of AQP4 in the spinal cord and the decreasing immunostaining level in optic nerve. No correlation was found between disability and GFAP level of expression in spinal cord because astroglisis at the late stage of the disease may represent the glial scar in a monophasic disease without sequellae at the late stage. Nevertheless, the expected differences between the type of oedema in spinal cord and optic nerve suggest that there may also be differences in the physiological functions of the blood-brain barrier and the blood-spinal cord barrier (Saadoun and Papadopoulos, 2010).

In EAE animal models, few studies reported an increase in AQP4 expression in spinal cord and brain using RT-PCR (Miyamoto et al., 2009) or a strong astrocyte reactivity in the spinal cord by immunohistochemistry (Pham et al., 2009). No data were available about modifications in the expression of both AQP4 and GFAP in the reported EAE models in optic nerve or the location of acute AQP4 overexpression in the brain. A recent study in an MOG-induced EAE model showed the attenuation of disease progression in AQP4 knockout mice (Li et al., 2009). Other experimental data were obtained with a MOG-induced EAE model in NOD/Lt and C57BL/6 mice, known to develop a diffuse inflammatory process not limited to the opticospinal

location. Furthermore, CFA and pertussis toxin were largely used, which are known to alter blood-brain barrier permeability (Lu et al., 2008; Namer et al., 1994). Comparison with opticospinal demyelinating diseases in humans suggests that whereas an NMO-like phenotype is observed in this model, the course of AQP4/GFAP expression during the disease process is most closed to opticospinal MS than NMO astrocytopathy. Effectively, the overexpression of AQP4 in the spinal cord has been observed in MS but not in NMO. Furthermore, no antibody against linear and conformational epitopes of AQP4 was found. On the other hand, 50% of patients with NMO experienced brain involvement (including periventricular region) during the disease course and 30-50% of patients are negative to NMO antibody. At last, the decrease of AQP4 expression before demyelination in the optic nerve fits what is observed in NMO. All taken together, our experimental data ask the question of a continuum between the opticospinal MS and the seronegative NMO subtype as reported in several countries (Cabre et al., 2009a; Collongues et al., 2010; Misu et al., 2002).

Conclusion

At this point, several authors have attempted to reproduce NMO lesion in animal model. Whereas the pathogenicity of AQP4 antibody has been demonstrated in animal models, (Bradl et al., 2009; Kinoshita et al., 2009) no one has concomitantly developed the opticospinal demyelination. Our BN-MOG induced model develop a NMO-phenotype, an early implication of AQP4 in optic nerves due to vasogenic oedema, and disability was correlated with the intensity of the inflammatory process in demyelinated spinal cord and optic nerve. Despite these similarities with NMO in humans, the cytotoxic oedema with AQP4 overexpression in spinal cord during the

disease process, the involvement of periventricular area and the absence of anti-AQP4 antibodies are most closed to what is observed in MS. We think that this model ask the question of a continuum between opticospinal MS and seronegative NMO subtype.

Acknowledgements

This work was supported by the Société Française de Neurologie (Nicolas Collongues) and the Académie de Médecine (Jean-Baptiste Chanson). We thank Veronique Rogemond and Gaelle Cavaillon for their technical assistance in NMO-IgG and AQP4 transfected cell assays, Blandine Guignard for her technical support in MRI scan acquisitions and Prof. Pierre Meyer for his contribution to the statistical analysis.

References

- Bettelli, E., Baeten, D., Jager, A., Sobel, R.A., Kuchroo, V.K., 2006. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. *J Clin Invest* 116, 2393-2402.
- Bradl, M., Misu, T., Takahashi, T., Watanabe, M., Mader, S., Reindl, M., Adzemovic, M., Bauer, J., Berger, T., Fujihara, K., Itoyama, Y., Lassmann, H., 2009. Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. *Ann Neurol* 66, 630-643.
- Cabre, P., Gonzalez-Quevedo, A., Bonnan, M., Saiz, A., Olindo, S., Graus, F., Smadja, D., Merle, H., Thomas, L., Cabrera-Gomez, J.A., 2009. Relapsing neuromyelitis optica: long term history and clinical predictors of death. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 80, 1162-1164.
- Collongues, N., Marignier, R., Zephir, H., Papeix, C., Blanc, F., Ritleng, C., Tchikviladze, M., Outteryck, O., Vukusic, S., Fleury, M., Fontaine, B., Brassat, D., Clanet, M., Milh, M., Pelletier, J., Audoin, B., Ruet, A., Lebrun-Frenay, C., Thouvenot, E., Camu, W., Debouverie, M., Creange, A., Moreau, T., Labauge, P., Castelnovo, G., Edan, G., Le Page, E., Defer, G., Barroso, B., Heinzlef, O., Gout, O., Rodriguez, D., Wiertlewski, S., Laplaud, D., Borgel, F., Tourniaire, P., Grimaud, J., Brochet, B., Vermersch, P., Confavreux, C., de Seze, J., 2010. Neuromyelitis optica in France: a multicenter study of 125 patients. *Neurology* 74, 736-742.
- Delarasse, C., Daubas, P., Mars, L.T., Vizler, C., Litznerburger, T., Iglesias, A., Bauer, J., Della Gaspera, B., Schubart, A., Decker, L., Dimitri, D., Roussel, G., Dierich, A., Amor, S., Dautigny, A., Liblau, R., Pham-Dinh, D., 2003. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein-deficient (MOG-deficient) mice reveal lack of immune tolerance to MOG in wild-type mice. *J Clin Invest* 112, 544-553.

- Ke, C., Poon, W.S., Ng, H.K., Pang, J.C., Chan, Y., 2001. Heterogeneous responses of aquaporin-4 in oedema formation in a replicated severe traumatic brain injury model in rats. *Neurosci Lett* 301, 21-24.
- Kinoshita, M., Nakatsuji, Y., Kimura, T., Moriya, M., Takata, K., Okuno, T., Kumanogoh, A., Kajiyama, K., Yoshikawa, H., Sakoda, S., 2009. Neuromyelitis optica: Passive transfer to rats by human immunoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* 386, 623-627.
- Krishnamoorthy, G., Lassmann, H., Wekerle, H., Holz, A., 2006. Spontaneous optico-spinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *J Clin Invest* 116, 2385-2392.
- Lennon, V.A., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., Verkman, A.S., Hinson, S.R., 2005. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *The Journal of experimental medicine* 202, 473-477.
- Lennon, V.A., Wingerchuk, D.M., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., Lucchinetti, C.F., Fujihara, K., Nakashima, I., Weinshenker, B.G., 2004. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 364, 2106-2112.
- Li, L., Zhang, H., Verkman, A.S., 2009. Greatly attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in aquaporin-4 knockout mice. *BMC Neurosci* 10, 94.
- Linnington, C., Webb, M., Woodhams, P.L., 1984. A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *Journal of neuroimmunology* 6, 387-396.
- Lu, C., Pelech, S., Zhang, H., Bond, J., Spach, K., Noubade, R., Blankenhorn, E.P., Teuscher, C., 2008. Pertussis toxin induces angiogenesis in brain microvascular endothelial cells. *J Neurosci Res* 86, 2624-2640.

- Marignier, R., De Seze, J., Vukusic, S., Durand-Dubief, F., Zephir, H., Vermersch, P., Cabre, P., Cavillon, G., Honnorat, J., Confavreux, C., 2008. NMO-IgG and Devic's neuromyelitis optica: a French experience. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 14, 440-445.
- Misu, T., Fujihara, K., Kakita, A., Konno, H., Nakamura, M., Watanabe, S., Takahashi, T., Nakashima, I., Takahashi, H., Itoyama, Y., 2007. Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain* 130, 1224-1234.
- Misu, T., Fujihara, K., Nakashima, I., Miyazawa, I., Okita, N., Takase, S., Itoyama, Y., 2002. Pure optic-spinal form of multiple sclerosis in Japan. *Brain* 125, 2460-2468.
- Miyamoto, K., Nagaosa, N., Motoyama, M., Kataoka, K., Kusunoki, S., 2009. Upregulation of water channel aquaporin-4 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of the neurological sciences* 276, 103-107.
- Nagelhus, E.A., Veruki, M.L., Torp, R., Haug, F.M., Laake, J.H., Nielsen, S., Agre, P., Ottersen, O.P., 1998. Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci* 18, 2506-2519.
- Namer, I.J., Steibel, J., Poulet, P., Mauss, Y., Mohr, M., Chamberon, J., 1994. The role of *Mycobacterium tuberculosis* in experimental allergic encephalomyelitis. *European neurology* 34, 224-227.
- Nielsen, S., Nagelhus, E.A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P., Ottersen, O.P., 1997. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* 17, 171-180.

- Pagany, M., Jagodic, M., Bourquin, C., Olsson, T., Linington, C., 2003. Genetic variation in myelin oligodendrocyte glycoprotein expression and susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 139, 1-8.
- Papadopoulos, M.C., Manley, G.T., Krishna, S., Verkman, A.S., 2004. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *Faseb J* 18, 1291-1293.
- Pham, H., Ramp, A.A., Klonis, N., Ng, S.W., Klopstein, A., Ayers, M.M., Orian, J.M., 2009. The astrocytic response in early experimental autoimmune encephalomyelitis occurs across both the grey and white matter compartments. *Journal of neuroimmunology* 208, 30-39.
- Pittock, S.J., Lennon, V.A., Krecke, K., Wingerchuk, D.M., Lucchinetti, C.F., Weinshenker, B.G., 2006. Brain abnormalities in neuromyelitis optica. *Archives of neurology* 63, 390-396.
- Roemer, S.F., Parisi, J.E., Lennon, V.A., Benarroch, E.E., Lassmann, H., Bruck, W., Mandler, R.N., Weinshenker, B.G., Pittock, S.J., Wingerchuk, D.M., Lucchinetti, C.F., 2007. Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Brain* 130, 1194-1205.
- Saadoun, S., Papadopoulos, M.C., 2010. Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema. *Neuroscience* 168, 1036-1046.
- Sakuma, H., Kohyama, K., Park, I.K., Miyakoshi, A., Tanuma, N., Matsumoto, Y., 2004. Clinicopathological study of a myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced demyelinating disease in LEW.1AV1 rats. *Brain* 127, 2201-2213.
- Sattler, M.B., Togni, M., Gadjanski, I., Suhs, K.W., Meyer, N., Bahr, M., Diem, R., 2008. Strain-specific susceptibility for neurodegeneration in a rat model of autoimmune optic neuritis. *Journal of neuroimmunology* 193, 77-86.

Sinclair, C., Kirk, J., Herron, B., Fitzgerald, U., McQuaid, S., 2007. Absence of aquaporin-4 expression in lesions of neuromyelitis optica but increased expression in multiple sclerosis lesions and normal-appearing white matter. *Acta Neuropathol* 113, 187-194.

Stefflerl, A., Brehm, U., Storch, M., Lambracht-Washington, D., Bourquin, C., Wonigeit, K., Lassmann, H., Linington, C., 1999. Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces experimental autoimmune encephalomyelitis in the "resistant" Brown Norway rat: disease susceptibility is determined by MHC and MHC-linked effects on the B cell response. *J Immunol* 163, 40-49.

Storch, M.K., Stefflerl, A., Brehm, U., Weissert, R., Wallstrom, E., Kerschensteiner, M., Olsson, T., Linington, C., Lassmann, H., 1998. Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 8, 681-694.

Venero, J.L., Vizueté, M.L., Ilundain, A.A., Machado, A., Echevarria, M., Cano, J., 1999. Detailed localization of aquaporin-4 messenger RNA in the CNS: preferential expression in periventricular organs. *Neuroscience* 94, 239-250.

Vitellaro-Zuccarello, L., Mazzetti, S., Bosisio, P., Monti, C., De Biasi, S., 2005. Distribution of Aquaporin 4 in rodent spinal cord: relationship with astrocyte markers and chondroitin sulfate proteoglycans. *Glia* 51, 148-159.

Figure Legends

Fig. 1. A work plan summarizing the MRI experimental procedure for the groups of rats immunized with MOG.

¹Two IFA-injected rats were used as controls at each stage of the disease course.

Fig. 2. Brain, optic nerve and spinal cord MRI in control and MOG-immunized rats. The figure shows brain, optic nerve and spinal cord in control rats (**A-C**) and MOG-immunized rats (**D-F**). During the disease stage at day 30 in the three rats examined by MRI, T2-hypersignals were detected in the periventricular area and optic nerves of two rats (**D, E**) and the spinal cord in one rat (**F**). The dotted lines in **D** and **F** delineate the T2-hypersignal in the periventricular area and spinal cord, respectively. The arrow in **E** shows T2-hypersignal in optic nerve.

Fig. 3. Optic neuritis and myelitis at the disease stage in MOG-immunized rats. Transversal section reveals a defect in blue staining by LFB/c in the left optic nerve (**A**). Longitudinal diencephalic section of the same rat confirm a loss of myelin, as shown by a loss of MBP immunostaining, corresponding to a whole unilateral demyelination of the optic nerve (**B**). Compared to control rats (**C**), transversal sections of a demyelinated optic nerve (**D**) stained with HE shows marked mononuclear cell infiltration with phagocytic activity in the totality of the section, as shown at higher magnification in box **C** and attested by the ED1 immunostaining (**E**). Longitudinal section of thoracic spinal cord in rat at the disease stage shows a defect in blue staining by LFB/c, corresponding to an extensive, 6-mm-long myelitis (**F**). Transversal section of the same rat confirm the loss of myelin by a loss of MBP immunostaining and shows a transverse demyelination (**G**, right side) compared to

control rats (**G**, left side). Compared to control rats (**H**), coloration with HE in a demyelinated spinal cord area shows cell infiltration in grey and white matter (**I**). Higher magnification in this box shows marked cells infiltration, ED1 positive (**J**), without any myelin debris in their cytoplasm. The dotted line in B delineates the demyelinated optic nerve. The double arrow in F indicates the length of the demyelinated spinal cord. LFB/c = luxol fast blue/cresyl violet; MBP = myelin basic protein; HE = haematoxylin/eosin.

Fig. 4. AQP4 and GFAP immunostaining in optic nerve of control and MOG-immunized rats with histological scores (HS)¹ during the disease process.

The figure illustrates AQP4 and GFAP immunostaining in optic nerve of control (**A and E**) and MOG-immunized rats (**B-D, F-H**). In optic nerve, decreased expression of AQP4 (-1) was noted at the early stage (**B**), with a maximal decrease at the disease stage (-2) (**C**). AQP4 overexpression was delayed until the late stage of the disease (+2) (**D**). A decreased expression of GFAP (-1) was observed at the early stage (**F**). A progressive overexpression of GFAP was noted from the disease stage (+1) (**G**) to the late stage of disease (+2) (**H**).

¹For detail of the histological score, see Animals and methods.

Fig. 5. Disease stage: AQP4 and GFAP immunostaining in spinal cord of control and MOG-immunized rats with histological scores (HS)¹.

The figure illustrates AQP4 and GFAP immunostaining in spinal cord of control (**A and C**) and MOG-immunized rats at the disease stage (**B and D**) at the same spinal cord level. In spinal cord, a continuous increase in the expression of AQP4 (+2) (**B**)

and GFAP (+2) (**D**) associated with gliosis and astrocytic hypertrophy was observed during demyelination.

¹For detail of the histological score, see Animal and methods.

Fig. 6. Disease stage: AQP4 and GFAP immunostaining in periventricular areas of control and MOG-immunized rats with histological scores (HS)¹.

The figure illustrates AQP4 and GFAP immunostaining in periventricular areas of control (**A and C**) and MOG-immunized rats at the disease stage (**B and D**). In brain, a moderate, continuous increase in the expression of AQP4 (+1) (**B**) and GFAP (+1) (**D**), accompanied by gliosis and astrocytic hypertrophy was observed without demyelination.

¹For detail of the histological score, see Animals and methods.

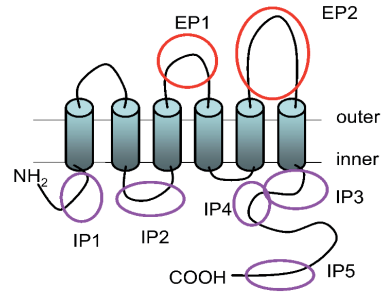
Fig. 7. Boxplot of MOG immunoreactivity (ELISA) in serum samples of MOG-immunized rat, as a function of post-immunization time.

Before immunization (day 0), the mean optical density (OD) was (mean \pm standard deviation) 14 ± 8 (n=7). After immunization, mean OD was 200 ± 89 at day 10 (n=4) and 1368 ± 242 at day 25 (n=4) for the early stage of the disease and 1456 ± 539 at day 45 (n=4) at the disease stage. At the late stage, mean OD was 779 ± 196 at day 160 (n=6). * Statistical difference compared to day 0.

Tables

Table 1. Synthetic peptides of AQP4 used in this study

1. IP1 = p.2-21	SDGAAARRWGKSGHSSSRQS
2. IP2 = p.96-115	INPAVTVAMVCTRKISIAKS
3. EP1 = p.137-156	TPPSVVGGLGVTMVHGNLTA
4. EP 2 = p.207-231	YTGASMNPARSFGPAVIMGNWENHW
5. IP 3 = p.251-269	VFCPDVEFKRRFKEAFSKA
6. IP 4 = p.267-285	SKAAQQTKGSYMEVEDNRS
7. IP 5 = p.301-319	VIDVDRGEEKKKGKDQSGEV



IP 1-5: intracellular peptides 1 to 5. EP 1 and 2: extracellular peptides 1 and 2.

Table 2. Antibodies used for immunohistochemistry

Antigen	Ab type	Target	Dilution	Ab anti-rat /revelation	Source
AQP4	Polyclonal	Astrocytes/endothelium/ependymocytes	1:20	Rabbit IgG /DAB.	Sigma
ED1	Monoclonal	Macrophages/activated microglia	1 :200	Mouse IgG /DAB	Serotec
GFAP	Polyclonal	Astrocytes	1:200	Rabbit IgG /DAB	DAKO
MBP	Monoclonal	Myelin	1:50	Mouse IgG /fluor.	Home made
MOG	Monoclonal	Myelin/oligodendrocytes	1:10	Mouse IgG /DAB	(Linnington et al., 1984)

AQP4: aquaporin-4, GFAP: glial fibrillary acidic protein, MBP: myelin basic protein, MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein.

Table 3. Clinical and histological evaluations of the MOG-injected rats.

Rats	Days post-immunization		Scores		Optic nerves			Spinal cords			Periventricular areas					
	First CS	Max. CS	Max.	Sac.	DM	INF	AQP4 ¹	GFAP ¹	DM	INF	AQP4 ¹	GFAP ¹	DM	INF	AQP4 ¹	GFAP
1.	-	-	10	0	-	-	0	0	-	+	0	0	-	-	+1	0
2.	-	-	10	0	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	+1	+1
3.	-	-	10	0	-	-	-1	-1	-	-	0	0	-	-	0	0
4.	-	-	10	0	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	0	0
5.	-	-	25	0	-	-	-1	-1	-	-	+1	+1	-	-	0	0
6.	-	-	25	0	-	-	0	-1	-	-	+1	+1	-	-	0	0
7.	-	-	25	0	-	-	-1	-1	-	-	+1	+1	-	-	0	0
8.	-	-	25	0	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	0	0
9.	19	21	35	5	+, ext.	+, marked	-1	0	+, ext.	+, marked	+2	+1	-	-	0	0
10.	45	45	45	1	+	+, marked	-1	+1	+	+	+1	+2	-	-	+1	+1
11.	32	34	45	4	+	+, marked	-1	+1	+	+	+1	+2	-	-	1	0
12.	45	45	45	4	+	+	0	+1	+	+	+1	+2	-	-	0	+1
13.	-	-	45	0	-	+	-1	+1	+	+	+1	+1	-	-	+1	+1
14.	22	37	50	2	+, ext.	+	-2	-1	+, ext.	+, marked	+1	+2	-	-	+1	0
15.	45	58	60	3	+	+	-2	-2	+, ext.	+, marked	+1	0	-	-	+1	+1
16.	58	58	60	1	+	-	-1	+1	-	-	0	0	-	-	0	0
17.	64	64	100	1	+	+	-1	-2	+	-	+2	+1	-	-	0	0
18.	49	79	100	1	+	-	-2	-1	-	-	+2	+2	-	-	0	+1
19.	64	64	100	1	+	-	-2	-2	+	-	+1	+1	-	-	+1	0
20.	30	31	160	1	-	-	0	+1	-	-	0	+1	-	-	0	0
21.	-	-	160	0	+	-	+1	+2	-	-	0	+1	-	-	0	+1
22.	30	33	160	4	+, ext.	-	+1	+2	-	-	0	+1	-	-	+1	+1
23.	32	32	160	1	+, ext.	-	+1	+2	-	-	+1	+1	-	-	0	+1
24.	-	-	160	0	-	-	0	+2	-	-	+1	+1	-	-	0	0
25.	37	37	160	4	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	0	0

Three time-points were chosen for sacrifice on the basis of clinical disability as described in the literature,¹³ corresponding to the early stage (days 0 to 29), the disease stage when

clinical signs were visible (days 30 to 70) and the late stage (after 70 days), when no further clinical signs were noted.

¹For AQP4/GFAP, histological scores were assessed as follows: 1, -2 graduated decreased expression, 0 no modification compared to IFA-injected rats, +1, +2 graduated increased expression (for details see Animals and methods). CS: clinical score; DM: demyelination; INF: inflammation. Max.: maximal; Sac.: sacrifice; Ext.: extensive.

Figures

Figure 1.

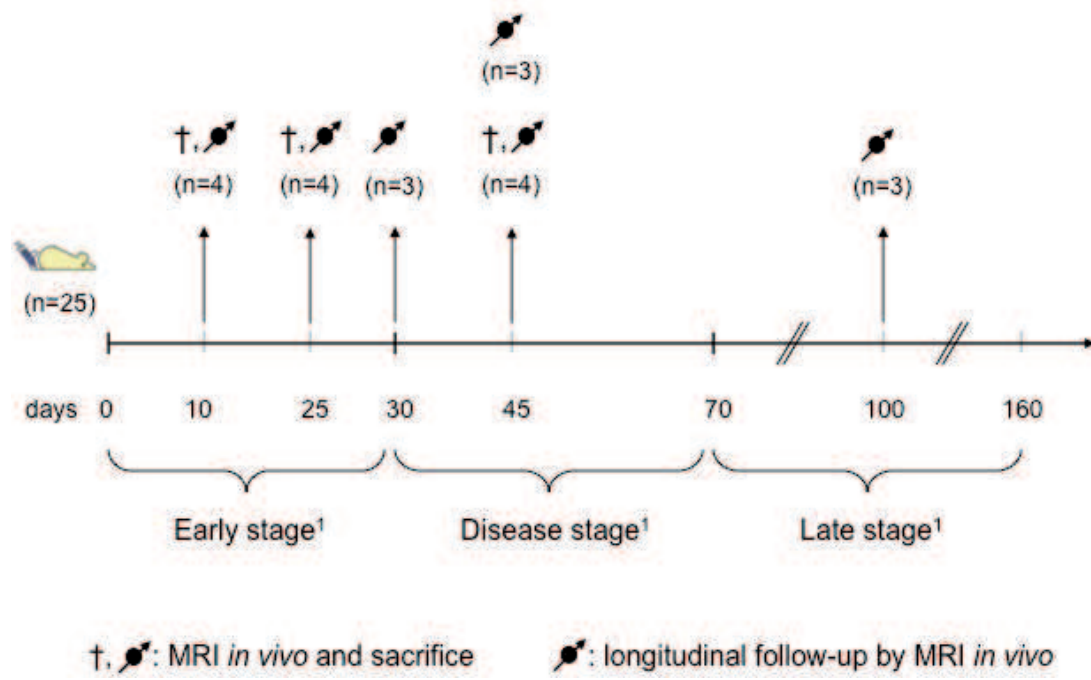


Figure 2.

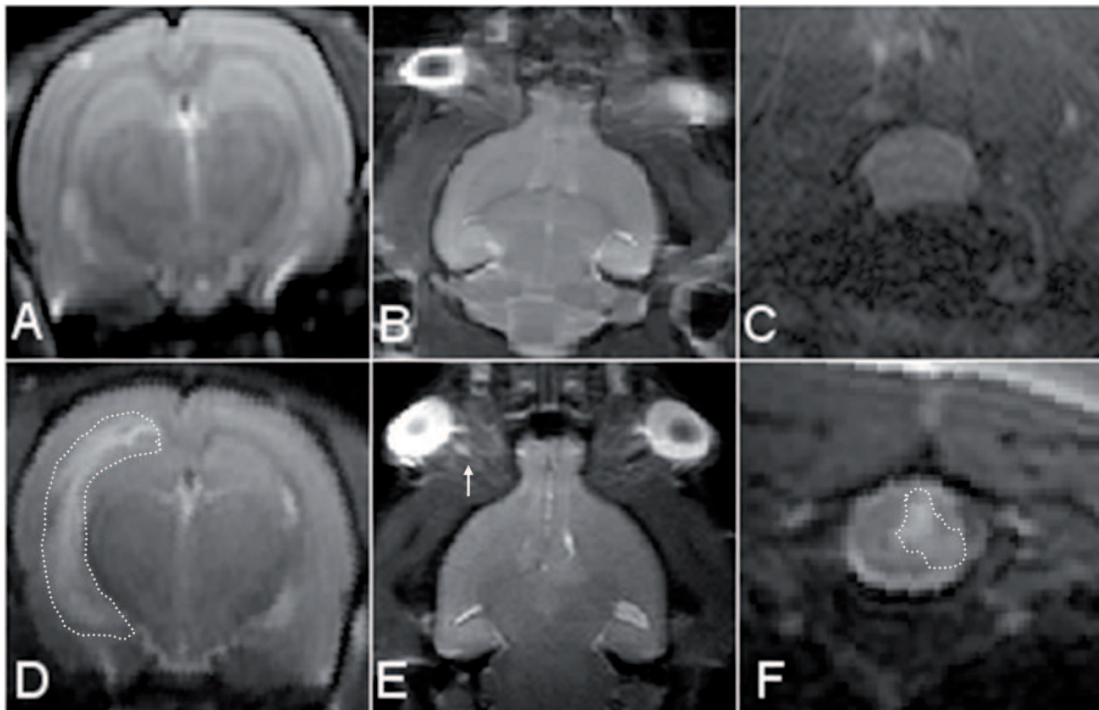


Figure 3.

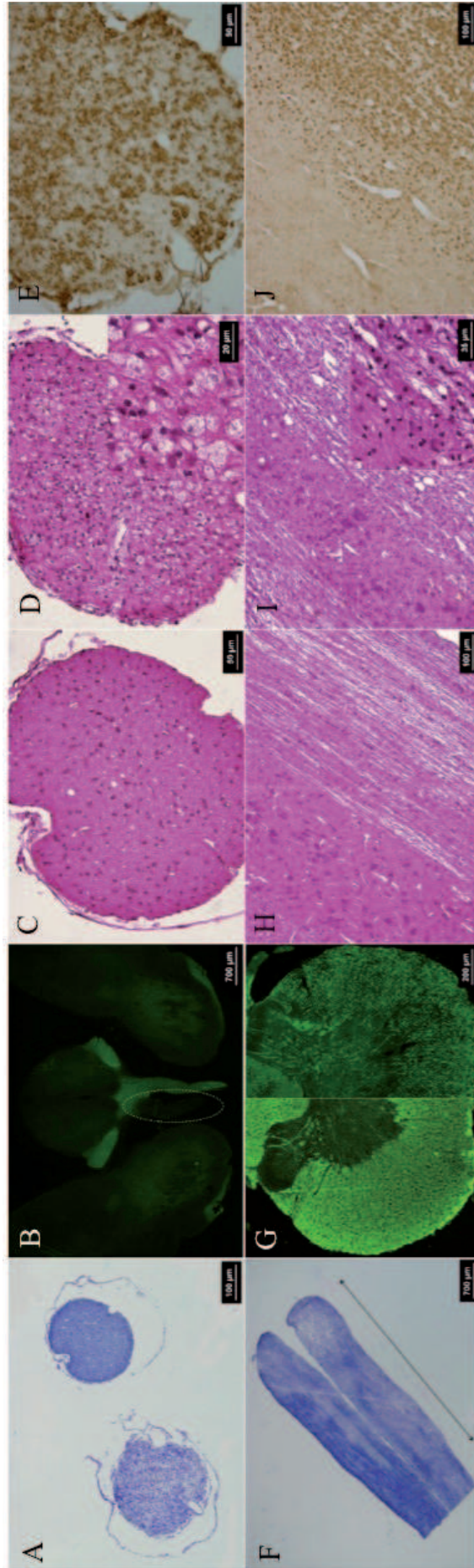


Figure 4.

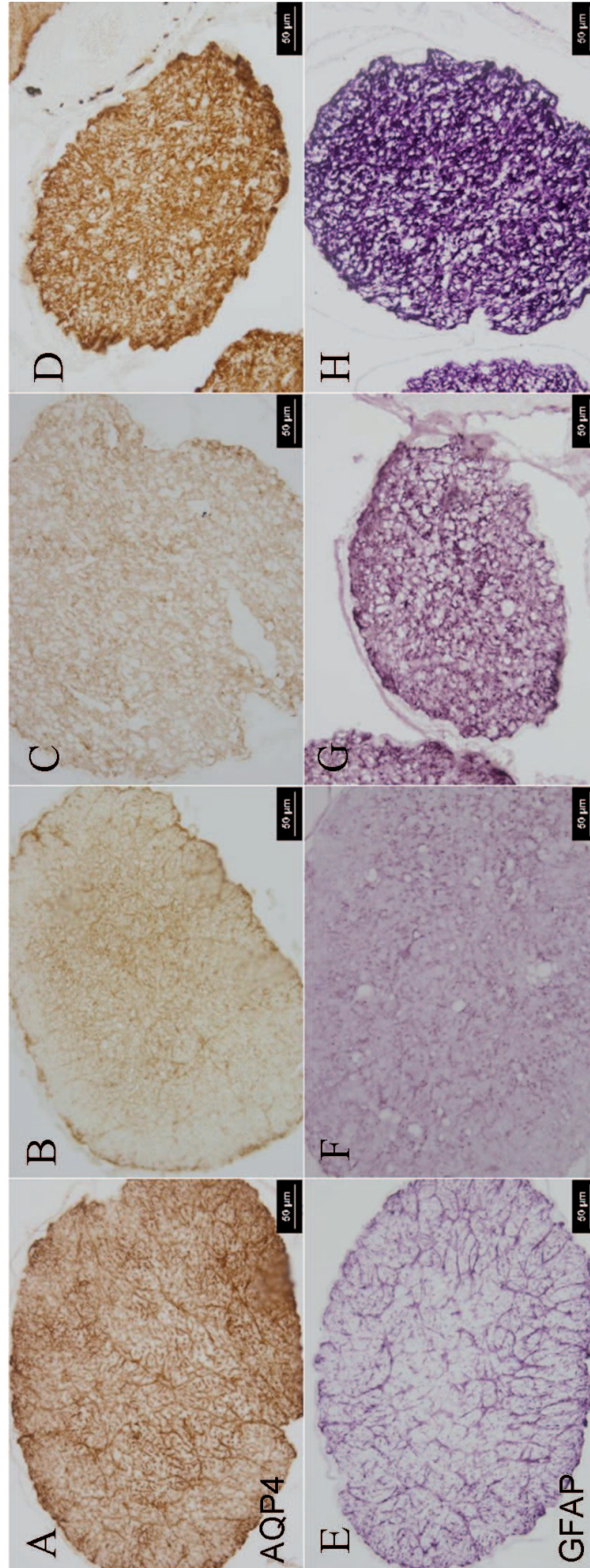


Figure 5.

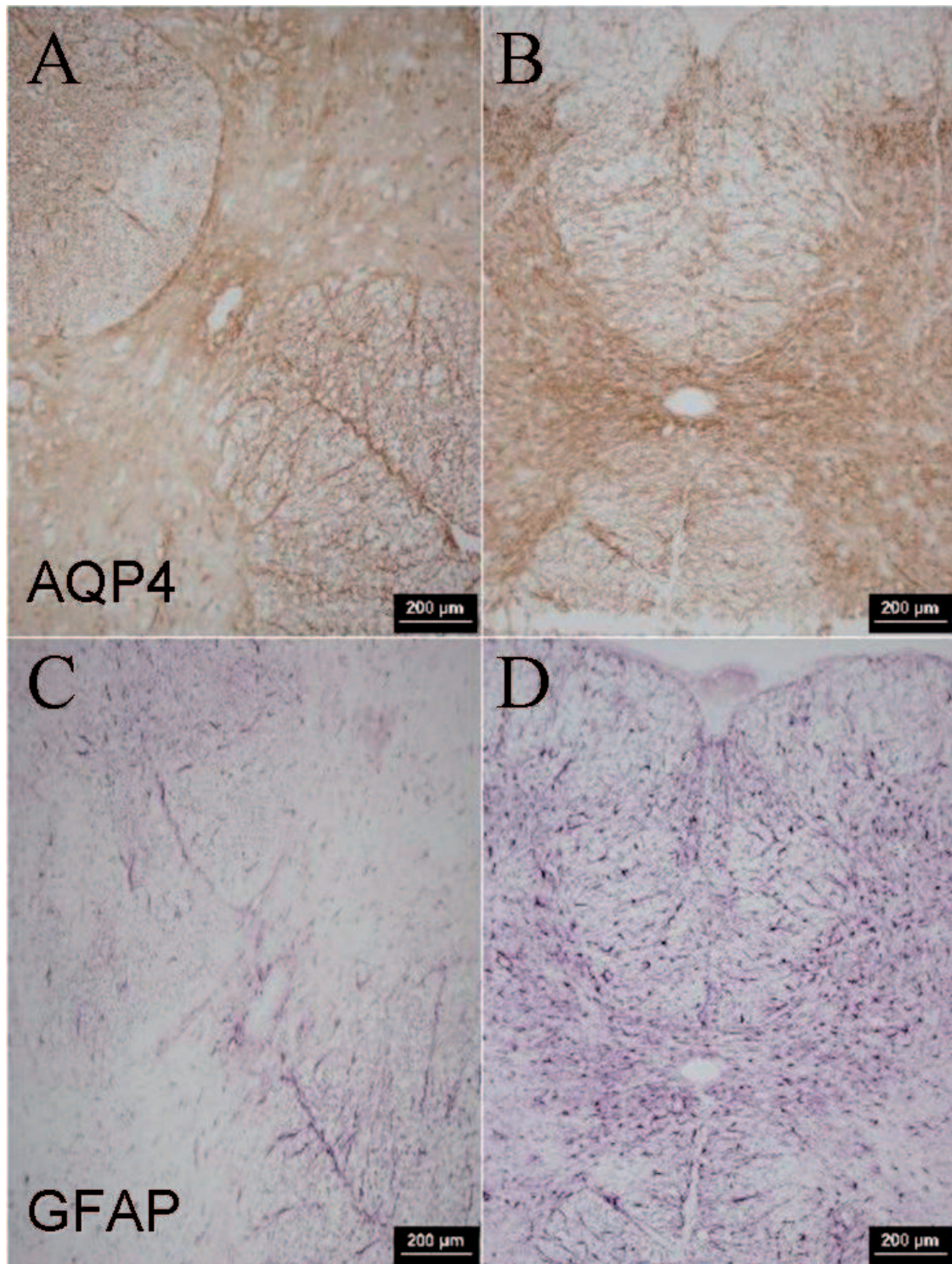


Figure 6.

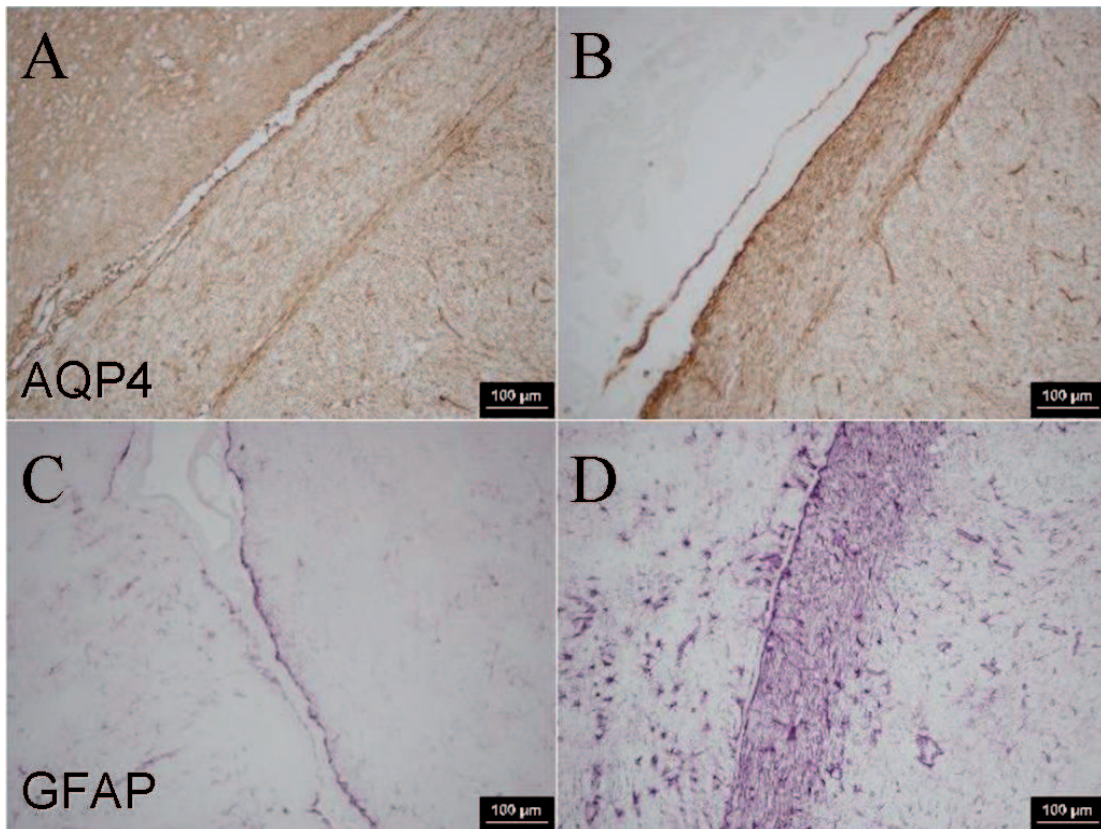
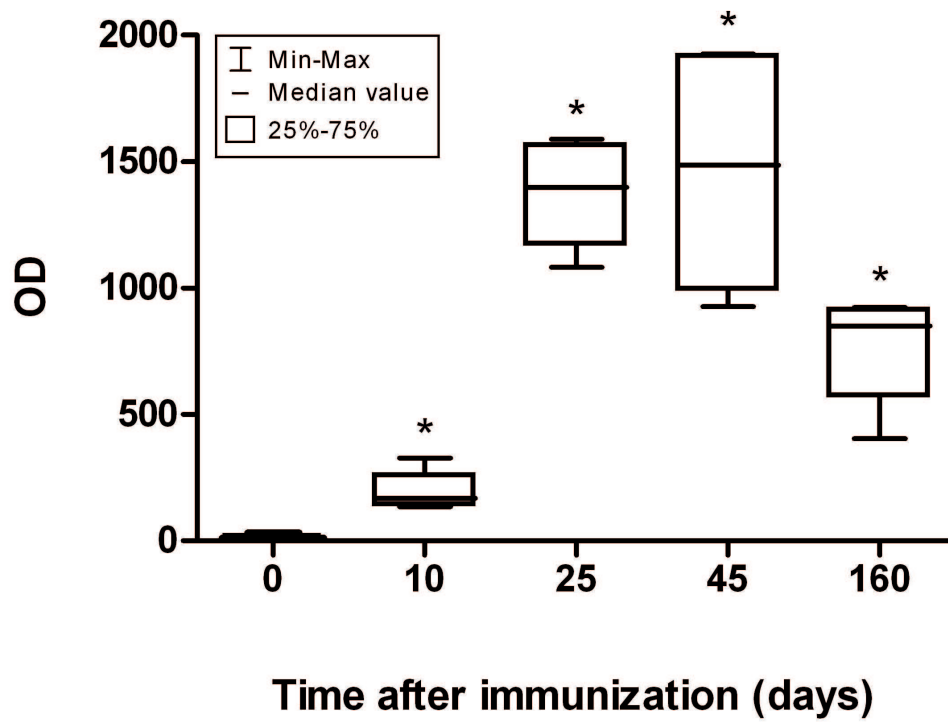


Figure 7.



H. Commentaires

H.1 Étude comparative avec la NMO chez l'humain

La description de ce modèle a permis de compléter les données manquantes, nécessaires à la comparaison du modèle avec la NMO humaine, mentionnées dans le **tableau 6** en montrant que :

1. ce modèle remplit les critères diagnostiques chez l'humain ;
2. les lésions encéphaliques sont limitées à un oedème périventriculaire transitoire ;
3. les modifications du niveau d'expression de l'AQP4 sont secondaires à l'oedème vasogénique (diminution de son expression), à l'oedème cytotoxique ou à la gliose cicatricielle (augmentation de son expression dans les deux cas) ;
4. ce modèle ne produit pas d'anticorps anti-AQP4.

Par ailleurs, nous avons observé que le handicap est lié aux lésions démyélinisantes actives, pouvant générer un handicap sévère allant jusqu'à la tétraplégie. Ce handicap n'est pas lié aux modifications d'expression des molécules astrocytaires testées, semblant pouvoir écarter l'hypothèse d'une astrocytopathie inaugurale dans ce modèle. Cette donnée est cohérente avec le protocole d'immunisation utilisé, basé sur la genèse d'une réaction immunitaire dirigée contre un antigène de la myéline.

Par conséquent, ce modèle peut évoquer soit une forme optico-médullaire de SEP, soit une NMO séronégative pour les anticorps anti-NMO. Chez l'humain, il est très difficile, à ce stade de nos connaissances, de distinguer ces deux populations de patients. En neuropathologie, les modifications d'expression de l'AQP4 et de la GFAP pourraient être un élément déterminant car elles suggèrent que ces marquages dépendent du degré de démyélinisation dans la SEP dite « classique » et sont indépendantes de celles-ci dans la NMO. Malheureusement, ces données issues des

études chez l'humain ont plusieurs limitations : 1. les patients NMO remplissent les critères de 1999, avec un statut en NMO-IgG non établi, 2. le nombre de nerfs optiques analysés chez ces patients est extrêmement faible, la plupart du temps il n'y en a qu'un seul par étude (Misu et al., 2007; Roemer et al., 2007; Sinclair et al., 2007), 3. les patients SEP dans ces études ne sont pas des formes optico-médullaires et à nouveau le nombre de nerf optique analysé est faible. Une seule étude anatomopathologique portant sur huit patients avec des formes optico-médullaires de SEP a cependant retrouvé des similitudes avec la NMO, à mettre en lien avec une importante perte du marquage en GFAP au sein des lésions médullaires (Itoyama et al., 1985).

H.2 Limites de l'étude

H.2.1 La quantification des marquages AQP4 et GFAP

A l'exception de la recherche d'anticorps anti-AQP4, l'ensemble des procédures expérimentales pour caractériser ce modèle a été réalisée au sein du laboratoire de biopathologie de la myéline. Cette approche a donc nécessité des compétences en imagerie de la myéline par résonance magnétique, immunologiques liées à la réalisation des immunomarquages et des ELISA, ainsi que histologiques pour l'analyse des lames chez les rats autopsiés. L'avantage crucial d'une telle démarche centralisée a été de permettre une vision globale du sujet, d'obtenir rapidement des résultats exploitables et donc d'accroître la réactivité face à une problématique nouvelle. A côté de cela, de nombreuses manipulations expérimentales ont dû être répétées plusieurs fois avant de devenir performantes et certaines techniques dont nous ne disposions pas n'ont pas été utilisées.

Une première limite réside dans l'absence de quantification des immunomarquages de l'AQP4 et de la GFAP. Celle-ci aurait pu être effectuée par RT-PCR sur le cerveau, la moelle et les nerfs optiques ou par microfluorimétrie adaptée aux grandes surfaces tissulaires. Ces techniques connaissent néanmoins des limitations dans leur utilisation. Pour la RT-PCR, un volume conséquent de tissu doit être prélevé chez l'animal pour ensuite être amplifié. Il n'est donc pas possible d'établir chez un même animal une corrélation entre la quantité d'ADN exprimé en un site donné et le niveau d'intensité des marquages immunohistologiques au même niveau. Cette technique ne peut donc à elle seule rendre compte de façon synchrone de la complexité d'évolution des différents marquages chez un même animal. Cette technique a été utilisée dans un modèle d'EAE chez la souris et retrouve une augmentation continue de la synthèse d'AQP4 dans la moelle épinière et l'encéphale au cours de la maladie (Miyamoto et al., 2009). Cependant, probablement compte tenu de la petite taille des nerfs optiques, ces derniers n'ont pas été individualisés dans l'analyse. Notre étude montre le même type d'évolution dans l'encéphale et la moelle épinière, mais nous apportons également des corrélations avec le marquage GFAP au sein de ces régions et nous montrons un profil d'expression différent dans le nerf optique.

La microfluorométrie était initialement utilisée pour quantifier l'intensité lumineuse émise par des cellules en culture marquées avec un anticorps fluorescent. Une extension de son utilisation a permis par la suite de l'appliquer aux tissus fixés et d'étendre la surface analysée. Cette technique a été appliquée aux nerfs optiques des rats BN immunisés avec de la MOG₃₅₋₅₅, du CFA, et de la toxine pertussique (Stokely et al., 2007). Dans ce protocole-ci, la fluorescence était augmentée de 28% chez quatre rats à J13 pour la GFAP par rapport aux rats contrôles ($p < 0.001$). Les problèmes qui se posent dans l'exploitation de cette technique résident d'une part

dans l'acquisition du matériel de comptage spécifique et d'autre part dans la variabilité intra-individuelle de l'expression de la fluorescence. En effet, l'intensité de la fluorescence n'est pas constante et diminue avec le temps et selon les conditions de conservation. Par ailleurs, le moment de l'analyse après immunomarquage n'est pas précisé dans l'article.

Enfin, l'absence de marquage aurait pu être détaillé par une analyse en WB afin de vérifier s'il s'agissait d'une baisse de l'expression des molécules ou une perte complète d'antigène liée à une destruction cellulaire par exemple. Cette technique n'est pas faite en routine dans notre laboratoire.

H.2.2 Le protocole d'imagerie

Nous avons réalisé deux types de suivi en IRM chez les rats injectés avec de la MOG : un suivi longitudinal sur trois rats et un suivi IRM précédant une histologie chez 12 rats. Ces données ont été contrôlées à chaque stade du processus pathologique par deux rats contrôles injectés avec de l'IFA seul. De nombreuses difficultés se sont posées pour obtenir des images de bonne qualité *in vivo*. Alors que l'IRM est habituellement réalisée sur l'encéphale des rats, son application aux nerfs optiques ou à la moelle épinière est plus délicate, nécessitant des très hauts champs pour obtenir une résolution et un rapport signal/bruit correct sur ces structures, le signal RMN étant 4000 fois plus faible chez le rat que chez l'humain. Une autre difficulté était d'obtenir des images de moelle épinière avec le moins d'artefact de mouvement possible, liés surtout à la respiration ou aux battements cardiaques des animaux. Nous avons dû pour cela faire les acquisitions en immobilisant l'animal sur le dos, contre l'antenne de moelle et répéter plusieurs fois l'examen. Ces acquisitions de moelle épinière *in vivo* restent cependant très difficiles à obtenir dans les modèles d'EAE et expliquent le peu de données disponibles dans la littérature à ce sujet

(McCreary et al., 2009; Robinson et al., 2010) nécessitant parfois une approche *ex vivo* (Schneider et al., 2009). Au sein du nerf optique, une étude menée chez le rat BN immunisé avec de la rMOG₁₋₁₂₅ de rat et du CFA a retrouvé une corrélation entre la sévérité de l'atteinte axonale et la diminution du signal en T1, alors que l'augmentation du signal en T2 était très sensible, augmentant avec la démyélinisation, l'inflammation et la perte axonale (Boretius et al., 2008). C'est dans cette perspective d'être le plus sensible possible pour localiser l'apparition des lésions que nous avons utilisé une séquence pondérée en T2. Celle-ci permet également de localiser la présence d'un oedème, que celui-ci soit vasogénique ou cytotoxique. Même si le coté régressif des images et leur tropisme pour la substance blanche évoque un oedème vasogénique plus que cytotoxique dans les nerfs optiques et les régions périventriculaires, d'autres séquences pondérées en diffusion ou calculant le coefficient apparent de diffusion (ADC) auraient permis d'individualiser mieux ces deux mécanismes. L'injection d'un produit de contraste comme le Gd-DTPA aurait également permis d'authentifier une rupture de la BHE, argument en faveur d'un oedème vasogénique.

Enfin, on pourrait regretter l'absence de recherche de corrélation entre les modifications de signal en IRM et les données histologiques. Le protocole n'avait pas été conçu pour cela, avec seulement quatre rats passés en IRM et sacrifiés pendant la période des signes cliniques. Parmi les rats injectés avec de la MOG, 15 rats ont été passés en IRM. Il en reste donc 10 qui n'ont pas bénéficiés de l'examen pour des raisons techniques, la machine ayant nécessité des réglages imprévus pendant la procédure expérimentale.

H.2.3 L'analyse détaillée de la réponse inflammatoire

La réaction inflammatoire dans la SEP et l'EAE comprend une activation des Th1 incluant la présence d'IL-2, d'IFN- γ , de TNF- α et de nombreuses chemokines. En plus des LT4 ainsi activés, des LT8 et les macrophages connaissent une expansion clonale au sein des lésions, à l'origine d'une transection axonale (Bitsch et al., 2000). Enfin, une activation de type Th2 participe également au processus auto-immun, générant l'activation de LB et la production d'anticorps contre la MOG et la MBP par exemple dans certaines plaques (Genain et al., 1999; Reindl et al., 1999). Cette réponse humorale est prédominante dans la NMO, s'exprimant par un aspect de vascularite nécrosante, associant un dépôt d'anticorps et de complément activé périvasculaires (Lucchinetti et al., 2002).

L'étude de la réponse inflammatoire dans notre modèle aurait donc pu être un élément supplémentaire pour distinguer une SEP optico-médullaire d'une NMO. Cette analyse a été réalisée dans le même modèle que le nôtre pour les macrophages/microglie activée (marquage ED1), les LT (marquage W3/13), le complément C9 (Piddlesden et al., 1994) et les anticorps (marquage IgG) (Storch et al., 1998). Elle montre un dépôt d'IgG et de C9 le long des gaines de myéline en marge des plaques. Dans les plaques sont retrouvés de nombreux macrophages périvasculaires contenant des débris cytoplasmiques, ainsi que des éosinophiles, des IgG et du C9. La présence d'éosinophiles est également un élément supplémentaire indiquant l'activation des LB par le biais de la production de chemokine CCR3 (Sallusto et al., 1998). Dans notre étude ainsi que dans celle de Storch et collaborateurs, cette infiltration éosinophile a été retrouvée de façon abondante dans les lésions inflammatoires grâce à la coloration HE. Chez le rat BN, DA et LEW, l'analyse de l'infiltration par les LT8 à l'aide du marqueur CD8 est difficile car cet

antigène est également porté par les cellules ED1+ (Schroeter et al., 2003). Enfin, les séquences utilisées en IRM : T1, T2, transfert de magnétisation, pondération en diffusion, ADC, volume sanguin régional, injection de gadolinium, ne permettent pas de distinguer les différents mécanismes inflammatoires Th1 ou Th2 se déroulant dans l'encéphale (Serres et al., 2009).

CHAPITRE VI. DISCUSSION GENERALE

A. Le phénotype optico-médullaire

A.1 Rôle de la MOG

La mise en place d'un modèle animal de démyélinisation optico-médullaire induit par la MOG pose deux questions : quel est le lien entre MOG et atteinte optico-médullaire chez l'animal ? la réaction contre la MOG joue-t-elle un rôle dans le phénotype chez l'humain ?

Dans notre modèle, la MOG permet la séquence physiopathologique suivante :

1. présentation de la MOG par les CPA sous cutanées,
2. activation et multiplication clonale de LT4 dirigés contre la MOG (LT^{MOG}),
3. activation et multiplication clonale de LB produisant une importante quantité d'anticorps anti-MOG (Ig^{MOG}),
4. ouverture de la BHE par les LT, pénétration des LT^{MOG} et Ig^{MOG} dans le parenchyme des nerfs optiques et de la moelle épinière,
5. activation microgliale et recrutement de monocytes sanguins à travers la BHE,
6. différenciation des monocytes circulants en macrophages tissulaires,
7. amplification de l'activation lymphocytaire et diffusion des Ig^{MOG} dans le LCR,
8. dépôt des Ig^{MOG} sur la myéline, activation du complément,
9. phagocytose de la myéline,
10. handicap.

La démyélinisation se produit car le rat BN génère une forte quantité d'Ig^{MOG} se fixant sur la MOG. Cette fixation est possible car la MOG, de part sa position à la surface des gaines de myéline, est accessible aux anticorps. Cette accessibilité est

maximale dans le nerf optique, la moelle épinière et les régions périventriculaires car toutes ces structures présentent aux Ig^{MOG} circulant dans le sang et le LCR une importante surface de substance blanche. A contrario, la MOG de l'encéphale est protégée de l'action des anticorps par un premier rempart de substance grise, contenant des taux de myéline beaucoup plus faibles. Par ailleurs, dans notre souche de rat BN, le taux d'ARNm de MOG dans le nerf optique et la moelle épinière est en quantité plus importante que dans d'autres souches de rat, comme le rat LEW par exemple (Stefflerl et al., 1999). A coté de ces considérations biomécaniques, le type de réaction inflammatoire joue également un rôle dans la localisation des lésions. En effet, suivant que l'immunisation est active ou passive pour un antigène donné, la topographie lésionnelle peut varier (Muller et al., 2000). Par ailleurs, certaines sous-population de LT ont un tropisme particulier pour certaines structures. Dans des modèles d'immunisation active chez le rat LEW, les LT^{MOG} créent une inflammation dans les nerfs optiques, la moelle épinière, le mésencéphale et le cervelet alors que les LT^{MBP} créent une inflammation prédominant dans la moelle épinière et le bulbe (Berger et al., 1997). L'EAE induite par les LT^{PLP} est caractérisée par une atteinte axiale et rotatoire, sans paralysie, par atteinte du cervelet et du tronc cérébral (Greer and Pender, 2008). Enfin, des modèles d'EAE induits par de la rMOG chez la souris, le ratio Th17:Th1 était élevé dans l'encéphale et bas dans la moelle épinière, suggérant un rôle de ces lymphocytes dans le phénotype lésionnel (Stromnes et al., 2008).

La topographie lésionnelle résulte donc de différents acteurs comprenant : 1. la localisation de l'antigène, 2. son taux dans les structures d'intérêt, 3. Le type de réaction inflammatoire, reposant sur l'action conjointe des LT et LB.

Dans les pathologies démyélinisantes optico-médullaires chez l'humain, la réactivité immunologique contre la MOG a été peu étudiée. Dans une série de 28 patients NMO, des taux d'anticorps sériques contre la MOG, le PLP et la MBP ont été détectés à des taux plus importants que chez les sujets sains (Alves-Leon et al., 2008). Cette donnée a été retrouvée pour la MOG dans une seconde étude, suggérant une activation polyclonale des LB (Haase and Schmidt, 2001). De plus, des anticorps anti-MOG ont été retrouvés à des taux significativement augmentés dans le LCR de patients NMO en poussée par rapport aux témoins sains et aux patients SEP (Correale 2004). Enfin, la présence d'anticorps anti-MOG avec ou sans anti-MBP est à l'origine d'un délai court entre les deux premières poussées de patients SEP, comparativement aux patients sans ces anticorps, dénotant ainsi leur possible rôle dans l'acquisition du handicap (Berger et al., 2003). Dans ces études, les tests immunologiques ont été réalisés avec la MOG non repliée, exprimée dans *Escherichia Coli* et purifiée par chromatographie d'affinité en condition dénaturante. L'utilisation de la MOG repliée a montré des résultats contradictoires dans la SEP (Gori et al., 2011). Malgré tout, plusieurs études suggèrent que les anticorps anti-MOG reconnaissent préférentiellement un épitope conformationnel (Menge et al., 2007; von Budingen et al., 2002). Tout comme pour la détection des NMO-IgG, les tests de type CBA devront être standardisés pour permettre de produire des résultats comparables dans les différents centres.

Les données que nous apportons chez l'animal font donc de la MOG un acteur majeur de l'atteinte optico-médullaire. Chez l'humain la réaction inflammatoire contre cet antigène dans la SEP et la NMO a été peu étudiée. Elle devrait cependant permettre de mieux comprendre la particularité topographique que connaissent les patients avec une NMO.

A.2 Rôle de l'immunité humorale

Si la MOG est un candidat à l'explication du tropisme optico-médullaire dans la NMO, la spécificité et la pathogénicité du NMO-IgG doit également poser la question du rôle de l'immunité humorale et du NMO-IgG dans la localisation des lésions. Chez l'humain il ne semble pas exister de différence clinique notable entre les patients séropositifs et les séronégatifs, comme nous l'avons montré dans notre étude et ce qui est confirmé par d'autres. Les données histopathologiques pourraient montrer des mécanismes lésionnels différents mais, à part pour une seule étude, aucune mention n'est faite du statut en NMO-IgG des patients. Dans cette étude, 11 patients NMO dont un patient avec NMO-IgG ont été autopsiés et comparés à cinq patients SEP. Contrairement à ce qui avait été montré auparavant, le profil d'expression de l'AQP4 n'était pas spécifique d'une des deux pathologies (**figure 6**). En effet, certains patients SEP avaient une sous-expression de l'AQP4 indépendamment du stade de la démyélinisation et plusieurs patients NMO n'avaient pas systématiquement une perte d'expression en AQP4 dans les lésions. En revanche, les patients NMO avaient de façon spécifique un dépôt d'anticorps et de complément périvasculaires principalement dans les lésions actives, associé ou non à une perte en AQP4. On notera dans cette étude que la perte en AQP4 était très importante chez le patient séropositif pour les NMO-IgG (Matsuoka et al., 2011).

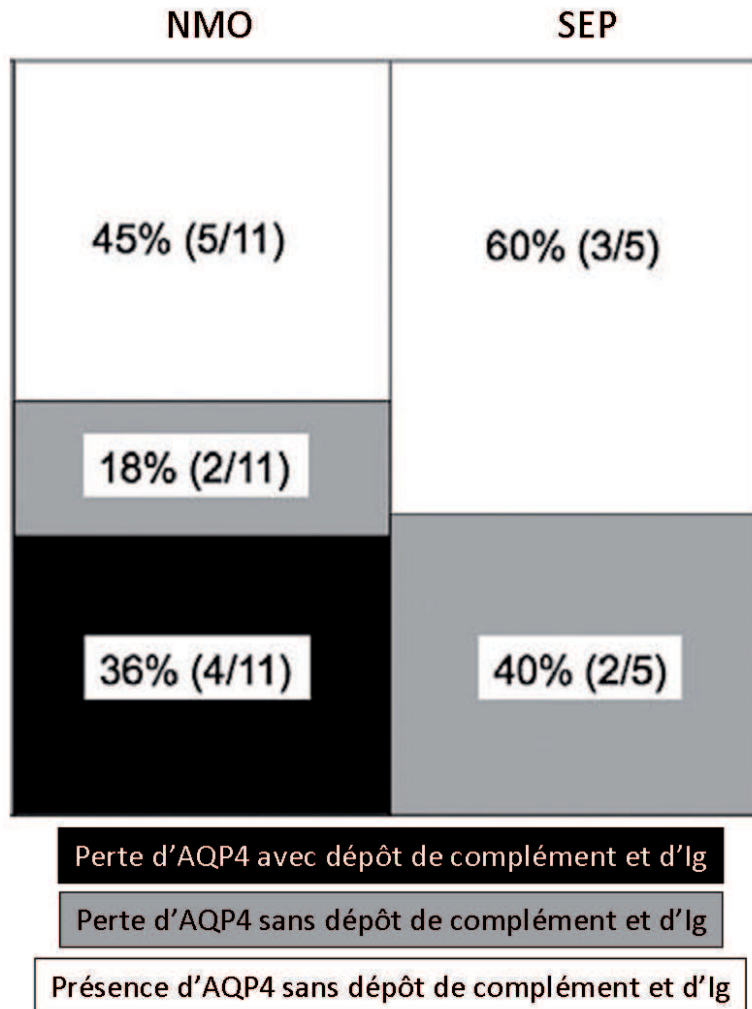


Figure 6. Profils immunohistologiques pour les immunoglobulines (Ig) et le complément périvasculaires ainsi que l'AQP4 chez les patients NMO et SEP (d'après Matsuoka et al., 2011).

Par conséquent, ces patients se distinguent bien de la SEP avec comme élément spécifique un dépôt d'anticorps et de complément périvasculaires, classant ainsi cette pathologie dans le registre des vascularites auto-immunes. En revanche, même si les données manquent encore à l'heure actuelle, il existe probablement un intérêt à distinguer les patients avec et sans NMO-IgG, le pouvoir pathogène de cet anticorps pouvant conférer aux patients des spécificités non connues jusqu'alors, notamment en terme de thérapeutique (Matsuoka et al., 2007; Saida et al., 2005). Enfin, même si

nous ne retrouvons pas dans notre modèle animal une perte d'expression de l'AQP4 dans la moelle épinière, les dépôts d'anticorps et de complément périvasculaires (Storch et al., 1998), au vue de cette étude récente, lui confèrent un point commun fort avec la NMO chez l'humain. Une lecture translationnelle du phénotype optico-médullaire en fonction de la réponse immunologique est proposée dans la **figure 7**.

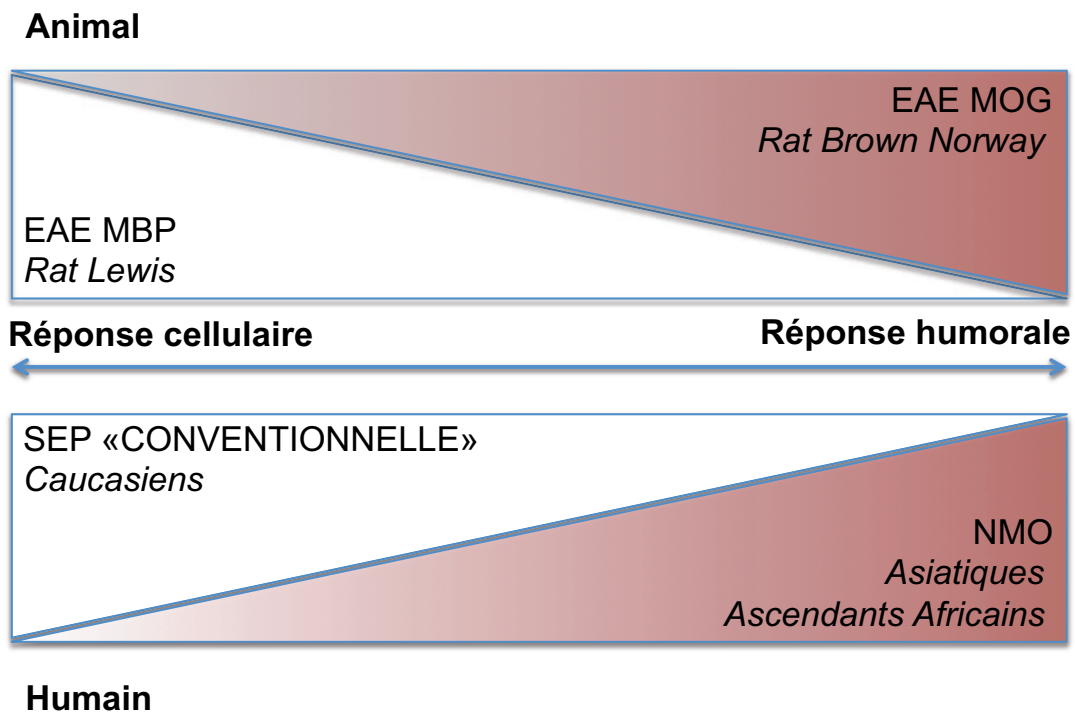


Figure 7. Représentation du phénotype lésionnel chez l'animal et chez l'humain, en fonction de la réponse immunologique préférentielle cellulaire ou humorale.

EAE : Encéphalomyélite autoimmune expérimentale ; MBP : myelin basic protein ; MOG : myelin oligodendrocyte glycoprotein ; SEP : Sclérose en plaques ; NMO : neuromyélie optique.

A côté de cette corrélation entre réponse humorale et phénotype optico-médullaire, il est intéressant de se questionner sur le rôle des anticorps anti-AQP4 dans l'apparition d'un tel phénotype. La présence d'AQP4 dans le nerf optique et la moelle épinière ne suffit pas à expliquer l'action privilégiée du NMO-IgG sur ces structures, ce d'autant

que l'AQP4 est présente dans d'autres tissus indemnes de toute maladie. En revanche, l'AQP4 peut se retrouver sous deux isoformes AQP4-M1 et AQP4-M23, la forme AQP4-M23 formant alors des *square arrays*, et fixant préférentiellement le NMO-IgG. La fonction de ces *square arrays* n'est pas encore connue mais leur présence est concentrée sur les membranes des cellules endothéliales, suggérant leur rôle primordial dans le maintien de l'intégrité de la BHE (Furman et al., 2003). Une étude récente chez l'humain a quantifié par RT-PCR, l'ARNm de l'AQP4 dans les différentes structures du SNC (Saini et al., 2010). De façon intéressante, le taux d'AQP4 est le plus élevé dans les nerf optiques et la moelle épinière, suivi par le cortex cérébral, le tronc cérébral et le cervelet. D'autre part, le ratio AQP4-M1:AQP4-M23 est particulièrement élevé dans le nerf optique, le tronc cérébral et la moelle épinière. L'autopsie d'un unique patient NMO dans cette étude, a révélé une sous-expression de l'isoforme AQP4-M1 et une surexpression de l'isoforme AQP4-M23 dans les lésions comparativement à des témoins sains et à des zones non lésées chez ce même patient. L'interprétation de ces données est plus délicate car il a été montré que le NMO-IgG reconnaissait préférentiellement un antigène conformationnel impliqué dans la formation des *square arrays* impliquant l'isoforme l'AQP4-M23. L'augmentation de son expression pourrait donc être réactionnelle à l'inflammation ou souligner la présence d'anticorps NMO-IgG avec des affinités différentes pour les isoformes de l'AQP4.

B. Le handicap dans la NMO

B.1 De l'humain à l'animal

Notre étude du handicap s'est faite à deux niveaux :

1. chez l'humain grâce à l'analyse d'une cohorte de patient ;
2. chez l'animal grâce à l'étude histopathologique et immunologique de l'EAE induite.

Chez les patients, nous avons apporté des arguments confortant l'idée que le handicap est lié aux poussées : seulement 1.6% de forme progressive, formes de bon pronostic corrélées au TAP en analyse univariée, délai au score EDSS 7 de 21 ans à mettre en rapport avec une diminution du TAP sous traitement immunosuppresseur. Par conséquent, cette donnée fait du traitement des poussées de NMO un enjeu thérapeutique majeur, contrairement à la SEP où le handicap est principalement lié au développement d'une phase progressive et où le traitement des poussées n'influence pas l'évolution du handicap à moyen et long terme. Nous avons mis en évidence un rôle prédictif du nombre de lésions encéphaliques sur la gravité de l'atteinte visuelle. Cette donnée semble s'appliquer surtout aux enfants qui peuvent rentrer dans la maladie avec une cécité et une inflammation encéphalique diffuse.

D'un autre côté, dans notre modèle d'EAE optico-médullaire, le handicap moteur est lié à la poussée de la maladie, et corrélé à la présence d'une démyélinisation active dans les lésions médullaires. Cette donnée est à mettre en lien avec les particularités immunologiques de la MOG, qui est le seul antigène capable d'induire une réponse T inflammatoire et une démyélinisation étendue avec une activation du complément et du système effecteur de phagocytose comprenant les macrophages et la microglie du SNC. En effet, l'injection d'anticorps anti-MOG dans un modèle d'EAE par transfert

passif de LT induit une démyélinisation étendue et une importante aggravation du handicap (Linington et al., 1988; Piddlesden et al., 1993).

L'analyse translationnelle du handicap visuel n'a pas pu être complètement réalisée car nous ne disposons pas d'une évaluation visuelle fiable pour notre modèle animal. En revanche, si la réalisation des potentiels évoqués visuels chez le rat est difficile, elle est cependant possible, leur altération étant même corrélée au degré d'inflammation dans le nerf optique des rats BN immunisés contre la MOG (Hobom et al., 2004).

B.2 Un acteur du handicap méconnu : la balance

microglie/macrophage

Si le rôle de l'inflammation dans le handicap reste à définir précisément chez l'humain comme dans notre modèle, des données existent dans d'autres modèles d'EAE. Le handicap semble alors corrélé au nombre de macrophages infiltrant les lésions indépendamment de la spécificité ou du nombre de LT activés injectés (Berger et al., 1997; Brochet et al., 2006; Chen et al., 2008). On peut ainsi spéculer sur le rôle des macrophages, phagocytant la myéline et entraînant ainsi l'apparition d'un déficit neurologique. Ce phénomène a été observé dans notre modèle grâce au marquage ED1 au sein des lésions démyélinisantes, notamment dans les nerfs optiques où de nombreux macrophages comprenaient des débris tissulaires intracytoplasmiques. L'étude de la balance macrophage/microglie dans les lésions a été faite dans plusieurs souches de rat LEW portant différents haplotypes du CMH. Cette étude montre que l'infiltration macrophagique prédomine dans la substance blanche et dans les plaques actives, contrairement à la microglie (substance grise et plaques inactives), et est corrélée à une atteinte axonale et un handicap sévères pour

un degré de démyélinisation équivalent (Storch et al., 2002). De plus, certains rats apparemment sains ont des lésions inflammatoires avec infiltration de LT comparables à celles présentes chez les rats malades. Les études immunohistologiques ont révélé que la dichotomie entre les lésions et l'absence de handicap était due à l'absence d'activation macrophagique par les LT (Linington et al., 1993). Par ailleurs, la cascade immunitaire induisant la phagocytose macrophagique est contrôlée à plusieurs étapes par des gènes du CMH : 1. recrutement de LT induits par la MOG (Weissert et al., 1998), 2. étendue du répertoire des LT à l'encontre de la MOG augmentant l'attraction macrophagique (Weissert et al., 2001), 3. induction d'une phagocytose extensive plus qu'une activation microgliale (Storch et al., 2002).

L'ensemble de ces éléments pourrait faire le lien avec les particularités ethniques observées chez l'humain. Les populations d'ascendance africaine pourraient ainsi avoir une activité inflammatoire à l'origine d'une activation macrophagique plus importante que les patients d'origine caucasienne, créant ainsi un handicap plus sévère. Ces données sur la balance macrophage/microglie ouvrent également de nouvelles perspectives sur la différence entre NMO et SEP, la microglie semblant jouer un rôle dans les maladies dégénératives incluant la phase progressive de la SEP (Perry et al., 2007), phase quasiment absente dans la NMO.

CHAPITRE VII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Alors que la NMO se distingue de la SEP par son mécanisme humoral à tropisme périvasculaire évoquant une vascularite auto-immune, la présence de NMO-IgG, retrouvée dans 50 à 70% des cas selon les cohortes, ne confère à ces patients aucune particularité clinique et pronostique, à l'exception d'un pourcentage de femmes plus important chez les patients avec cet anticorps.

Cette observation montre que 30 à 50 % des patients NMO n'ont pas de NMO-IgG et peuvent être confondus avec des SEP à tropisme optico-médullaire, surtout si au cours de l'évolution apparaissent des lésions encéphaliques à l'IRM. De la même façon, certains patients SEP avec une atteinte optico-médullaire préférentielle peuvent être traités à tort comme des NMO si la confluence des lésions médullaires aboutit à une MLTE et si l'IRM cérébrale est peu perturbée. Il existe donc un véritable enjeu à mieux comprendre ce qui différencie ces deux pathologies puisqu'elles relèvent de traitement différent. Notre approche fondamentale, basée sur la mise au point d'une EAE chez le rat BN immunisé avec de la rMOG₁₋₁₁₆, a permis de caractériser un modèle de démyélinisation optico-médullaire mimant en de nombreux points la NMO humaine. Cependant, aucun anticorps anti-AQP4 n'a été retrouvé, faisant discuter un continuum entre SEP optico-médullaire et NMO séronégative.

D'autre part, nous avons montré que la NMO est une maladie rémittente sévère. Les poussées sont à l'origine du handicap chez l'humain et dans notre modèle animal d'EAE optico-médullaire. Ce handicap est corrélé à la présence de plaques actives

dans les lésions induites dans notre modèle, appuyant les données de la littérature sur le rôle des macrophages dans la genèse du handicap.

Par conséquent, cette situation nosologique semble se rapprocher de ce qui est connu dans la myasthénie auto-immune, pathologie de la jonction neuromusculaire où la présence d'un anticorps dirigé contre le récepteur de l'acétylcholine est spécifique mais ne permet pas de définir un tableau clinique particulier ni d'évaluer l'efficacité des traitements. Par ailleurs, tout comme dans la NMO, environ 30% des patients myasthéniques n'ont pas cet anticorps, taux qui n'a cessé de diminuer au cours des recherches depuis l'affinement des techniques de détection. Il est tout à fait envisageable que cette situation soit transposable à la NMO, la mise en place des tests CBA avec la forme AQP4-M23 permettant de gagner en sensibilité et spécificité.

Ce travail a permis de créer une dynamique de recherche au niveau fondamental et clinique. Dans l'optique de trouver de nouvelles cibles antigéniques, une collaboration avec l'équipe de Biochimie des peptides et des protéines, dirigée par Anna Maria Papini à Florence, a débuté et a d'ores et déjà permis de tester la réactivité des sérums des patients et de nos rats contre plusieurs peptides réputés immunogènes au sein de leur bibliothèque. Nous avons également le projet d'étudier l'immunogénicité des protéines avec ou sans modifications post-transcriptionnelles et notamment le rôle du pont disulfure de la rMOG₁₋₁₁₆ ainsi que la glycosylation, citrullination et lipoylation des protéines de la myéline dans la réaction immunitaire. Une autre collaboration avec l'équipe d'Immunologie de Thierry Vincent à Montpellier a permis de quantifier par FACS le taux d'anticorps NMO-IgG chez les patients NMO et de corrélérer ce taux à l'activité de la maladie. Les premiers résultats confortent nos hypothèses en montrant que le taux de NMO-IgG est corrélé à sa

toxicité cellulaire médiée par le complément *in vitro*, mais pas avec l'activité de la maladie chez les patients. Au niveau clinique, notre étude a fondé le socle d'une vaste enquête épidémiologique sur la NMO en France qui a débuté en 2010. Ce projet hospitalier de recherche clinique a pour objectif de continuer la caractérisation clinique et IRM de ces patients, d'identifier de nouvelles cibles antigéniques, de déterminer de façon prospective un profil de bon répondeur aux traitements. Un projet européen, auquel notre centre participe, est également en cours d'élaboration sur les bases des résultats obtenus à l'échelon national.

Notre approche translationnelle ainsi que les approches multidisciplinaires en cours devraient permettre de préciser l'efficacité des traitements immunosuppresseurs dans la NMO et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Plusieurs voies de recherches pharmacologiques innovantes ont déjà été signalées ciblant le LB, la voie d'activation du complément ou l'excitotoxicité glutamatergique (Collongues and de Seze, 2011).

CHAPITRE VIII. REFERENCES

- Adelmann, M., Wood, J., Benzel, I., Fiori, P., Lassmann, H., Matthieu, J.M., Gardinier, M.V., Dornmair, K., Linington, C., 1995. The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 63, 17-27.
- Albouz-Abo, S., Wilson, J.C., Bernard, C.C., von Itzstein, M., 1997. A conformational study of the human and rat encephalitogenic myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides 35-55. *Eur J Biochem* 246, 59-70.
- Allbutt, T.C., 1870. On the ophthalmoscopic signs of spinal disease. *Lancet* 1, 76-78.
- Alves-Leon, S.V., Pimentel, M.L., Sant'Anna, G., Malfetano, F.R., Estrada, C.D., Quirico-Santos, T., 2008. Immune system markers of neuroinflammation in patients with clinical diagnose of neuromyelitis optica. *Arq Neuropsiquiatr* 66, 678-684.
- Apiwattanakul, M., Popescu, B.F., Matiello, M., Weinshenker, B.G., Lucchinetti, C.F., Lennon, V.A., McKeon, A., Carpenter, A.F., Miller, G.M., Pittock, S.J., 2010. Intractable vomiting as the initial presentation of neuromyelitis optica. *Ann Neurol* 68, 757-761.
- Arnett, H.A., Escobar, S.S., Viney, J.L., 2009. Regulation of costimulation in the era of butyrophilins. *Cytokine* 46, 370-375.
- Axtell, R.C., Raman, C., Steinman, L., 2011. Interferon-beta exacerbates Th17-mediated inflammatory disease. *Trends Immunol* 32, 272-277.
- Banwell, B., Tenenbaum, S., Lennon, V.A., Ursell, E., Kennedy, J., Bar-Or, A., Weinshenker, B.G., Lucchinetti, C.F., Pittock, S.J., 2008. Neuromyelitis optica-IgG in childhood inflammatory demyelinating CNS disorders. *Neurology* 70, 344-352.
- Barkhof, F., Filippi, M., Miller, D.H., Scheltens, P., Campi, A., Polman, C.H., Comi, G., Ader, H.J., Losseff, N., Valk, J., 1997. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* 120 (Pt 11), 2059-2069.
- Becanovic, K., Wallstrom, E., Kornek, B., Glaser, A., Broman, K.W., Dahlman, I., Olofsson, P., Holmdahl, R., Luthman, H., Lassmann, H., Olsson, T., 2003. New loci regulating rat myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 170, 1062-1069.
- Bennett, J.L., Lam, C., Kalluri, S.R., Saikali, P., Bautista, K., Dupree, C., Glogowska, M., Case, D., Antel, J.P., Owens, G.P., Gilden, D., Nessler, S., Stadelmann, C., Hemmer, B., 2009. Intrathecal pathogenic anti-aquaporin-4 antibodies in early neuromyelitis optica. *Ann Neurol* 66, 617-629.
- Bergamaschi, R., Tonietti, S., Franciotta, D., Candeloro, E., Tavazzi, E., Piccolo, G., Romani, A., Cosi, V., 2004. Oligoclonal bands in Devic's neuromyelitis optica and multiple sclerosis: differences in repeated cerebrospinal fluid examinations. *Mult Scler* 10, 2-4.
- Berger, T., Rubner, P., Schautzer, F., Egg, R., Ulmer, H., Mayringer, I., Dilitz, E., Deisenhammer, F., Reindl, M., 2003. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* 349, 139-145.
- Berger, T., Weerth, S., Kojima, K., Linington, C., Wekerle, H., Lassmann, H., 1997. Experimental autoimmune encephalomyelitis: the antigen specificity of T

- lymphocytes determines the topography of lesions in the central and peripheral nervous system. *Lab Invest* 76, 355-364.
- Bettelli, E., Baeten, D., Jager, A., Sobel, R.A., Kuchroo, V.K., 2006. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. *J Clin Invest* 116, 2393-2402.
- Bettelli, E., Pagany, M., Weiner, H.L., Linington, C., Sobel, R.A., Kuchroo, V.K., 2003. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med* 197, 1073-1081.
- Bichueti, D.B., Oliveira, E.M., Souza, N.A., Rivero, R.L., Gabbai, A.A., 2009. Neuromyelitis optica in Brazil: a study on clinical and prognostic factors. *Mult Scler* 15, 613-619.
- Billiau, A., Matthys, P., 2001. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 70, 849-860.
- Binder, D.K., Oshio, K., Ma, T., Verkman, A.S., Manley, G.T., 2004. Increased seizure threshold in mice lacking aquaporin-4 water channels. *Neuroreport* 15, 259-262.
- Bitsch, A., Schuchardt, J., Bunkowski, S., Kuhlmann, T., Bruck, W., 2000. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123, 1174-1183.
- Boretius, S., Gadjanski, I., Demmer, I., Bahr, M., Diem, R., Michaelis, T., Frahm, J., 2008. MRI of optic neuritis in a rat model. *Neuroimage* 41, 323-334.
- Bradl, M., Misu, T., Takahashi, T., Watanabe, M., Mader, S., Reindl, M., Adzemovic, M., Bauer, J., Berger, T., Fujihara, K., Itoyama, Y., Lassmann, H., 2009. Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. *Ann Neurol* 66, 630-643.
- Brochet, B., Deloire, M.S., Touil, T., Anne, O., Caille, J.M., Dousset, V., Petry, K.G., 2006. Early macrophage MRI of inflammatory lesions predicts lesion severity and disease development in relapsing EAE. *NeuroImage* 32, 266-274.
- Brown, D.A., Sawchenko, P.E., 2007. Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Comp Neurol* 502, 236-260.
- Brum, D.G., Barreira, A.A., dos Santos, A.C., Kaimen-Maciel, D.R., Matiello, M., Costa, R.M., Deghaide, N.H., Costa, L.S., Louzada-Junior, P., Diniz, P.R., Comini-Frota, E.R., Mendes-Junior, C.T., Donadi, E.A., 2010. HLA-DRB association in neuromyelitis optica is different from that observed in multiple sclerosis. *Mult Scler* 16, 21-29.
- Burger, D., Steck, A.J., Bernard, C.C., Kerlero de Rosbo, N., 1993. Human myelin/oligodendrocyte glycoprotein: a new member of the L2/HNK-1 family. *J Neurochem* 61, 1822-1827.
- Cabre, P., Gonzalez-Quevedo, A., Bonnan, M., Saiz, A., Olindo, S., Graus, F., Smadja, D., Merle, H., Thomas, L., Cabrera-Gomez, J.A., 2009a. Relapsing neuromyelitis optica: long term history and clinical predictors of death. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80, 1162-1164.
- Cabre, P., Gonzalez-Quevedo, A., Lannuzel, A., Bonnan, M., Merle, H., Olindo, S., Chausson, N., Lara-Rodriguez, R., Smadja, D., Cabrera-Gomez, J., 2009b. [Descriptive epidemiology of neuromyelitis optica in the Caribbean basin]. *Rev Neurol* 165, 676-683.

- Cabre, P., Heinzlef, O., Merle, H., Buisson, G.G., Bera, O., Bellance, R., Vernant, J.C., Smadja, D., 2001. MS and neuromyelitis optica in Martinique (French West Indies). *Neurology* 56, 507-514.
- Cabrera-Gomez, J.A., Kurtzke, J.F., Gonzalez-Quevedo, A., Lara-Rodriguez, R., 2009. An epidemiological study of neuromyelitis optica in Cuba. *J Neurol* 256, 35-44.
- Chen, J.W., Breckwoldt, M.O., Aikawa, E., Chiang, G., Weissleder, R., 2008. Myeloperoxidase-targeted imaging of active inflammatory lesions in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 131, 1123-1133.
- Clements, C.S., Reid, H.H., Beddoe, T., Tynan, F.E., Perugini, M.A., Johns, T.G., Bernard, C.C., Rossjohn, J., 2003. The crystal structure of myelin oligodendrocyte glycoprotein, a key autoantigen in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11059-11064.
- Collongues, N., de Seze, J., 2011. Current and future treatment approaches for neuromyelitis optica. *Ther Adv Neurol Disord* 4, 111-121.
- Correale, J., Fiol, M., 2004. Activation of humoral immunity and eosinophils in neuromyelitis optica. *Neurology* 63, 2363-2370.
- Crane, J.M., Lam, C., Rossi, A., Gupta, T., Bennett, J.L., Verkman, A.S., 2011. Binding affinity and specificity of neuromyelitis optica autoantibodies to aquaporin-4 M1/M23 isoforms and orthogonal arrays. *J Biol Chem* 286, 16516-16524.
- Crane, J.M., Verkman, A.S., 2009. Determinants of aquaporin-4 assembly in orthogonal arrays revealed by live-cell single-molecule fluorescence imaging. *J Cell Sci* 122, 813-821.
- Cree, B.A., Lamb, S., Morgan, K., Chen, A., Waubant, E., Genain, C., 2005. An open label study of the effects of rituximab in neuromyelitis optica. *Neurology* 64, 1270-1272.
- Dahlman, I., Wallstrom, E., Weissert, R., Storch, M., Kornek, B., Jacobsson, L., Linington, C., Luthman, H., Lassmann, H., Olsson, T., 1999. Linkage analysis of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat identifies a locus controlling demyelination on chromosome 18. *Hum Mol Genet* 8, 2183-2190.
- de Seze, J., Arndt, C., Jeanjean, L., Zephir, H., Blanc, F., Labauge, P., Bouyon, M., Ballonzoli, L., Fleury, M., Vermersch, P., Speeg, C., 2008. Relapsing inflammatory opticneuritis: is it neuromyelitis optica? *Neurology* 70, 2075-2076.
- de Seze, J., Stojkovic, T., Ferriby, D., Gauthier, J.Y., Montagne, C., Mounier-Vehier, F., Verier, A., Pruvo, J.P., Hache, J.C., Vermersch, P., 2002. Devic's neuromyelitis optica: clinical, laboratory, MRI and outcome profile. *J Neurol Sci* 197, 57-61.
- Delarasse, C., Daubas, P., Mars, L.T., Vizler, C., Litzénburger, T., Iglesias, A., Bauer, J., Della Gaspera, B., Schubart, A., Decker, L., Dimitri, D., Roussel, G., Dierich, A., Amor, S., Dautigny, A., Liblau, R., Pham-Dinh, D., 2003. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein-deficient (MOG-deficient) mice reveal lack of immune tolerance to MOG in wild-type mice. *J Clin Invest* 112, 544-553.
- Delarasse, C., Della Gaspera, B., Lu, C.W., Lachapelle, F., Gelot, A., Rodriguez, D., Dautigny, A., Genain, C., Pham-Dinh, D., 2006. Complex alternative splicing of the myelin oligodendrocyte glycoprotein gene is unique to human and non-human primates. *J Neurochem* 98, 1707-1717.

- Deschamps, R., Paturel, L., Jeannin, S., Chausson, N., Olindo, S., Bera, O., Bellance, R., Smadja, D., Cesaire, D., Cabre, P., 2011. Different HLA class II (DRB1 and DQB1) alleles determine either susceptibility or resistance to NMO and multiple sclerosis among the French Afro-Caribbean population. *Mult Scler* 17, 24-31.
- Devic, E., 1894. Myélite subaiguë compliquée de névrite optique. *Bull Med (Paris)* 8, 1033-1034.
- Dreschfeld, J., 1882. Pathological contributions on the course of the optic nerve fibres in the brain. *Brain* 4, 543-551.
- Dujmovic, I., Mader, S., Schanda, K., Deisenhammer, F., Stojsavljevic, N., Kostic, J., Berger, T., Drulovic, J., Reindl, M., 2011. Temporal dynamics of cerebrospinal fluid anti-aquaporin-4 antibodies in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders. *J Neuroimmunol* 234, 124-130.
- Erb, W., 1879. Über das Zusammenkommen von Neuritis optica und Myelitis subacuta. *Arch Psychiatr Nervenkr* 1, 146-157.
- Fazilleau, N., Delarasse, C., Sweeney, C.H., Anderton, S.M., Fillatreau, S., Lemonnier, F.A., Pham-Dinh, D., Kanellopoulos, J.M., 2006. Persistence of autoreactive myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-specific T cell repertoires in MOG-expressing mice. *Eur J Immunol* 36, 533-543.
- Furman, C.S., Gorelick-Feldman, D.A., Davidson, K.G., Yasumura, T., Neely, J.D., Agre, P., Rash, J.E., 2003. Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13609-13614.
- Gault, F., 1895. De la neuromyéélite optique aiguë. Thèse n°891, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon.
- Genain, C.P., Cannella, B., Hauser, S.L., Raine, C.S., 1999. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 5, 170-175.
- Ghezzi, A., Bergamaschi, R., Martinelli, V., Trojano, M., Tola, M.R., Merelli, E., Mancardi, L., Gallo, P., Filippi, M., Zaffaroni, M., Comi, G., 2004. Clinical characteristics, course and prognosis of relapsing Devic's Neuromyelitis Optica. *J Neurol* 251, 47-52.
- Gold, R., Linington, C., Lassmann, H., 2006. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129, 1953-1971.
- Gori, F., Mulinacci, B., Massai, L., Avolio, C., Caragnano, M., Peroni, E., Lori, S., Chelli, M., Papini, A.M., Rovero, P., Lolli, F., 2011. IgG and IgM antibodies to the refolded MOG(1-125) extracellular domain in humans. *J Neuroimmunol* 233, 216-220.
- Gowers, W., 1888. *A Manual of Disease of the Nervous System*. Churchill: London 1, 227.
- Greer, J.M., Pender, M.P., 2008. Myelin proteolipid protein: an effective autoantigen and target of autoimmunity in multiple sclerosis. *J Autoimmun* 31, 281-287.
- Haase, C.G., Schmidt, S., 2001. Detection of brain-specific autoantibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein, S100beta and myelin basic protein in patients with Devic's neuromyelitis optica. *Neurosci Lett* 307, 131-133.
- Hinson, S.R., Pittock, S.J., Lucchinetti, C.F., Roemer, S.F., Fryer, J.P., Kryzer, T.J., Lennon, V.A., 2007. Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica. *Neurology* 69, 2221-2231.

- Hinson, S.R., Roemer, S.F., Lucchinetti, C.F., Fryer, J.P., Kryzer, T.J., Chamberlain, J.L., Howe, C.L., Pittock, S.J., Lennon, V.A., 2008. Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating EAAT2. *J Exp Med* 205, 2473-2481.
- Hiroaki, Y., Tani, K., Kamegawa, A., Gyobu, N., Nishikawa, K., Suzuki, H., Walz, T., Sasaki, S., Mitsuoka, K., Kimura, K., Mizoguchi, A., Fujiyoshi, Y., 2006. Implications of the aquaporin-4 structure on array formation and cell adhesion. *J Mol Biol* 355, 628-639.
- Hobom, M., Storch, M.K., Weissert, R., Maier, K., Radhakrishnan, A., Kramer, B., Bahr, M., Diem, R., 2004. Mechanisms and time course of neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Pathol* 14, 148-157.
- Ibrahim, S.M., Mix, E., Bottcher, T., Koczan, D., Gold, R., Rolfs, A., Thiesen, H.J., 2001. Gene expression profiling of the nervous system in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 124, 1927-1938.
- Ishizu, T., Kira, J., Osoegawa, M., Fukazawa, T., Kikuchi, S., Fujihara, K., Matsui, M., Kohriyama, T., Sobue, G., Yamamura, T., Itoyama, Y., Saida, T., Sakata, K., 2009. Heterogeneity and continuum of multiple sclerosis phenotypes in Japanese according to the results of the fourth nationwide survey. *J Neurol Sci* 280, 22-28.
- Ishizu, T., Osoegawa, M., Mei, F.J., Kikuchi, H., Tanaka, M., Takakura, Y., Minohara, M., Murai, H., Mihara, F., Taniwaki, T., Kira, J., 2005. Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. *Brain* 128, 988-1002.
- Itoyama, Y., Ohnishi, A., Tateishi, J., Kuroiwa, Y., Webster, H.D., 1985. Spinal cord multiple sclerosis lesions in Japanese patients: Schwann cell remyelination occurs in areas that lack glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Acta Neuropathol* 65, 217-223.
- Jack, L.J., Mather, I.H., 1990. Cloning and analysis of cDNA encoding bovine butyrophilin, an apical glycoprotein expressed in mammary tissue and secreted in association with the milk-fat globule membrane during lactation. *J Biol Chem* 265, 14481-14486.
- Jacob, A., Matiello, M., Weinshenker, B.G., Wingerchuk, D.M., Lucchinetti, C., Shuster, E., Carter, J., Keegan, B.M., Kantarci, O.H., Pittock, S.J., 2009. Treatment of neuromyelitis optica with mycophenolate mofetil: retrospective analysis of 24 patients. *Arch Neurol* 66, 1128-1133.
- Jagodic, M., Kornek, B., Weissert, R., Lassmann, H., Olsson, T., Dahlman, I., 2001. Congenic mapping confirms a locus on rat chromosome 10 conferring strong protection against myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunogenetics* 53, 410-415.
- Jarius, S., Aboul-Enein, F., Waters, P., Kuenz, B., Hauser, A., Berger, T., Lang, W., Reindl, M., Vincent, A., Kristoferitsch, W., 2008. Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica. *Brain* 131, 3072-3080.
- Jarius, S., Wildemann, B., 2010. AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance. *Nat Rev Neurol* 6, 383-392.
- Johns, T.G., Bernard, C.C., 1997. Binding of complement component C1q to myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel mechanism for regulating CNS inflammation. *Mol Immunol* 34, 33-38.
- Johns, T.G., Bernard, C.C., 1999. The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem* 72, 1-9.

- Ke, C., Poon, W.S., Ng, H.K., Pang, J.C., Chan, Y., 2001. Heterogeneous responses of aquaporin-4 in oedema formation in a replicated severe traumatic brain injury model in rats. *Neurosci Lett* 301, 21-24.
- Kinoshita, M., Nakatsuji, Y., Kimura, T., Moriya, M., Takata, K., Okuno, T., Kumanogoh, A., Kajiyama, K., Yoshikawa, H., Sakoda, S., 2009. Neuromyelitis optica: Passive transfer to rats by human immunoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* 386, 623-627.
- Kira, J., 2003. Multiple sclerosis in the Japanese population. *Lancet Neurol* 2, 117-127.
- Kira, J., Kanai, T., Nishimura, Y., Yamasaki, K., Matsushita, S., Kawano, Y., Hasuo, K., Tobimatsu, S., Kobayashi, T., 1996. Western versus Asian types of multiple sclerosis: immunogenetically and clinically distinct disorders. *Ann Neurol* 40, 569-574.
- Krishnamoorthy, G., Lassmann, H., Wekerle, H., Holz, A., 2006. Spontaneous opticospinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *J Clin Invest* 116, 2385-2392.
- Kuroiwa, Y., Igata, A., Itahara, K., Koshijima, S., Tsubaki, T., 1975. Nationwide survey of multiple sclerosis in Japan. Clinical analysis of 1,084 cases. *Neurology* 25, 845-851.
- Kurtzke, J.F., 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444-1452.
- Lafaille, J.J., Nagashima, K., Katsuki, M., Tonegawa, S., 1994. High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell* 78, 399-408.
- Lennon, V.A., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., Verkman, A.S., Hinson, S.R., 2005. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med* 202, 473-477.
- Lennon, V.A., Wingerchuk, D.M., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., Lucchinetti, C.F., Fujihara, K., Nakashima, I., Weinshenker, B.G., 2004. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 364, 2106-2112.
- Li, G., Crang, A.J., Rundle, J.L., Blakemore, W.F., 2002. Oligodendrocyte progenitor cells in the adult rat CNS express myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *Brain Pathol* 12, 463-471.
- Li, L., Zhang, H., Verkman, A.S., 2009. Greatly attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in aquaporin-4 knockout mice. *BMC Neurosci* 10, 94.
- Linnington, C., Berger, T., Perry, L., Weerth, S., Hinze-Selch, D., Zhang, Y., Lu, H.C., Lassmann, H., Wekerle, H., 1993. T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. *Eur J Immunol* 23, 1364-1372.
- Linnington, C., Bradl, M., Lassmann, H., Brunner, C., Vass, K., 1988. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol* 130, 443-454.
- Linnington, C., Webb, M., Woodhams, P.L., 1984. A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *J Neuroimmunol* 6, 387-396.
- Linsley, P.S., Greene, J.L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J.A., Peach, R., 1994. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1, 793-801.

- Lotze, T.E., Northrop, J.L., Hutton, G.J., Ross, B., Schiffman, J.S., Hunter, J.V., 2008. Spectrum of pediatric neuromyelitis optica. *Pediatrics* 122, e1039-1047.
- Lu, C., Pelech, S., Zhang, H., Bond, J., Spach, K., Noubade, R., Blankenhorn, E.P., Teuscher, C., 2008. Pertussis toxin induces angiogenesis in brain microvascular endothelial cells. *J Neurosci Res* 86, 2624-2640.
- Lu, M., Lee, M.D., Smith, B.L., Jung, J.S., Agre, P., Verdijk, M.A., Merckx, G., Rijss, J.P., Deen, P.M., 1996. The human AQP4 gene: definition of the locus encoding two water channel polypeptides in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10908-10912.
- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H., 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47, 707-717.
- Lucchinetti, C.F., Mandler, R.N., McGavern, D., Bruck, W., Gleich, G., Ransohoff, R.M., Trebst, C., Weinshenker, B., Wingerchuk, D., Parisi, J.E., Lassmann, H., 2002. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* 125, 1450-1461.
- Mader, S., Lutterotti, A., Di Pauli, F., Kuenz, B., Schanda, K., Aboul-Enein, F., Khalil, M., Storch, M.K., Jarius, S., Kristoferitsch, W., Berger, T., Reindl, M., 2010. Patterns of antibody binding to aquaporin-4 isoforms in neuromyelitis optica. *PLoS One* 5, e10455.
- Madsen, L.S., Andersson, E.C., Jansson, L., krogsgaard, M., Andersen, C.B., Engberg, J., Strominger, J.L., Svejgaard, A., Hjorth, J.P., Holmdahl, R., Wucherpfennig, K.W., Fugger, L., 1999. A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nat Genet* 23, 343-347.
- Mandler, R.N., Ahmed, W., Dencoff, J.E., 1998. Devic's neuromyelitis optica: a prospective study of seven patients treated with prednisone and azathioprine. *Neurology* 51, 1219-1220.
- Manley, G.T., Binder, D.K., Papadopoulos, M.C., Verkman, A.S., 2004. New insights into water transport and edema in the central nervous system from phenotype analysis of aquaporin-4 null mice. *Neuroscience* 129, 983-991.
- Marignier, R., De Seze, J., Vukusic, S., Durand-Dubief, F., Zephir, H., Vermersch, P., Cabre, P., Cavillon, G., Honnorat, J., Confavreux, C., 2008. NMO-IgG and Devic's neuromyelitis optica: a French experience. *Mult Scler* 14, 440-445.
- Marignier, R., Nicolle, A., Watrin, C., Touret, M., Cavagna, S., Varrin-Doyer, M., Cavillon, G., Rogemond, V., Confavreux, C., Honnorat, J., Giraudon, P., 2010. Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury. *Brain* 133, 2578-2591.
- Matiello, M., Lennon, V.A., Jacob, A., Pittock, S.J., Lucchinetti, C.F., Wingerchuk, D.M., Weinshenker, B.G., 2008. NMO-IgG predicts the outcome of recurrent optic neuritis. *Neurology* 70, 2197-2200.
- Matiello, M., Schaefer-Klein, J., Brum, D.G., Atkinson, E.J., Kantarci, O.H., Weinshenker, B.G., 2010. HLA-DRB1*1501 tagging rs3135388 polymorphism is not associated with neuromyelitis optica. *Mult Scler* 16, 981-984.
- Matsuoka, T., Matsushita, T., Kawano, Y., Osoegawa, M., Ochi, H., Ishizu, T., Minohara, M., Kikuchi, H., Mihara, F., Ohyagi, Y., Kira, J., 2007. Heterogeneity of aquaporin-4 autoimmunity and spinal cord lesions in multiple sclerosis in Japanese. *Brain* 130, 1206-1223.

- Matsuoka, T., Suzuki, S.O., Suenaga, T., Iwaki, T., Kira, J.I., 2011. Reappraisal of Aquaporin-4 Astrocytopathy in Asian Neuromyelitis Optica and Multiple Sclerosis Patients. *Brain Pathol* 21, 516-532.
- Matsushita, T., Matsuoka, T., Isobe, N., Kawano, Y., Minohara, M., Shi, N., Nishimura, Y., Ochi, H., Kira, J., 2009. Association of the HLA-DPB1*0501 allele with anti-aquaporin-4 antibody positivity in Japanese patients with idiopathic central nervous system demyelinating disorders. *Tissue Antigens* 73, 171-176.
- McCreary, C.R., Bjarnason, T.A., Skihar, V., Mitchell, J.R., Yong, V.W., Dunn, J.F., 2009. Multiexponential T2 and magnetization transfer MRI of demyelination and remyelination in murine spinal cord. *NeuroImage* 45, 1173-1182.
- McKeon, A., Lennon, V.A., Jacob, A., Matiello, M., Lucchinetti, C.F., Kale, N., Chan, K.H., Weinshenker, B.G., Apiwattanakul, M., Wingerchuk, D.M., Pittock, S.J., 2009. Coexistence of myasthenia gravis and serological markers of neurological autoimmunity in neuromyelitis optica. *Muscle Nerve* 39, 87-90.
- McKeon, A., Lennon, V.A., Lotze, T., Tenenbaum, S., Ness, J.M., Rensel, M., Kuntz, N.L., Fryer, J.P., Homburger, H., Hunter, J., Weinshenker, B.G., Krecke, K., Lucchinetti, C.F., Pittock, S.J., 2008. CNS aquaporin-4 autoimmunity in children. *Neurology* 71, 93-100.
- Menge, T., von Budingen, H.C., Lalive, P.H., Genain, C.P., 2007. Relevant antibody subsets against MOG recognize conformational epitopes exclusively exposed in solid-phase ELISA. *Eur J Immunol* 37, 3229-3239.
- Merle, H., Olindo, S., Bonnan, M., Donnio, A., Richer, R., Smadja, D., Cabre, P., 2007. Natural history of the visual impairment of relapsing neuromyelitis optica. *Ophthalmology* 114, 810-815.
- Miller, D.H., Weinshenker, B.G., Filippi, M., Banwell, B.L., Cohen, J.A., Freedman, M.S., Galetta, S.L., Hutchinson, M., Johnson, R.T., Kappos, L., Kira, J., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Montalban, X., Panitch, H., Richert, J.R., Reingold, S.C., Polman, C.H., 2008. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler* 14, 1157-1174.
- Miller, M.M., Goto, R., Young, S., Chirivella, J., Hawke, D., Miyada, C.G., 1991. Immunoglobulin variable-region-like domains of diverse sequence within the major histocompatibility complex of the chicken. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4377-4381.
- Mirsattari, S.M., Johnston, J.B., McKenna, R., Del Bigio, M.R., Orr, P., Ross, R.T., Power, C., 2001. Aborigines with multiple sclerosis: HLA types and predominance of neuromyelitis optica. *Neurology* 56, 317-323.
- Misu, T., Fujihara, K., Kakita, A., Konno, H., Nakamura, M., Watanabe, S., Takahashi, T., Nakashima, I., Takahashi, H., Itoyama, Y., 2007. Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain* 130, 1224-1234.
- Misu, T., Fujihara, K., Nakashima, I., Miyazawa, I., Okita, N., Takase, S., Itoyama, Y., 2002. Pure optic-spinal form of multiple sclerosis in Japan. *Brain* 125, 2460-2468.
- Misu, T., Fujihara, K., Nakashima, I., Sato, S., Itoyama, Y., 2005. Intractable hiccup and nausea with periaqueductal lesions in neuromyelitis optica. *Neurology* 65, 1479-1482.
- Misu, T., Takano, R., Fujihara, K., Takahashi, T., Sato, S., Itoyama, Y., 2009. Marked increase in cerebrospinal fluid glial fibrillar acidic protein in

- neuromyelitis optica: an astrocytic damage marker. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80, 575-577.
- Miyamoto, K., Nagaosa, N., Motoyama, M., Kataoka, K., Kusunoki, S., 2009. Upregulation of water channel aquaporin-4 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 276, 103-107.
- Moe, S.E., Sorbo, J.G., Sogaard, R., Zeuthen, T., Petter Ottersen, O., Holen, T., 2008. New isoforms of rat Aquaporin-4. *Genomics* 91, 367-377.
- Muller, D.M., Pender, M.P., Greer, J.M., 2000. A neuropathological analysis of experimental autoimmune encephalomyelitis with predominant brain stem and cerebellar involvement and differences between active and passive induction. *Acta Neuropathol* 100, 174-182.
- Nagelhus, E.A., Veruki, M.L., Torp, R., Haug, F.M., Laake, J.H., Nielsen, S., Agre, P., Ottersen, O.P., 1998. Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci* 18, 2506-2519.
- Nakamura, M., Miyazawa, I., Fujihara, K., Nakashima, I., Misu, T., Watanabe, S., Takahashi, T., Itoyama, Y., 2008. Preferential spinal central gray matter involvement in neuromyelitis optica. An MRI study. *J Neurol* 255, 163-170.
- Nakashima, I., Fujihara, K., Miyazawa, I., Misu, T., Narikawa, K., Nakamura, M., Watanabe, S., Takahashi, T., Nishiyama, S., Shiga, Y., Sato, S., Weinschenker, B.G., Itoyama, Y., 2006. Clinical and MRI features of Japanese patients with multiple sclerosis positive for NMO-IgG. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77, 1073-1075.
- Namer, I.J., Steibel, J., Poulet, P., Mauss, Y., Mohr, M., Chambron, J., 1994. The role of Mycobacterium tuberculosis in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur Neurol* 34, 224-227.
- Nicchia, G.P., Mastrototaro, M., Rossi, A., Pisani, F., Tortorella, C., Ruggieri, M., Lia, A., Trojano, M., Frigeri, A., Svelto, M., 2009. Aquaporin-4 orthogonal arrays of particles are the target for neuromyelitis optica autoantibodies. *Glia* 57, 1363-1373.
- Nielsen, S., Nagelhus, E.A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P., Ottersen, O.P., 1997. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* 17, 171-180.
- Noyes, H., 1880. Acute myelitis mit doppelseitiger Neuritis optica. *Arch F Augenheilk* 7, 177-188.
- O'Riordan, J.I., Gallagher, H.L., Thompson, A.J., Howard, R.S., Kingsley, D.P., Thompson, E.J., McDonald, W.I., Miller, D.H., 1996. Clinical, CSF, and MRI findings in Devic's neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60, 382-387.
- Ochi, H., Wu, X.M., Osoegawa, M., Horiuchi, I., Minohara, M., Murai, H., Ohyagi, Y., Furuya, H., Kira, J., 2001. Tc1/Tc2 and Th1/Th2 balance in Asian and Western types of multiple sclerosis, HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and hyperIgEaemic myelitis. *J Neuroimmunol* 119, 297-305.
- Okinaka, S., Tsubaki, T., Kuroiwa, Y., Toyokura, Y., Imamura, Y., 1958. Multiple sclerosis and allied diseases in Japan; clinical characteristics. *Neurology* 8, 756-763.
- Osuntokun, B.O., 1971. The pattern of neurological illness in tropical Africa. Experience at Ibadan, Nigeria. *J Neurol Sci* 12, 417-442.

- Pagany, M., Jagodic, M., Bourquin, C., Olsson, T., Linington, C., 2003. Genetic variation in myelin oligodendrocyte glycoprotein expression and susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 139, 1-8.
- Palace, J., Leite, M.I., Nairne, A., Vincent, A., 2010. Interferon Beta treatment in neuromyelitis optica: increase in relapses and aquaporin 4 antibody titers. *Arch Neurol* 67, 1016-1017.
- Papadopoulos, M.C., Manley, G.T., Krishna, S., Verkman, A.S., 2004. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J* 18, 1291-1293.
- Papais-Alvarenga, R.M., Miranda-Santos, C.M., Puccioni-Sohler, M., de Almeida, A.M., Oliveira, S., Basilio De Oliveira, C.A., Alvarenga, H., Poser, C.M., 2002. Optic neuromyelitis syndrome in Brazilian patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73, 429-435.
- Papeix, C., Vidal, J.S., de Seze, J., Pierrot-Deseilligny, C., Tourbah, A., Stankoff, B., Lebrun, C., Moreau, T., Vermersch, P., Fontaine, B., Lyon-Caen, O., Gout, O., 2007. Immunosuppressive therapy is more effective than interferon in neuromyelitis optica. *Mult Scler* 13, 256-259.
- Paty, D.W., Oger, J.J., Kastrukoff, L.F., Hashimoto, S.A., Hooge, J.P., Eisen, A.A., Eisen, K.A., Purves, S.J., Low, M.D., Brandeys, V., et al., 1988. MRI in the diagnosis of MS: a prospective study with comparison of clinical evaluation, evoked potentials, oligoclonal banding, and CT. *Neurology* 38, 180-185.
- Perry, V.H., Cunningham, C., Holmes, C., 2007. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol* 7, 161-167.
- Petravic, D., Habek, M., Supe, S., Brinar, V.V., 2006. Recurrent optic neuromyelitis with endocrinopathies: a new syndrome or just a coincidence? *Mult Scler* 12, 670-673.
- Petzold, A., Marignier, R., Verbeek, M.M., Confavreux, C., 2010. Glial but not axonal protein biomarkers as a new supportive diagnostic criteria for Devic neuromyelitis optica? Preliminary results on 188 patients with different neurological diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82, 467-469.
- Pham, H., Ramp, A.A., Klonis, N., Ng, S.W., Klopstein, A., Ayers, M.M., Orian, J.M., 2009. The astrocytic response in early experimental autoimmune encephalomyelitis occurs across both the grey and white matter compartments. *J Neuroimmunol* 208, 30-39.
- Phillips, P.H., Newman, N.J., Lynn, M.J., 1998. Optic neuritis in African Americans. *Arch Neurol* 55, 186-192.
- Piddlesden, S.J., Lassmann, H., Zimprich, F., Morgan, B.P., Linington, C., 1993. The demyelinating potential of antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein is related to their ability to fix complement. *Am J Pathol* 143, 555-564.
- Piddlesden, S.J., Storch, M.K., Hibbs, M., Freeman, A.M., Lassmann, H., Morgan, B.P., 1994. Soluble recombinant complement receptor 1 inhibits inflammation and demyelination in antibody-mediated demyelinating experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 152, 5477-5484.
- Pisani, F., Mastrototaro, M., Rossi, A., Nicchia, G.P., Tortorella, C., Ruggieri, M., Trojano, M., Frigeri, A., Svelto, M., 2011. Identification of two major conformational AQP4 epitopes for neuromyelitis optica autoantibodies binding. *J Biol Chem* 286, 9216-9224.

- Pittock, S.J., Lennon, V.A., 2008. Aquaporin-4 autoantibodies in a paraneoplastic context. *Arch Neurol* 65, 629-632.
- Pittock, S.J., Lennon, V.A., de Seze, J., Vermersch, P., Homburger, H.A., Wingerchuk, D.M., Lucchinetti, C.F., Zephir, H., Moder, K., Weinshenker, B.G., 2008. Neuromyelitis optica and non organ-specific autoimmunity. *Arch Neurol* 65, 78-83.
- Pittock, S.J., Lennon, V.A., Krecke, K., Wingerchuk, D.M., Lucchinetti, C.F., Weinshenker, B.G., 2006. Brain abnormalities in neuromyelitis optica. *Arch Neurol* 63, 390-396.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H.P., Kappos, L., Lublin, F.D., Metz, L.M., McFarland, H.F., O'Connor, P.W., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Weinshenker, B.G., Wolinsky, J.S., 2005. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 58, 840-846.
- Quarles, R.H., 1997. Glycoproteins of myelin sheaths. *J Mol Neurosci* 8, 1-12.
- Reindl, M., Linington, C., Brehm, U., Egg, R., Dilitz, E., Deisenhammer, F., Poewe, W., Berger, T., 1999. Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study. *Brain* 122 (Pt 11), 2047-2056.
- Rivera, J.F., Kurtzke, J.F., Booth, V.J., Corona, V.T.t., 2008. Characteristics of Devic's disease (neuromyelitis optica) in Mexico. *J Neurol* 255, 710-715.
- Robinson, K.M., Njus, J.M., Phillips, D.A., Proctor, T.M., Rooney, W.D., Jones, R.E., 2010. MR imaging of inflammation during myelin-specific T cell-mediated autoimmune attack in the EAE mouse spinal cord. *Mol Imaging Biol* 12, 240-249.
- Roemer, S.F., Parisi, J.E., Lennon, V.A., Benarroch, E.E., Lassmann, H., Bruck, W., Mandler, R.N., Weinshenker, B.G., Pittock, S.J., Wingerchuk, D.M., Lucchinetti, C.F., 2007. Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Brain* 130, 1194-1205.
- Rossi, A., Crane, J.M., Verkman, A.S., 2011. Aquaporin-4 Mz isoform: Brain expression, supramolecular assembly and neuromyelitis optica antibody binding. *Glia* 59, 1056-1063.
- Rus, H., Cudrici, C., Niculescu, F., Shin, M.L., 2006. Complement activation in autoimmune demyelination: dual role in neuroinflammation and neuroprotection. *J Neuroimmunol* 180, 9-16.
- Saadoun, S., Papadopoulos, M.C., 2010. Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema. *Neuroscience* 168, 1036-1046.
- Saadoun, S., Papadopoulos, M.C., Watanabe, H., Yan, D., Manley, G.T., Verkman, A.S., 2005. Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. *J Cell Sci* 118, 5691-5698.
- Saadoun, S., Waters, P., Bell, B.A., Vincent, A., Verkman, A.S., Papadopoulos, M.C., 2010. Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice. *Brain* 133, 349-361.
- Saadoun, S., Waters, P., Macdonald, C., Bridges, L.R., Bell, B.A., Vincent, A., Verkman, A.S., Papadopoulos, M.C., 2011. T cell deficiency does not reduce lesions in mice produced by intracerebral injection of NMO-IgG and complement. *J Neuroimmunol* 235, 27-32.

- Sahraian, M.A., Moinfar, Z., Khorramnia, S., Mohammad Ebrahim, M., 2010. Relapsing Neuromyelitis Optica: demographic and clinical features in Iranian patients. *Eur J Neurol* 17, 794-799.
- Saida, T., Tashiro, K., Itoyama, Y., Sato, T., Ohashi, Y., Zhao, Z., 2005. Interferon beta-1b is effective in Japanese RRMS patients: a randomized, multicenter study. *Neurology* 64, 621-630.
- Saini, H., Fernandez, G., Kerr, D., Levy, M., 2010. Differential expression of aquaporin-4 isoforms localizes with neuromyelitis optica disease activity. *J Neuroimmunol* 221, 68-72.
- Sakuma, H., Kohyama, K., Park, I.K., Miyakoshi, A., Tanuma, N., Matsumoto, Y., 2004. Clinicopathological study of a myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced demyelinating disease in LEW.1AV1 rats. *Brain* 127, 2201-2213.
- Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C.R., Lanzavecchia, A., 1998. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 187, 875-883.
- Sattler, M.B., Togni, M., Gadjanski, I., Suhs, K.W., Meyer, N., Bahr, M., Diem, R., 2008. Strain-specific susceptibility for neurodegeneration in a rat model of autoimmune optic neuritis. *J Neuroimmunol* 193, 77-86.
- Schneider, C., Schuetz, G., Zollner, T.M., 2009. Acute neuroinflammation in Lewis rats - a model for acute multiple sclerosis relapses. *J Neuroimmunol* 213, 84-90.
- Schroeter, M., Stoll, G., Weissert, R., Hartung, H.P., Lassmann, H., Jander, S., 2003. CD8+ phagocyte recruitment in rat experimental autoimmune encephalomyelitis: association with inflammatory tissue destruction. *Am J Pathol* 163, 1517-1524.
- Scott, T.F., Kassab, S.L., Pittock, S.J., 2006. Neuromyelitis optica IgG status in acute partial transverse myelitis. *Arch Neurol* 63, 1398-1400.
- Sellner, J., Boggild, M., Clanet, M., Hintzen, R.Q., Illes, Z., Montalban, X., Du Pasquier, R.A., Polman, C.H., Sorensen, P.S., Hemmer, B., 2010. EFNS guidelines on diagnosis and management of neuromyelitis optica. *Eur J Neurol* 17, 1019-1032.
- Serres, S., Anthony, D.C., Jiang, Y., Campbell, S.J., Broom, K.A., Khrapitchev, A., Sibson, N.R., 2009. Comparison of MRI signatures in pattern I and II multiple sclerosis models. *NMR Biomed* 22, 1014-1024.
- Shibasaki, H., McDonald, W.I., Kuroiwa, Y., 1981. Racial modification of clinical picture of multiple sclerosis: comparison between British and Japanese patients. *J Neurol Sci* 49, 253-271.
- Shimizu, Y., Yokoyama, K., Misu, T., Takahashi, T., Fujihara, K., Kikuchi, S., Itoyama, Y., Iwata, M., 2008. Development of extensive brain lesions following interferon beta therapy in relapsing neuromyelitis optica and longitudinally extensive myelitis. *J Neurol* 255, 305-307.
- Silberstein, C., Bouley, R., Huang, Y., Fang, P., Pastor-Soler, N., Brown, D., Van Hoek, A.N., 2004. Membrane organization and function of M1 and M23 isoforms of aquaporin-4 in epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 287, F501-511.
- Sinclair, C., Kirk, J., Herron, B., Fitzgerald, U., McQuaid, S., 2007. Absence of aquaporin-4 expression in lesions of neuromyelitis optica but increased expression in multiple sclerosis lesions and normal-appearing white matter. *Acta Neuropathol* 113, 187-194.

- Stefflerl, A., Brehm, U., Storch, M., Lambracht-Washington, D., Bourquin, C., Wonigeit, K., Lassmann, H., Linington, C., 1999. Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces experimental autoimmune encephalomyelitis in the "resistant" Brown Norway rat: disease susceptibility is determined by MHC and MHC-linked effects on the B cell response. *J Immunol* 163, 40-49.
- Stokely, M.E., Bhat, M.A., Koulen, P., 2007. Microfluorimetry defines early axonal damage in a rat model of optic neuritis: a novel method targeting early CNS autoimmunity. *J Neurosci Methods* 166, 217-228.
- Storch, M.K., Stefflerl, A., Brehm, U., Weissert, R., Wallstrom, E., Kerschensteiner, M., Olsson, T., Linington, C., Lassmann, H., 1998. Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 8, 681-694.
- Storch, M.K., Weissert, R., Steffer, A., Birnbacher, R., Wallstrom, E., Dahlman, I., Ostensson, C.G., Linington, C., Olsson, T., Lassmann, H., 2002. MHC gene related effects on microglia and macrophages in experimental autoimmune encephalomyelitis determine the extent of axonal injury. *Brain Pathol* 12, 287-299.
- Stromnes, I.M., Cerretti, L.M., Liggitt, D., Harris, R.A., Goverman, J.M., 2008. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med* 14, 337-342.
- Su, J.J., Osoegawa, M., Matsuoka, T., Minohara, M., Tanaka, M., Ishizu, T., Mihara, F., Taniwaki, T., Kira, J., 2006. Upregulation of vascular growth factors in multiple sclerosis: correlation with MRI findings. *J Neurol Sci* 243, 21-30.
- Takahashi, T., Fujihara, K., Nakashima, I., Misu, T., Miyazawa, I., Nakamura, M., Watanabe, S., Shiga, Y., Kanaoka, C., Fujimori, J., Sato, S., Itoyama, Y., 2007. Anti-aquaporin-4 antibody is involved in the pathogenesis of NMO: a study on antibody titre. *Brain* 130, 1235-1243.
- Takahashi, T., Miyazawa, I., Misu, T., Takano, R., Nakashima, I., Fujihara, K., Tobita, M., Itoyama, Y., 2008. Intractable hiccup and nausea in neuromyelitis optica with anti-aquaporin-4 antibody: a herald of acute exacerbations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79, 1075-1078.
- Tani, T., Sakimura, K., Tsujita, M., Nakada, T., Tanaka, M., Nishizawa, M., Tanaka, K., 2009. Identification of binding sites for anti-aquaporin 4 antibodies in patients with neuromyelitis optica. *J Neuroimmunol* 211, 110-113.
- Teuscher, C., Bunn, J.Y., Fillmore, P.D., Butterfield, R.J., Zachary, J.F., Blankenhorn, E.P., 2004. Gender, age, and season at immunization uniquely influence the genetic control of susceptibility to histopathological lesions and clinical signs of experimental allergic encephalomyelitis: implications for the genetics of multiple sclerosis. *Am J Pathol* 165, 1593-1602.
- Thiagarajah, J.R., Papadopoulos, M.C., Verkman, A.S., 2005. Noninvasive early detection of brain edema in mice by near-infrared light scattering. *J Neurosci Res* 80, 293-299.
- Uzawa, A., Mori, M., Hayakawa, S., Masuda, S., Kuwabara, S., 2010. Different responses to interferon beta-1b treatment in patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 17, 672-676.
- Venero, J.L., Vizuete, M.L., Ilundain, A.A., Machado, A., Echevarria, M., Cano, J., 1999. Detailed localization of aquaporin-4 messenger RNA in the CNS: preferential expression in periventricular organs. *Neuroscience* 94, 239-250.
- Verkman, A.S., 2005. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci* 118, 3225-3232.

- Vernant, J.C., Cabre, P., Smadja, D., Merle, H., Caubarrere, I., Mikol, J., Poser, C.M., 1997. Recurrent optic neuromyelitis with endocrinopathies: a new syndrome. *Neurology* 48, 58-64.
- Vincent, T., Saikali, P., Cayrol, R., Roth, A.D., Bar-Or, A., Prat, A., Antel, J.P., 2008. Functional consequences of neuromyelitis optica-IgG astrocyte interactions on blood-brain barrier permeability and granulocyte recruitment. *J Immunol* 181, 5730-5737.
- Vitellaro-Zuccarello, L., Mazzetti, S., Bosisio, P., Monti, C., De Biasi, S., 2005. Distribution of Aquaporin 4 in rodent spinal cord: relationship with astrocyte markers and chondroitin sulfate proteoglycans. *Glia* 51, 148-159.
- von Budingen, H.C., Hauser, S.L., Fuhrmann, A., Nabavi, C.B., Lee, J.I., Genain, C.P., 2002. Molecular characterization of antibody specificities against myelin/oligodendrocyte glycoprotein in autoimmune demyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8207-8212.
- Waldmann, H., 2010. Tolerance: an overview and perspectives. *Nat Rev Nephrol* 6, 569-576.
- Wang, K.C., Tsai, C.P., Lee, C.L., Chen, S.Y., Chen, S.J., 2011. The prevalence of long spinal cord lesions and anti-aquaporin 4 antibodies in neuromyelitis optica patients in taiwan. *Eur Neurol* 65, 99-104.
- Waters, P., Vincent, A., 2008. Detection of anti-aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica: current status of the assays. *Int MS J* 15, 99-105.
- Weaver, C.T., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Harrington, L.E., 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25, 821-852.
- Weinshenker, B.G., Wingerchuk, D.M., Vukusic, S., Linbo, L., Pittock, S.J., Lucchinetti, C.F., Lennon, V.A., 2006. Neuromyelitis optica IgG predicts relapse after longitudinally extensive transverse myelitis. *Ann Neurol* 59, 566-569.
- Weinstock-Guttman, B., Ramanathan, M., Lincoff, N., Napoli, S.Q., Sharma, J., Feichter, J., Bakshi, R., 2006. Study of mitoxantrone for the treatment of recurrent neuromyelitis optica (Devic disease). *Arch Neurol* 63, 957-963.
- Weissert, R., de Graaf, K.L., Storch, M.K., Barth, S., Linington, C., Lassmann, H., Olsson, T., 2001. MHC class II-regulated central nervous system autoaggression and T cell responses in peripheral lymphoid tissues are dissociated in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 166, 7588-7599.
- Weissert, R., Wallstrom, E., Storch, M.K., Stefferl, A., Lorentzen, J., Lassmann, H., Linington, C., Olsson, T., 1998. MHC haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats. *J Clin Invest* 102, 1265-1273.
- Wingerchuk, D.M., Hogancamp, W.F., O'Brien, P.C., Weinshenker, B.G., 1999. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology* 53, 1107-1114.
- Wingerchuk, D.M., Lennon, V.A., Pittock, S.J., Lucchinetti, C.F., Weinshenker, B.G., 2006. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 66, 1485-1489.
- Wingerchuk, D.M., Pittock, S.J., Lucchinetti, C.F., Lennon, V.A., Weinshenker, B.G., 2007. A secondary progressive clinical course is uncommon in neuromyelitis optica. *Neurology* 68, 603-605.
- Wingerchuk, D.M., Weinshenker, B.G., 2003. Neuromyelitis optica: clinical predictors of a relapsing course and survival. *Neurology* 60, 848-853.

- Wolf, S.D., B. N. Dittel, F. Hardardottir, and C. A. Janeway, Jr. , 1996. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med* 184, 2271.
- Wosik, K., Ruffini, F., Almazan, G., Olivier, A., Nalbantoglu, J., Antel, J.P., 2004. Resistance of human adult oligodendrocytes to AMPA/kainate receptor-mediated glutamate injury. *Brain* 127, 2636-2648.
- Zeng, X.N., Sun, X.L., Gao, L., Fan, Y., Ding, J.H., Hu, G., 2007. Aquaporin-4 deficiency down-regulates glutamate uptake and GLT-1 expression in astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 34, 34-39.
- Zephir, H., Fajardy, I., Outteryck, O., Blanc, F., Roger, N., Fleury, M., Rudolf, G., Marignier, R., Vukusic, S., Confavreux, C., Vermersch, P., de Seze, J., 2009. Is neuromyelitis optica associated with human leukocyte antigen? *Mult Scler* 15, 571-579.
- Zepp, J., Wu, L., Li, X., 2011. IL-17 receptor signaling and T helper 17-mediated autoimmune demyelinating disease. *Trends Immunol* 32, 232-239.