HAL
open science

L'activation des α-sécrétases : une nouvelle stratégie thérapeutique pour le traitement du traumatisme crânien

Eleni Siopi

To cite this version:

Eleni Siopi. L'activation des α-sécrétases : une nouvelle stratégie thérapeutique pour le traitement du traumatisme crânien. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05P616 . tel-00748807

HAL Id: tel-00748807

https://theses.hal.science/tel-00748807v1

Submitted on 6 Nov 2012

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

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

N° d'ordre Année 2012

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

THESE DE DOCTORAT

École Doctorale du Médicament (ED MTCE)

Spécialité
Pharmacologie

Présentée par

Eleni SIOPI

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

L'ACTIVATION DES α-SECRETASES : UNE NOUVELLE STRATEGIE THERAPEUTIQUE POUR LE TRAITEMENT DU TRAUMATISME CRÂNIEN

Soutenue publiquement le 3 juillet 2012

Devant le jury composé de :

Dr. Françoise LAZARINI	Rapporteur
Pr. Jean-François PAYEN	Rapporteur
Pr. Carine ALI	Examinateur
Pr. Jean-François MATHÉ	Examinateur
Pr. Catherine MARCHAND-LEROUX	Examinateur
Pr. Michel PLOTKINE	Examinateur
Pr. Mehrnaz JAFARIAN-TEHRANI	Directeur de recherche

ἕν οἶδα ὅτι οὐδὲν οἶδα

Je ne sais qu'une chose, c'est que je ne sais rien

(Apologie de Socrate, PLATON)

REMERCIEMENTS

A plusieurs reprises, durant ce travail de thèse, je me suis sentie désemparée devant l'ampleur de la tâche à accomplir. Pourtant, à l'heure de rédiger ces remerciements, je réalise avec grande émotion à quel point j'ai toujours été bien entourée et soutenue. Ce manuscrit est le fruit d'un long investissement ayant mis à contribution de nombreuses personnes qui ont participé à l'achèvement de ce projet. Qu'elles puissent trouver dans ces quelques lignes l'expression de mes sincères remerciements.

Ma thèse n'aurait sans doute jamais abouti si je n'avais pas eu la chance de croiser la route du Professeur Mehrnaz JAFARIAN-TEHRANI*, ma directrice de thèse. Je tiens à la remercier pour son ouverture d'esprit, pour sa disponibilité, pour sa confiance en moi, pour ses encouragements et pour sa fidélité à mes convictions. C'est grâce à elle que j'ai appris, au cours de ces quatre années de collaboration, le coût et le bénéfice de la liberté, d'action comme de pensée. Optimisme, ténacité, rigueur, compréhension, tolérance et curiosité. Elle est pour moi une inspiration, une amie et un exemple à suivre.*

J'exprime mon respect et ma profonde reconnaissance au Monsieur le Professeur Michel PLOTKINE, *pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de pharmacologie de la circulation cérébrale (EA 4475), pour tous ses conseils et discussions fructueuses.*

J'exprime ma sincère reconnaissance à Madame le Professeur Catherine MARCHAND-LEROUX, directrice de mon laboratoire d'accueil EA 4475, *pour sa confiance en moi, sa disponibilité, ses conseils précieux.*

J'adresse aussi ma profonde gratitude à l'ensemble des membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail :

Madame le Docteur Françoise LAZARINI, *pour avoir accepté de juger mon travail de thèse en qualité de rapporteur. Je lui exprime toute ma gratitude et mes remerciements.*

Monsieur le Professeur Jean-François PAYEN, *pour s'être rendu disponible et avoir accepté la fonction de rapporteur. Je lui exprime toute ma considération et mes remerciements.*

Monsieur le Professeur Jean-François MATHÉ*, pour l'intérêt qu'il a manifesté à l'égard de cette recherche en s'engageant à être examinateur. Je lui exprime toute ma chaleureuse gratitude et reconnaissance.*

De même, Madame le Professeur Carine ALI, *pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examinateur. Je lui exprime toute ma chaleureuse gratitude.*

Je souhaite aussi exprimer ma profonde gratitude à la « FONDATION DES GUEULES CASSEES » *qui m'a apporté son soutien en m'offrant un financement pour cette thèse.*

Je tiens à remercier également les étudiants Silvia CALABRIA, Gemma LLUFRIU-DABEN, Francesca FANUCCHI, Angelo CHO et Sandra VIDAL-LLETJOS, *pour avoir participé vivement à ce projet avec engagement et enthousiasme. Je suis reconnaissante pour leur aide indispensable et pour tous les bons moments passés ensemble.*

L'aide et le soutien du personnel technique du laboratoire m'a été également indispensable. Je garde ainsi une place particulière à Mathieu SOUSTRAT*, pour l'ambiance de travail très agréable qu'il a su créer au laboratoire, à* Nicole CROCI *pour m'avoir conseillée et encouragée tout au long de cette aventure et à* Bruno PALMIER*, pour avoir partagé ses compétences scientifiques ainsi que son bon humeur au quotidien.*

Je tiens aussi à remercier le Dr. Florence NOBLE *pour nos discussions scientifiques sur le comportement.*

Un grand merci au Dr. Nicole CLAPERON *pour son soutien et ses conseils indispensables. Je lui exprime mon respect et ma profonde reconnaissance.*

Un merci aussi à Isabelle, Valérie, Virginie *et* Dominique *pour leurs conseils et leur amitié.*

J'aimerais aussi exprimer à tous les doctorants du laboratoire le plaisir et le bonheur que j'ai eu à travailler à leurs côtés. Mohamad, Cindy, Haymen, Marie L., Fei, Magalie, Marie G., Tiphaine *et à tous ceux qui ont constitué cette équipe si vivante. Leur amitié et leur solidarité m'ont accompagnée tout le long de ces années, pendant les phases joyeuses et sombres. Je leur exprime ma profonde sympathie et leur souhaite beaucoup de bien.*

Cette thèse, aboutissement de longues années d'études, je la dois beaucoup à mes parents, Maria et Christos*, à mon frère* Dimitris *et à ma chère grande-mère,* giagia Paraskevi *qui nous a récemment quittés. Je les remercie de m'avoir toujours protégée avec un amour émouvant et fidèle, dans un climat toujours serein, à l'abri de tout souci affectif. Il m'est impossible de trouver des mots pour dire à quel point je les aime et je suis fier d'eux, et à quel point et je les remercie pour tous les sacrifices qu'ils ont dû faire pour moi.*

Je souhaite également remercier de tout mon cœur mon extraordinaire compagnon Vassili, *qui m'épaule maintenant depuis 5 ans, ainsi que sa famille chaleureuse,* Kostas, Aleka *et* Hécate*, dont la solidarité m'a accompagnée et apaisée au quotidien.*

Pour conclure, ces remerciements ne seraient pas complets sans une pensée et un clin d'œil amical pour tous mes amis en Grèce et en France. Merci de m'avoir aidée et encouragée, malgré les distances, et pour m'avoir changée les idées quand j'en avais besoin.

SOMMAIRE

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS I

PUBLICATIONS I
COMMUNICATIONS ORALES
COMMUNICATIONS AFFICHEES II

TABLEAUX ET FIGURES V

ABREVIATIONS VII

INTRODUCTION 1

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES 3

CHAPITRE 1 : LE TRAUMATISME CRANIEN 3

1. ASPECTS CLINIQUES DU TRAUMATISME CRANIEN 3

1.1. Épidémiologie et étiologie 3
1.2. Les lésions post-traumatiques 4
1.2.1. Lésions primaires 5
1.2.2. Lésions secondaires 8
1.3. Les atteintes comportementales 12
1.3.1. Dysfonctionnement cognitif 13
1.3.2. Dysfonctionnement moteur 15
1.3.3. Dysfonctionnement sensoriel 16
1.3.4. Dysfonctionnement psychique 18
1.3.5. Causes des dysfonctionnements neurologiques post-TC 19
1.4. Les cascades physiopathologiques après un TC 20
1.4.1. L'excitotoxicité 20
1.4.2. Le stress oxydant 21
1.4.3. La neuro-inflammation 22
1.4.4. La mort cellulaire 22
1.5. Évaluation et classification de la gravité du traumatisme crânien 24
1.6. Prise en charge des traumatisés crâniens 28

2. MODELES EXPERIMENTAUX DE TRAUMATISME CRANIEN 30

2.1. Modèles *in vitro* 30
2.1.1. TC sur cultures cellulaires 31
2.1.2. TC sur coupes 31
2.2. Modèles in vivo 31
2.2.1. *À crâne ouvert 32*
2.2.2. A crâne fermé 33

3. LES ESSAIS CLINIQUES DANS LE TRAUMATISME CRANIEN 35

4. CAUSES DES ECHECS DES ESSAIS CLINIQUES DANS LE TRAUMATISME CRANIEN 39

CHAPITRE 2 : LA NEURO-INFLAMMATION POST-TC 43

1. DEFINITION 43

2. LES SOURCES CELLULAIRES DE LA NEURO-INFLAMMATION 43

2.1. Les microglies 43
2.2. Les astrocytes 48
2.3. Les cellules sanguines 49

3. LES COMPOSANTS MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LE PROCESSUS TRAUMATISME NEURO-INFLAMMATOIRE POST-TC 51

3.1. Les cytokines 51
3.2. Les chimiokines 53
3.3. Les molécules d'adhésion 54
3.4. Les métalloprotéases de la matrice extracellulaire 54
3.5. NO, NO synthases et cyclo-oxygénases (COX) 55

CHAPITRE 3 : LE PRECURSEUR DU PEPTIDE BETA-AMYLOIDE ET SA PROTEOLYSE PAR LES SECRETASES 57

1. LE PRECURSEUR DU PEPTIDE β AMYLOIDE (βAPP) 57

1.1. Généralités 57
1.2. La structure et le rôle physiologique du βAPP 58
1.3. Les deux voies de protéolyse du βAPP 59

2. LES SECRETASES 61

2.1. Les α-sécrétases (ADAMs) 61
2.2. Les β-sécrétases 69
2.3. Les γ-sécrétases 71

3. LES PRODUITS PRINCIPAUX DE LA PROTEOLYSE DU βAPP 71

3.1. La forme soluble α du précurseur du peptide β amyloïde (sAPPα) 71
3.2. La forme soluble β du précurseur du peptide beta amyloïde (sAPPβ) 76
3.3. Le peptide Aβ 76

CHAPITRE 4 : LA MINOCYCLINE 79

1. GENERALITES 79

1.1. La famille des tétracyclines 79
1.2. La pharmacocinétique de la minocycline 81

2. LES MECANISMES D'ACTION DE LA MINOCYCLINE 81

3. LA MINOCYCLINE ET LES PATHOLOGIES DU SNC 84

4. LA MINOCYCLINE ET LE TRAUMATISME CRANIEN 84

5. LES ESSAIS CLINIQUES AVEC LA MINOCYCLINE 85

CHAPITRE 5 : L'ETAZOLATE 97

1. LES GENERALITES 97

2. LES MECANISMES D'ACTION D'ETAZOLATE 97

2.1. Inhibition des phosphodiésterases du type 4 97
2.2. Modulation des récepteurs $GABA_A$ 103
2.3. Stimulation de l'activité des α-sécrétases 105

3. LES ESSAIS CLINIQUES AVEC L'ETAZOLATE (EHT0202) 107

BUT DE TRAVAIL 109

MATERIELS ET METHODES 111

1. ANIMAUX 111

2. MODELE DE TRAUMATISME CRANIEN PAR PERCUSSION MECANIQUE 111

3. PROTOCOLES DE TRAITEMENT 111

4. ÉVALUATION DE L'ŒDEME CEREBRAL 112

5. ÉVALUATIONS BIOCHIMIQUES 112

5.1. Dosage des protéines totales 112
5.2. Dosage de la sAPPα par ELISA 113
5.3. Dosage de l'IL-1β par ELISA 114

6. ÉVALUATIONS HISTOLOGIQUES 115

6.1. Prélèvement et coupe des cerveaux 115
6.2. Évaluation du volume de lésion focale et de l'expansion du ventricule ipsilatéral par la coloration au violet de Crésyl 115
6.3. Évaluation de la surface des bulbes olfactifs 116
6.4. Évaluations de l'activation microgliale, de l'astrogliose et des LADs par immunohistochimie (IHC) 116

6.4.1. Immunomarquage de CD11b (activation microgliale) 117
6.4.2. Immunomarquage de GFAP (astrogliose) 118
6.4.3. La méthode de quantification 118

7. ÉVALUATION DU SCORE NEUROLOGIQUE PAR LE SCORE IRWIN-SORTIE DU CERCLE 118

8. ÉVALUATION DE LA FONCTION OLFACTIVE POST-TC 120

8.1. Test de préférence olfactive 120
8.2. Test d'aversion olfactive 121

9. ÉVALUATION DE LA FONCTION LOCOMOTRICE PAR L'ACTIMETRIE 121

10. ÉVALUATION DE LA MEMOIRE PAR LE TEST DE RECONNAISSANCE DE NOUVEL OBJET (NORT) 122

10.1. Tests de Préférence 123
10.2. Test NORT (*Novel Object Recognition Test*) 123

11. ÉVALUATION DE L'ANXIETE 124

11.1. Test de la «*Elevated Plus Maze* (EPM)» 124
11.2. Test de la *«Elevated Zero Maze* (0-maze)» 125

12. ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS 125

RESULTATS 127

PREMIERE PARTIE 127

ETUDE DE L'EFFET DE LA MINOCYCLINE SUR LE NIVEAU POST-TC DE LA SAPPα ET SUR LES CONSEQUENCES HISTOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES TARDIVES DU TC

1. La minocycline en traitement aigu rétablit le niveau post-traumatique de la sAPPα et diminue les lésions cérébrales et la gliose réactive à long terme post-TC 128

Article 1 128

Siopi E, Cho AH, Homsi S, Croci N, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M (2011). Minocycline restores sAPPα levels and reduces the late histopathological consequences of traumatic brain injury in mice. J Neurotrauma, 28: 2135-2143.

2. La minocycline en traitement aigu améliore la fonction olfactive et diminue la lésion des bulbes olfactifs post-TC 129

2.1. Test de préférence olfactive 129
2.2. **Article 2** 130

Siopi E, Calabria S, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M (2012). Minocycline improves olfactory bulb volume and olfactory behavior after traumatic brain injury in mice. J Neurotrauma, 29: 354-361.

3. La minocycline en traitement aigu améliore la fonction cognitive à court et à long terme post-TC 131

3.1. Mise au point du test de reconnaissance de nouvel objet (NORT) chez la souris : tests de préférence pour le choix des objets 131
3.2. **Article 3** 132

Siopi E, Llufriu-Dabén G, Fanucci F, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M (2012). Evaluation of late cognitive impairment and anxiety states following traumatic brain injury in mice: The effect of minocycline. Neurosci Lett, 511: 110-115.

4. Discussion 133

DEUXIEME PARTIE 140

ETUDE DE L'EFFET D'UN ACTIVATEUR DES α-SÉCRÉTASES, L'ÉTAZOLATE, SUR LES CONSÉQUENCES BIOCHIMIQUES, HISTOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES DU TC A COURT ET A LONG TERME

1. Un activateur des α-sécrétases, l'étazolate, réduit la neuro-inflammation et entraîne une neuroprotection à court et à long terme post-TC chez la souris 141

1.1. Évolution post-TC du taux de l'IL-1β 141
1.2. Évolution post-TC de l'œdème cérébral 141
1.3. **Article 4** 143

Siopi E, Llufriu-Dabén G, Cho AH, Vidal-Lletjós S, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. (2012). Etazolate, a phosphodiesterase-4 inhibitor and α-secretase activator, reduces neuroinflammation and offers persistent neuroprotection following traumatic brain injury in mice (soumis).

1.4. Effet de l'étazolate sur la température rectale post-TC 144
1.5. Effet propre de l'étazolate sur l'activité locomotrice spontanée et le score neurologique chez les souris naïves 144

2. Discussion 147

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 151

REFERENCES 157

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS INTERNATIONALES À COMITE DE LECTURE (RELATIVES À CE TRAVAIL)

Siopi E, Cho AH, Homsi S, Croci N, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M (2011). Minocycline restores sAPPα levels and reduces the late histopathological consequences of traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma,* 28: 2135-43.

Siopi E, Calabria S, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M (2012). Minocycline improves olfactory bulb volume and olfactory behavior after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma,* 29 : 354-361.

Siopi E, Llufriu-Daben G, Fanucchi F, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M (2012). Evaluation of late cognitive impairment and anxiety states following traumatic brain injury in mice: The effect of minocycline. *Neurosci Lett,* 511: 110-115.

Siopi E, Llufriu-Daben G, Cho AH, Vidal-Lletjós S, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M (2012). Etazolate, a phosphodiesterase-4 inhibitor and α-secretase activator, reduces neuroinflammation and offers persistent neuroprotection following traumatic brain injury in mice *(soumis).*

PUBLICATION INTERNATIONALE À COMITE DE LECTURE (NON-RELATIVE À CE TRAVAIL)

López-Rodríguez AB, **Siopi E**, Kerr DM, Ford GK, Marchand-Leroux C, Finn DP, Jafarian-Tehrani M, Viveros MP. Involvement of the endocannabinoid system in the neuroprotective effects of minocycline after traumatic brain injury in mice *(manuscrit en préparation).*

COMMUNICATIONS ORALES (* présentées par E. Siopi)

*** Siopi E**, Homsi S, Croci N, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Minocycline et neuroprotection dans le traumatisme crânien : un rôle potentiel du neuroprotecteur endogène sAPPa. **Réunion annuelle de la Société de Circulation et de Métabolisme du Cerveau (SCMC).** Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, Paris, France, 29 Janvier 2010.

Siopi E, Cho AH, Homsi S, Croci N, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Minocycline et neuroprotection dans le traumatisme crânien : un rôle potentiel du neuroprotecteur endogène sAPPα. **Rencontre annuelle du club de neuroprotection,** maison de l'Amérique Latine, Paris, France, 22 Octobre 2010.

*** Siopi E**, Cho AH, Homsi S, Croci N, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Minocycline et neuroprotection dans le traumatisme crânien : un rôle potentiel du neuroprotecteur endogène sAPPα. **Colloque annuel de la Société de Circulation et de Métabolisme du Cerveau (SCMC), « Hypoxie ».** Campus Jules Horowitz, Caen, France, 20-21 Janvier 2011.

Jafarian-Tehrani M, **Siopi E**, Cho AH, Homsi S, Croci N, Plotkine M, Marchand-Leroux C. Reduction of the long-term consequences of traumatic axonal injury by minocycline following closed head injury in mice : the potential neuroprotective role of sAPPα. **VIème congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique.** Alpes Congrès, Grenoble, France, 22-24 Mars 2011. *In: Fundam Clin Pharmacol* (2011) 25 (S1): 61.

López-Rodríguez AB, **Siopi E**, Kerr DM, Ford GK, Marchand-Leroux C, Finn DP, Jafarian-Tehrani M, Viveros MP. Involvement of the endocannabinoid system in the neuroprotective effects of minocycline after traumatic brain injury in mice. **12ª Reunión Anual de la Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides**, Université de Navarra, Pamplona, Espagne, 24-26 Novembre 2011.

* **Siopi E**, Llufriu-Daben G, Cho AH, Vidal-Lletjós, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Etazolate, a phosphodiesterase-4 inhibitor and α-secretase activator, reduces neuroinflammation and offers persistent neuroprotection following traumatic brain injury in mice. **Journée 'Parlons de la microglie',** Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure, Paris, France, 16 Mars 2012.

* **Siopi E**, Llufriu-Daben G, Cho AH, Vidal-Lletjós S, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Etazolate reduces neuroinflammation, restores sAPPα levels and offers persistent neuroprotection after traumatic brain injury in mice. **Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique.** Dijon, France, 5 Avril 2012. *In : Fundam Clin Pharmacol* (2012) 26(S1): 20.

* **Siopi E**, Llufriu-Daben G, Vidal-Lletjós, Cho AH, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Etazolate, a phosphodiesterase-4 inhibitor and α-secretase activator, reduces neuroinflammation and offers persistent neuroprotection following traumatic brain injury in mice. ***Les Journées de l'Ecole Doctorale MTCE,*** Amphithéâtre Buffon, Université Paris Diderot, Paris, France, 10-11 avril 2012.

SEMINAIRE SUR INVITATION

Jafarian-Tehrani M. et **Siopi E.** Minocycline and neuroprotection in experimental traumatic brain injury. Invited by Dr Françoise LAZARINI, Pasteur Institute, Laboratory of Perception and memory, CNRS URA 2182, Paris, 19 Mai 2011.

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

Siopi E, Homsi S, Croci N, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Minocycline attenuates the traumatic brain injury-mediated decrease of an endogenous neuroprotector, the soluble form a of the amyloid precursor protein, sAPPa. **Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique (P2T)**, Centre hospitalier et universitaire de Bordeaux, Université Victor Ségalen, Bordeaux, France, 23-25 Mars 2010. In: *Fundam Clin Pharmacol* (2010) 24 (S1): 44.

Siopi E, Homsi S, Croci N, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Minocycline attenuates the traumatic brain injury-mediated decrease of an endogenous neuroprotector, the soluble form a of the amyloid precursor protein, sAPPa. **Première réunion de l'institut Médicament Toxicologie Chimie et Environnement (IMTCE)**, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Paris, France, 8 Avril 2010.

Siopi E, Cho AH, Homsi S, Croci N, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Reduction of the long-term consequences of diffuse axonal injury by minocycline following closed head injury in mice: the potential neuroprotective role of sAPPα**. Congrès *Young Researchers in Life Sciences* (YRLS)**, Institut Pasteur, Paris, France, 7-9 Juin 2010.

Siopi E, Cho AH, Homsi S, Croci N, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Reduction of the long-term consequences of diffuse axonal injury by minocycline following closed head injury in mice: the potential neuroprotective role of sAPPα**. Congrès *Neuroinflammation and Glial reactivity* du Club français des Cellules Gliales,** Institut du cerveau et de la moëlle épinière, hôpital Salpêtrière, Paris, France, 15 Decembre 2010.

Siopi E, Calabria S, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Minocycline reduces the olfactory bulb lesions and olfactory impairment induced by traumatic brain injury in mice : A twelve-week follow-up study. **Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique (P2T)**, Grenoble, France, 22-24 Mars 2011. In: *Fundam Clin Pharmacol (2011)* 25 (S1): 61-62.

Siopi E, Calabria S, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Minocycline improves olfactory bulb integrity and olfactory behavior after traumatic brain injury in mice. ***Journée de l'Ecole Doctorale MTCE,*** Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, Paris, France, 3 Mai 2011.

Siopi E, Calabria S, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Minocycline improves olfactory bulb integrity and olfactory behavior after traumatic brain injury in mice. ***Congrès « Young Researchers in Life Sciences » (YRLS)***, Institut Pasteur, Paris, France, 9-11 Mai 2011.

Siopi E, Llufriu-Dabén G, Fanucchi F, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Acute minocycline treatment improves memory function following traumatic brain injury in mice. **2ème journée de l'institut Médicament Toxicologie Chimie et Environnement (IMTCE)**, « Partenariats Recherche fondamentale – Recherche clinique », Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Paris, France, 27 Mai 2011.

Siopi E, Calabria S, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Minocycline improves olfactory bulb integrity and olfactory behavior after traumatic brain injury in mice. **2ème journée de l'institut Médicament Toxicologie Chimie et Environnement (IMTCE)**, « Partenariats Recherche fondamentale – Recherche clinique », Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Paris, France, 27 Mai 2011.

Siopi E, Calabria S, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Minocycline improves olfactory bulb integrity and olfactory behavior after traumatic brain injury in mice. ***XXVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function and the Xth International Conference on Quantification of Brain Function with PET.*** Barcelone, Espagne, 24-28 Mai 2011.

Siopi E, Cho AH, Homsi S, Croci N, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Reduction of the long-term consequences of diffuse axonal injury by minocycline following closed head injury in mice: the potential neuroprotective role of sAPPα. ***XXVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function and the Xth International Conference on Quantification of Brain Function with PET.*** Barcelone, Espagne, 24-28 Mai 2011.

Siopi E, Calabria S, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Minocycline improves olfactory bulb integrity and olfactory behavior after traumatic brain injury in mice. **National Neurotrauma Symposium,** Westin Diplomat Resort, Fort Lauderdale, Florida, USA,10-13 juillet 2011. In: *J Neurotrauma* (2011) 28: A-11.

Siopi E, Cho HA, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Reduction of the long-term consequences of diffuse axonal injury by minocycline following closed-head injury in mice: the potential neuroprotective role of sAPPα. **National Neurotrauma Symposium,** Westin Diplomat Resort, Fort Lauderdale, Florida, USA, 10-13 juillet 2011. In: *J Neurotrauma* (2011) 28: A-65.

Siopi E, Llufriu-Dabén G, Fanucchi F, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Acute minocycline treatment improves memory function following traumatic brain injury in mice. **National Neurotrauma Symposium,** Westin Diplomat Resort, Fort Lauderdale, Florida, USA, 10-13 juillet 2011. In: *J Neurotrauma* (2011) 28: A-64.

Siopi E, Llufriu-Dabén G, Fanucchi F, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Acute minocycline treatment improves memory function following traumatic brain injury in mice. **Colloque annuel de la Société de Circulation et de Métabolisme du Cerveau (SCMC),** Paris, France, 20 Janvier 2012.

Siopi E, Llufriu-Dabén G, Fanucchi F, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Acute minocycline treatment improves memory function following traumatic brain injury in mice. **Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique.** Dijon, France, 4-6 Avril 2012. In: *Fundam Clin Pharmacol (2012)* 26 (S1): 93.

Siopi E, Llufriu-Daben G, Vidal-Lletjós S, Cho AH, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Etazolate reduces neuroinflammation, restores sAPPα levels and offers persistent neuroprotection after traumatic brain injury in mice. **Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique.** Dijon, France, 4-6 Avril. In: *Fundam Clin Pharmacol* (2012)26 (S1): 20.

Siopi E, Llufriu-Daben G, Vidal-Lletjós S, Cho AH, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Etazolate reduces neuroinflammation, restores sAPPα levels and offers persistent neuroprotection after traumatic brain injury in mice. **3ème journée de l'institut Médicament Toxicologie Chimie et Environnement (IMTCE)**, Université Paris Descartes, Paris, France, 22 Juin 2012.

Siopi E, Llufriu-Daben G, Vidal-Lletjós S, Cho AH, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Etazolate reduces neuroinflammation, restores sAPPα levels and offers persistent neuroprotection after traumatic brain injury in mice. **National Neurotrauma Symposium,** Arizona Baltimore Resort & Spa, Phoenix, Arizona, USA, 22-25 Juillet 2012. In: *J Neurotrauma* (2012) *in press*.

Prix

11 Mai 2011 : Prix du meilleur poster (voté par le public) pour la communication :
Siopi E, Calabria S, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Minocycline improves olfactory bulb integrity and olfactory behavior after traumatic brain injury in mice'. ***Young Researchers in life congress***, Institut Pasteur, Paris, France, 9-11 Mai 2011.

13 Juillet 2011 : **Finaliste du prix du meilleur poster** pour la communication :
Siopi E, Calabria S, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Minocycline improves olfactory bulb integrity and olfactory behavior after traumatic brain injury in mice. *National Neurotrauma Symposium*, Fort Lauderdale, Florida, USA, 10-13 juillet 2011. In: *J Neurotrauma* (2011) 28: A-11.

6 Avril 2012 : **Finaliste du prix de thèse en Pharmacologie pré-clinique** pour la communication :
Siopi E, Llufriu-Daben G, Cho AH, Vidal-Lletjós S, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. Etazolate reduces neuroinflammation, restores sAPPα levels and offers persistent neuroprotection after traumatic brain injury in mice. **Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique.** Dijon, France, 4-6 Avril. *In: Fundam Clin Pharmacol* (2012) 26 (S1): 20.

TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAUX

Tableau 1 : Score de Coma de Glasgow 25

Tableau 2 : L'échelle de devenir de Glasgow 26

Tableau 3 : L'échelle de devenir de Glasgow étendue 27

Tableau 4 : Les essais cliniques les plus récents sur le traumatisme crânien 41

Tableau 5 : Les substrats des ADAMs 9, 10 et 17 64

Tableau 6 : Les mécanismes d'action de la sAPPα et les effets produits 73

Tableau 7 : Mécanismes d'action proposés à l'origine de l'effet neuroprotecteur de la minocycline 87

Tableau 8 : Effets *in vitro* de la minocycline 89

Tableau 9 : Effets *in vivo* de la minocycline dans des modèles animaux des pathologies du SNC 91

Tableau 10 : Les essais cliniques les plus récents avec la minocycline pour des pathologies du SNC 95

Tableau 11 : Etazolate : mécanismes d'action, effets pharmacologiques, étude clinique & brevet 98

Tableau 12 : L'expression des sous-familles de PDE4 dans les différents tissus et populations cellulaires humaines 101

Tableau 13 : Cotation de la sortie du cercle sur 3 points 119

Tableau 14 : Cotation des critères choisis dans la grille d'évaluation d'Irwin sur 5 points 119

FIGURES

Figure 1 : Schéma chronologique des conséquences aigues et tardives post-TC 4

Figure 2 : Schéma de la composition cellulaire de la BHE 10

Figure 3 : Les différents types de mémoire 14

Figure 4 : Les différentes voies de la mort cellulaire 24

Figure 5 : La BHE endommagée et les différentes sources cellulaires de la neuro-inflammation à la suite d'un TC 44

Figure 6 : Les conséquences de l'activation microgliale post-TC 45

Figure 7 : Le double rôle de la microglie active 46

Figure 8 : Représentation schématique de la cinétique d'activation microgliale post-TC 47

Figure 9 : Représentation schématique de la cinétique post-TC des cellules inflammatoires 50

Figure 10 : Représentation des différents domaines de la molécule βAPP 59

Figure 11 : La voie non-amyloïdogénique de protéolyse du ßAPP 60

Figure 12 : La voie amyloïdogénique de protéolyse du ßAPP 60

Figure 13 : La structure d'une ADAM classique 62

Figure 14 : Représentation des domaines solubles sAPPα et sAPPβ 72

Figure 15 : Structures chimiques de la tétracycline et de la minocycline 80

Figure 16 : Structure chimique de l'étazolate 97

Figure 17 : Le mécanisme d'action des inhibiteurs de PDE de type 4 100

Figure 18 : Schéma hypothétique des différents sites fonctionnels au sein du récepteur $GABA_A$ 104

Figure 19 : Les sites de liaison des anticorps de capture et de détection dans le kit ELISA pour la détection de la sAPPα 113

Figure 20 : Le dispositif du test olfactif 121

Figure 21 : Le protocole des habituations dans l'enceinte du NORT 122

Figure 22 : Les deux couples d'objets utilisés pour le NORT 123

Figure 23 : Les différentes étapes du Test de NORT 124

Figure 24 : Les appareils d'*Elevated Plus Maze* et d'*Elevated Zero Maze* **125**

Figure 25 : Le test de préférence olfactive 129

Figure 26 : Les tests de préférence pour le choix des objets NORT 131

Figure 27 : Évolution du taux cérébral de l'IL-1β 141

Figure 28 : Évolution de l'œdème cérébral 142

Figure 29 : Effet de l'étazolate sur la température rectale 145

Figure 30 : Effet propre d'étazolate sur l'activité locomotrice 146

Figure 31 : Effet propre de l'étazolate sur le score neurologique 146

ABREVIATIONS

Aß	ß-amyloïde
AAE	acides aminés excitateurs
AC	adénylate cyclase
ACE	*Angiotensin Converting Enzyme*
AD	maladie d'Alzheimer
ADAM	*A Disintegrin And Metalloproteinase*
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AICD	*APP intracellular domain*
AMPA	acide a-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique
ANOVA	analyse de variance
apoE	apolipoprotéine E
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN *messager*
ARNt	ARN de transfert
AVC	accident vasculaire cérébral
ß-APP	précurseur du peptide ß-amyloïde
BHE	barrière hémato-encéphalique
BSA	sérum albumine bovine
BZD	benzodiazépine
Ca^{2+}	calcium
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
Caspase	*cysteinyl aspartate-specific proteinase*
Cl^-	chloride
Cmax	concentration maximale
COX	cyclo-oxygénase
CREB	*AMPc response element binding*
CT-scan	*Computed Tomography-scan*
DA	dopamine
DPPH	diphenyl-*p*-picrylhydrazyl
DSC	débit sanguin cérébral
DTI	*Diffusion tensor imaging*
DWI	*Diffusion-weighted imaging*
E-cadhérine	cadhérine endothéliale

E-cad CTF1	fragments C-Terminaux de la E-cadhérine
ECD	domaine extracellulaire
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
EEG	électroencéphalogramme
EGFR	*epidermal growth factor receptor*
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*
eNOS	NOS endothéliale
Eph	éphrines
ERO	espèces réactives d'oxygène
ERK	*extracellular-signal-regulated kinase*
e.s.m.	écart standard à la moyenne
FDA	*food and drug administration*
GABA	acide γ-aminobutyrique
GCS	échelle de coma de Glasgow
GCS-E	échelle de coma de Glasgow étendue
GFAP	*glial fibrillary acidic protein*
GFLD	*growth factor-like domain*
GOS	échelle de devenir de Glasgow
GPI	glyco-phosphatidyl-inositol
HED	hématome épidural
HD	maladie de Huntington
HIC	hypertension intracrânienne
HSA	hémorragie sous-arachnoïdienne
HSD	hématome sous-dural
HSPGs	*heparan sulfate proteoglycans*
IC	ischémie cérébrale
IHC	immunohistochimie
IH	intra-hippocampique
IL	interleukine
i.p.	intrapéritonéale
IRM	imagerie par résonance magnétique
i.c.v.	intracérébrovéntriculaire
i.v.	intraveineuse
j	jour
K^+	potassium

kDa	kilo dalton
KO	*knock-out*
KPI	*kunitz protease inhibitor*
LAD	lésion axonale diffuse
LCR	liquide céphalo-rachidien
LTP	potentialisation à long terme
LPS	lipopolysaccharide
MAO	monoamine oxydase
MADM	*mammalian-disintegrin metalloprotease*
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*
MINO	minocycline
MMP	métalloprotéase de la matrice
MPTP	1 - méthyle 4 - phényl 1,2,3,6-tétrahydropyridine
mPTPs	*mitochondrial permeability transition pores*
MRS	*Magnetic resonance spectroscopy*
Na^+	sodium
nAChR	récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine
N-cadhérine	cadhérine neuronale
N-cad CTF1	fragments C-Terminaux de la N-cadhérine
NCAM	*neuronal cell adhesion molecule*
NFκB	*nuclear factor kappa B*
NK	*Natural Killer cell*
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NO	monoxyde d'azote
OC	œdème cérébral
PAR	poly (ADP)-ribose
PARP	poly (ADP)-ribose polymérase
PBS	*phosphate-buffered saline*
PD	la maladie de Parkinson
PDE	phosphodiésterase
PEG	polyéthylène glycol
per os	par voie orale
PGs	prostaglandines
PKA	protéine kinase A
PMNs	neutrophiles polymorphonucléaires
PIC	pression intracrânienne

PKC	protéine kinase C
PPC	pression de la perfusion cérébrale
Pro-HB-EGF	*pro-heparin-binding-epidermal growth factor*
Rc	récepteur
Rc5HT-4	récepteur à la sérotonine 5HT-4
RECK	*reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs*
RLs	radicaux libres
s.c.	sous-cutané
SCI	traumatisme de la moëlle épinière
SNC	système nerveux central
SNP	système nerveux périphérique
SP	substance P
SPECT	*Single Photon Emission Computed Tomography*
SSPT	syndrome de stress post-traumatique
SVZ	zone subventriculaire cérébrale
$t_{1/2}$	demi-vie
TAG	trouble d'anxiété généralisée
TBS	*tris-buffered saline*
TC	traumatisme crânien
TDM	tomodensitométrie
TEP	tomographie à émission de positron
TGN	réseau trans-golgien
TIMP	*tissue inhibitor of metalloproteinase*
TIMP	*tissue inhibitor of metalloproteinase*
TK	famille de Tachyninines
TNFα	facteur de nécrose tumorale α
TTBS	Tween-TBS
VCAM-1	*vascular cell adhesion molecule 1*
VE-cadhérine	cadhérine de l'endothélium vasculaire
VSC	volume sanguin cérébral

INTRODUCTION

Le traumatisme crânien (TC) représente un problème majeur de santé publique en raison de sa fréquence, de la gravité du pronostic vital immédiat et de l'importance des séquelles à moyen et à long terme. En raison de la complexité de sa pathologie, le TC entraîne de nombreuses lésions cérébrales, focales ou diffuses, pour lesquelles il n'existe à ce jour aucun traitement neuroprotecteur. Représentant une agression cérébrale induite par une force externe, les séquelles du TC regroupent des lésions et des déficits qui touchent l'état de conscience, la mémoire, les capacités motrices, voire les sens. La gravité du TC dépend de la sévérité immédiate des lésions primaires mais également de leur aggravation dans les heures et les jours qui suivent le TC, avec l'apparition de lésions secondaires. La neuro-inflammation constitue l'une des cascades physiopathologiques jouant un rôle très important dans l'aggravation des lésions post-traumatiques, dont les lésions axonales diffuses (LADs), et son contrôle pharmacologique a été décrit comme une stratégie neuroprotectice potentielle.

L'environnement neuro-inflammatoire a été également associé à la diminution post-traumatique du taux d'un neuroprotecteur endogène, la forme soluble α du précurseur du peptide β amyloïde (sAPPα). Cette dernière est issue de la protéolyse du précurseur du peptide β amyloïde (βAPP) par les enzymes α-sécrétases ou ADAMs. Des études récentes ont révélé que la sAPPα exerce des effets neuroprotecteurs et neurotrophiques, réduit les lésions focales et diffuses et améliore le déficit cognitif et moteur suite à un TC expérimental. Au vu de ces données, ce travail de thèse a eu pour but d'étudier l'intérêt thérapeutique des composés pharmacologiques modulant le taux de sAPPα post-TC sur les conséquences biochimiques, histopathologiques et fonctionnelles, à court et à long terme, dans un modèle de TC par percussion mécanique chez la souris. Parmi les différents composés ayant le potentiel de stimuler la production de sAPPα, la minocycline, une tetracycline de 2ème génération aux effets anti-inflammatoires, et l'étazolate, une pyrazolopyridine récemment décrite comme activateur des α-sécrétases, ont été sélectionnés.

CHAPITRE 1 : LE TRAUMATISME CRANIEN

Le traumatisme crânien (TC) est défini comme une agression cérébrale induite par une force externe. Les séquelles de cette agression présentent l'éventail complet des déficiences consécutives à des lésions du cerveau. Ces déficiences peuvent altérer un ou plusieurs champs tels que l'état de conscience, les capacités motrice et cognitive, la mémoire, de façon transitoire ou permanente entraînant des incapacités partielles ou totales (Mathé et al., 2005).

1. ASPECTS CLINIQUES ET PHYSIOPATHOLOGIQUES DU TRAUMATISME CRANIEN

1.1. Épidémiologie et étiologie

Le TC demeure encore à l'heure actuelle l'une des premières causes de mortalité et de morbidité chez les sujets jeunes en Europe et sur le continent américain et constitue un problème majeur de santé publique en raison de sa fréquence, complexité, et gravité des séquelles, ainsi que le coût onéreux de soins de santé (Boto et al., 2009). Actuellement, les données épidémiologiques concernant le TC sont peu nombreuses et d'interprétation délicate compte tenu de la gravité de ces atteintes : du traumatisme bénin ne révélant que d'une simple consultation médicale, aux patients les plus sévères nécessitant une prise en charge en réanimation. La diversité des définitions du TC selon les analyses ainsi que les méthodes variées de collecte des données selon les pays, font qu'il est difficile de comparer les études épidémiologiques d'un pays à un autre (Abelson-Mitchell, 2008).

En Europe, l'incidence de TC est environ 235 pour 100 000 sujets hospitalisés, avec une moyenne de mortalité d'environ 15 pour 100 000 sujets hospitalisés. En France, dans la région Ile-de-France, les sujets jeunes de moins de 42 ans représentent la moitié des patients de TC grave (Mateo et al., 2010). Selon les données épidémiologiques récemment publiées aux Etats-Unis par les « Centers for Disease Control and Prevention », l'incidence annuelle de TC dans les départements d'urgence atteint 403 cas pour 100 000 sujets non hospitalisés et 85 cas pour 100 000 sujets hospitalisés. La cout financier pour la prise en charge des traumatisés crâniens a été estimée à plus de 60 milliards de dollars en 2012 en Europe (Olesen et al., 2012). À l'échelle mondiale, l'incidence des TC chez l'homme est 2 à 3 fois plus importante que chez la femme (Abelson-Mitchell, 2008).

Les causes majeures du TC sont les accidents de la circulation, les chutes et les agressions (Tagliaferri et al., 2006; Abelson-Mitchell, 2008). Chez les enfants de moins de 14 ans ainsi que chez les adultes de plus de 65 ans, la chute reste la cause majeure de TC.

La consommation d'alcool est également un facteur important de la survenue de 24 à 51% de TC (Tagliaferri et al., 2006).

Ainsi, l'ensemble des données épidémiologiques révèle une grande hétérogénéité du TC, tant dans sa distribution en fonction de l'âge et du sexe que dans ses causes. Ces données sont essentielles afin d'initier des mesures préventives appropriées et de planifier la création de services nécessaires. Elles montrent également l'importance de la recherche de cibles thérapeutiques potentielles afin de diminuer les taux de mortalité et de morbidité dus à cette pathologie.

1.2. Les lésions post-traumatiques

Le traumatisme crânien résulte le plus souvent à un choc au niveau de la boîte crânienne, ce qui entraîne des dommages au cerveau, soit directs au point de l'impact (lésions de coup) soit au côté opposé à l'impact, dus à la collision du cerveau contre la paroi osseuse à l'intérieur de la boîte crânienne (lésions de contrecoup).

Les lésions post-traumatiques peuvent être classées en fonction du moment de leur apparition (**Fig. 1**). Les lésions primaires résultent directement du choc traumatique et comprennent des lésions focales (fractures du crâne, contusions, hématomes, hémorragie intracrânienne, ..) ainsi que des lésions axonales diffuses (LADs). Ces lésions primaires vont initier des cascades physiopathologiques, telles que la neuro-inflammation, ce qui va aboutir à la constitution des lésions dites secondaires (dommages dus à l'augmentation de la pression intracrânienne ou PIC, l'ischémie cérébrale, l'œdème et l'infection) qui se développent dans les heures et les jours qui suivent l'impact et se construisent à distance du point de l'impact.

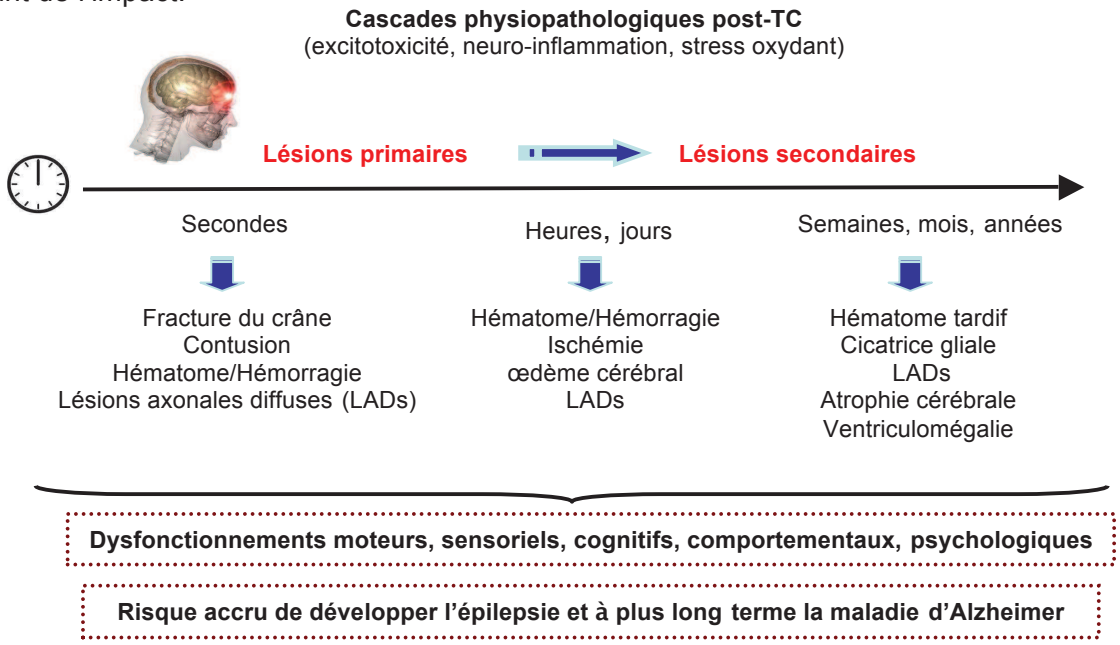


Figure 1: Schéma chronologique des conséquences aiguës et tardives post-TC.

1.2.1. Lésions primaires

Les lésions primaires sont des conséquences de destructions vasculaires, neuronales, gliales ou axonales consécutives aux déformations tissulaires encéphaliques survenant au moment de l'impact. Les lésions primaires se divisent en fonction de l'étiologie de TC en deux classes, des lésions focales et des lésions diffuses.

Lésions focales

Les lésions focales sont dues aux atteintes vasculaires consécutives à des processus de déformations et du coup/contrecoup (LaPlaca et al., 2007). La gravité de ces lésions dépend du site d'impact, de la vitesse de percussion, de la cause du traumatisme et de la présence ou non d'une déformation du crâne ou d'une fracture.

Contusion hémorragique

Elle se définit comme étant une hémorragie veineuse diffuse sur la surface du cerveau. La contusion hémorragique survient lorsqu'il y a des impacts directs au niveau du cerveau contre l'os au cours d'une force de décélération et elle peut induire des lésions au niveau des axones et des glies. Les contusions sont fréquentes dans les lobes frontaux et les lobes temporaux antérieurs. Ces contusions peuvent être placées au point de l'impact (coup) ou sur le côté opposé de la tête (contrecoup). Ils impliquent la matière grise superficielle et généralement touchent la substance blanche sous-corticale. Elles peuvent provoquer un effet de masse considérable (déplacement des structures cérébrales), et par conséquent augmenter la pression intracrânienne (PIC) et provoquer l'engagement du tronc cérébral. Les contusions cérébrales sont moins fréquentes chez les enfants par rapport aux adultes, car le crâne est relativement moins rigide chez les enfants (Cakmakie, 2009).

Hématome épidural

Les hématomes épiduraux (HED) se produisent entre le côté intérieur du crâne et la couche externe de la dure-mère. Les saignements sont plus souvent veineux qu'artériels. Ils sont observés chez 1-3% des enfants traumatisés crâniens. Les fractures du crâne sont fréquemment associées aux HED chez l'adulte plus que chez l'enfant en raison de la faible rigidité de leur crâne. Lorsque le saignement est veineux, ces hématomes évoluent lentement, et la présentation clinique de ces HED aiguës chez le jeune enfant peut être moins dramatique que chez l'adulte (Cakmakie, 2009).

Hématome sous-dural

Les hématomes sous-duraux (HSD) sont des collections de sang situées entre la couche intérieure de la dure-mère et l'arachnoïde. Elles sont plus fréquentes chez les

nourrissons et les jeunes enfants que chez les adolescents. Chez les nourrissons, les veines corticales sont plus faciles à déchirer, en raison de la faible rigidité du crâne et la souplesse du cerveau sous-jacent. Contrairement aux adultes, où l'HSD est souvent unilatéral, il est bilatéral dans 80 % des cas chez les enfants. En outre, l'HSD inter-hémisphérique est plus fréquent chez les enfants que chez les adultes. Dans le groupe d'âge pédiatrique, l'HSD est souvent vaste, avec la participation des régions temporale, frontale et pariétale et ceci est dû au manque d'adhérence dans l'espace sous-dural (Cakmakie, 2009).

Hémorragie sous-arachnoïdienne

Les hémorragies sous-arachnoïdiennes (HSA) ou méningées se définissent par la présence de sang au sein des espaces sous-arachnoïdiens. Elles sont retrouvées dans environ 35% de TC et constituent un facteur de mauvais pronostic (Wardlaw et al., 2002). Elles accompagnent souvent les lésions cérébrales et peuvent s'accompagner d'une hémorragie intra-ventriculaire (Cakmakie, 2009).

Hémorragie intra-ventriculaire

Les hémorragies intra-ventriculaires peuvent être associées aux hématomes parenchymateux, aux contusions et aux lésions axonales diffuses (LADs). Les LADs impliquant le corps calleux sont souvent associées à une hémorragie intra-ventriculaire (Cakmakie, 2009).

Lésions axonales diffuses

Les LADs constituent l'une des conséquences principales du TC qui est associé à un mauvais pronostic clinique. Les sujets traumatisés crâniens avec des LADs présentent souvent un coma immédiat, qui dure des semaines et parfois des mois après le TC (Li & Feng, 2009).

Les LADs se produisent généralement lorsque la tête est soumise à des forces de cisaillement ou de violente accélération et/ou décélération qui causent un étirement, une compression ou une torsion voire une rupture des axones et des vaisseaux. Ces lésions émergent dans les zones de juxtaposition de tissus de densité différente, comme au niveau des jonctions qui relie les matières grise et blanche (Li & Feng, 2009). Elles touchent de façon diffuse la substance blanche et le parenchyme cérébral, s'étendant de la jonction cortico-sous-corticale à la partie haute du mésencéphale (corps calleux, capsule interne, région sous-thalamique, pédoncules cérébraux). Les forces exercées par le TC à crâne fermé induisent donc, de façon directe ou indirecte une altération des axones au niveau des hémisphères cérébraux, le corps calleux et le tronc cérébral. Cette altération peut s'étendre à un gonflement ou un détachement des axones et une formation des bulbes de rétraction

dans la partie proximale des axones (Medana & Esiri, 2003; Büki & Povlishock, 2006). La partie distale de l'axone, déconnectée du corps neuronal, va ainsi progressivement suivre une dégénérescence Wallérienne, laissant place à une cicatrice gliale. L'hypoxie, les lésions cérébrales ischémiques, l'œdème cérébral et l'engagement cérébral sont souvent des complications secondaires du TC et peuvent tous jouer un rôle dans la progression des LADs.

Plusieurs techniques d'imagerie sont disponibles pour détecter les lésions axonales diffuses le plus tôt possible (Li & Feng, 2009). Parmi elles, l'utilisation du scanner (CT scan, TDM) et d'IRM a considérablement amélioré la détection des LADs. Toutefois, ces techniques sous-estiment l'ampleur des dégâts axonaux, car la plupart de ces dommages sont microscopiques. En effet, de nombreux patients souffrant de TC graves ont des modifications minimales détectées par la TDM ou l'IRM. Par conséquent, les récentes enquêtes ont cherché à appliquer des techniques d'imagerie de pointe pour la mesure des LADs. Ainsi, la DWI (*Diffusion-weighted imaging* ou séquence pondérée en diffusion) et la DTI (*Diffusion tensor imaging* ou imagerie de tenseur de diffusion) sont plus sensibles que l'IRM pour la détection des LADs. À ce jour, la technique de MRS (*Magnetic resonance spectroscopy*) présente la meilleure sensibilité pour l'identification des LADs (Li & Feng, 2009).

Malgré l'utilité et la sophistication des techniques d'imagerie, il a été préconisé de limiter leur utilisation dans la phase aiguë, en particulier pour les patients nécessitant une ventilation et des moniteurs cardiaques. Il est donc intéressant de rechercher des marqueurs biochimiques spécifiques et sensibles pour détecter les lésions cérébrales. Parmi eux, deux biomarqueurs sont très étudiés dans le sérum et dans le LCR (Liquide Céphalo-Rachidien), à savoir la protéine S-100B et la NSE (neuron-specific enolase). La S-100B est une calciprotéine de la famille des protéines de liaison, principalement localisée dans les cellules gliales et les cellules de Schwann, avec donc une spécificité élevée pour la substance blanche. En revanche, la NSE, une enzyme de la glycolyse (enolase), se trouve principalement dans le cytoplasme des neurones et des cellules endocrines différenciées. Les taux de ces deux biomarqueurs sont élevés dans le sérum et le LCR des patients traumatisés crâniens. Notamment, chez les patients avec des LADs, les concentrations de ces deux protéines ont été trouvées maximales au 3ème jour post-TC.

L'immunomarquage du précurseur de protéine ß-amyloïde (ß-APP) est la meilleure technique pour démontrer la présence des LADs dans les conditions expérimentales et forensiques (médecine légale). Les LADs peuvent être détectées par l'accumulation axonale du ß-APP, dans les heures qui suivent le TC chez les rongeurs (Stone et al., 2000) et dans des échantillons de cerveau post-mortem des patients traumatisés crâniens (Gentleman et al., 1993). Par conséquent, l'immunomarquage axonal du ß-APP est considéré comme le

meilleur marqueur des LADs (Gentleman et al., 1993; Stone et al., 2000). Le ß-APP est une glycoprotéine transmembranaire exprimée de façon ubiquitaire et synthétisée dans le cytoplasme des neurones par l'appareil de Golgi (Selkoe et al., 1994). Il se déplace le long des axones vers la synapse par un transport antérograde axoplasmique rapide et c'est la raison pour laquelle il s'accumule dans les sites où le transport axonal est affecté et plus précisément, dans les bulbes de rétraction des axones endommagés (Medana & Esiri, 2003).

1.2.2. Lésions secondaires

Les lésions secondaires résultent de l'aggravation des lésions primaires par des facteurs d'agression cérébrale secondaire d'origine centrale ou systémique **(Fig. 1**). Ces lésions secondaires se développent plus tardivement dans les semaines ou les mois qui suivent le TC et se conjuguent le plus souvent, entraînant une ischémie cérébrale. L'hypoxie, l'hypercapnie, l'hypotension artérielle, l'hypertension intracrânienne, ainsi que certains troubles électrolytiques et métaboliques constituent autant de facteurs qui contribuent au développement des lésions secondaires. L'ensemble de lésions primaires et secondaires peuvent engendrer tardivement une atrophie cérébrale accompagnée d'une cicatrisation gliale.

L'hypertension intracrânienne (HIC) est due à un conflit d'espace entre la boîte crânienne close et son contenu c'est-à-dire le volume intracrânien. Le volume intracrânien qui représente 1000 à 1400 ml chez l'homme, peut-être distribué en trois compartiments : le parenchyme cérébral (80 %), le LCR (10 à 15 %) et le volume sanguin cérébral (VSC) (5 à 10 %) (Han & Backous, 2005). La pression intracrânienne (PIC), résultant d'un état d'équilibre entre ces trois compartiments, est la pression hydrostatique régnant dans le LCR au niveau des ventricules cérébraux. Les valeurs normales de la PIC sont comprises entre 5 et 15 mmHg chez l'adulte sain au repos. Il est généralement admis que des valeurs supérieures à 20 mmHg de façon prolongée suite à un TC définissent une HIC. L'HIC peut résulter de l'augmentation de volume de l'un des trois secteurs de façon isolée ou associée et de la perte d'efficacité des mécanismes de compensation. De plus, elle dépend de l'âge de patient.

L'HIC est le plus souvent en rapport avec un hématome intracérébral, un œdème cérébral ou une vasoplégie. La corrélation entre l'HIC et le mauvais pronostic des patients est liée, d'une part, à la réduction de la pression de la perfusion cérébrale (PPC) par augmentation de la PIC et d'autre part, au risque de déplacement des structures. Une HIC non contrôlée peut notamment se compliquer d'engagements cérébraux (résultant de la compression de structures cérébrales par déplacement) et/ou de lésions ischémiques parfois

secondairement hémorragiques. La souffrance cérébrale induite est au début fonctionnelle, liée à la compression, et potentiellement réversible, mais secondairement peuvent apparaître des lésions ischémiques parfois irréversibles. Donc, l'HIC est un problème majeur observé chez les patients traumatisés crâniens graves, associée à une mortalité supérieure à 90 % et doit donc être prévenue et rapidement traitée (Hlatky et al., 2004).

Lorsque les voies d'écoulement du LCR sont bloquées par du sang (caillot sanguin dans le 4ème ventricule) ou par une lésion, le LCR ne circule plus correctement et entraîne une dilatation des ventricules cérébraux, conduisant à une **hydrocéphalie**. Elle se manifeste par une détérioration de l'état du patient, à savoir une somnolence, une lenteur du mouvement et de la pensé, une tendance à tomber en arrière, une marche à petits pas et une incontinence urinaire. Le diagnostic est confirmé par la TDM cérébrale. Elle peut être corrigée par une ponction lombaire et, dans un second temps, par la pose d'une valve de dérivation.

L'œdème cérébral (OC) correspond à l'accumulation de fluide et d'électrolytes au sein du parenchyme cérébral, associé à un élargissement volumétrique cérébral (Unterberg et al.,2004). Dans les heures et les jours qui suivent le TC, un œdème se développe à partir des zones de destruction cellulaire. Il peut être associé à des lésions de la barrière hémato-encéphalique (BHE), des hémorragies intra-parenchymateuses et des phénomènes ischémiques. Cet œdème cérébral est globalement classé en deux types principaux, l'œdème cytotoxique et l'œdème vasogénique, en fonction de l'origine du liquide acquis et du mécanisme de sa formation.

L'œdème cytotoxique (ou œdème cellulaire) est défini comme un gonflement des composants cellulaires dans le cerveau et surtout au niveau des astrocytes, dû aux perturbations métaboliques, induites par l'hypoxie, l'ischémie et le TC (Allain et al., 1987). Au cours de l'œdème cytotoxique, la perméabilité vasculaire reste relativement inchangée. Tous les éléments cellulaires (neurones, cellules gliales et les cellules endothéliales) prennent du liquide et se gonflent sans contribuer à une augmentation du volume de cerveau. Un simple passage de l'eau et des électrolytes (Na+, K+, ..) du compartiment extracellulaire vers le compartiment intracellulaire, ainsi qu'une diminution des liquides extracellulaires équivalente à cette augmentation intracellulaire sont observés. La pénétration exagérée de l'eau dans les cellules est liée à un dysfonctionnement des transports hydro-ioniques membranaires et à l'existence d'un gradient osmotique modifié au profit d'une osmolarité intracellulaire exagérée. L'œdème cytotoxique peut être visualisé de manière qualitative par microscopie électronique en post-mortem. On observe alors un cytoplasme pâle et rempli d'eau et cet œdème se distingue de l'hypertrophie observée dans l'astrogliose réactive (Bauer et al.,

1999). Il peut être aussi visualisé par la séquence d'IRM qui est sensible au déplacement des molécules d'eau (Lescot et al., 2010a).

Alternativement, **l'œdème vasogénique** est induit par une rupture de la BHE où les jonctions serrées jouent un rôle de filtre dans les conditions physiologiques. En effet, la BHE est localisée anatomiquement à l'interface entre le sang et le tissu cérébral, et contrôle les échanges entre le sang et le parenchyme cérébral. Elle est une association complexe et fusionnelle entre les cellules endothéliales, les péricytes, les macrophages périvasculaires, les pieds astrocytaires et la membrane basale (**Figure 2**). L'efficacité de cette barrière tient pour l'essentiel à la particularité des cellules endothéliales cérébrales d'être jointes par des jonctions serrées, rendues étanches par la fusion de leurs membranes externes. Le passage des substances au travers de la BHE est principalement de nature transcellulaire, et il est déterminé par la solubilité lipidique et le poids moléculaire de ces substances. Les échanges entre le parenchyme et la lumière des capillaires passent principalement par des systèmes de transport facilité. Le transport transmembranaire de l'eau est assuré par des canaux de la famille des aquaporines (AQPs) (Papadopoulos & Verkman, 2007).

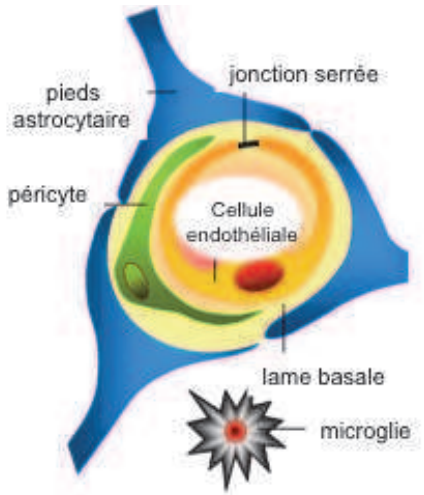


Figure 2 : Schéma de la composition cellulaire de la BHE (adapté d'Abott et al., 2010).

L'organisation particulière de la BHE est à l'origine d'une régulation très fine de la perméabilité aux solutés et de la migration cellulaire à travers l'endothélium cérébral, tandis que son dysfonctionnement est, entre autres, associé à la formation de l'œdème cérébral post-traumatique.

Le traumatisme crânien entraîne une augmentation accrue et anormale de la perméabilité de la BHE, qui se traduit par une entrée passive des protéines sériques dans le compartiment intracérébral (Hartl et al., 1997). Notamment, une augmentation post-TC de

l'interleukine-1β (IL-1β) et de la métalloprotéase de la matrice -9 (MMP-9) semble jouer un rôle crucial dans l'ouverture de la BHE (Shigemori et al., 2006). Le stress oxydant constitue un autre mécanisme qui pourrait jouer un rôle important dans la formation d'un œdème cérébral vasogénique *via* l'activation des MMPs (Haorah et al., 2007). Par conséquence, cette altération des protéines des jonctions serrées aboutit à une augmentation de la perméabilité de la BHE aux macroconstituants plasmatiques et à la circulation des fluides des espaces intra- aux extra-vasculaires à travers les jonctions serrées altérées (Payen et al., 2003).

Puisque le cerveau est entouré et retenu dans la boîte crânienne close, la capacité du cerveau à assimiler cet œdème est limité, ce qui entraîne une augmentation de la PIC (Bauer et al., 1999). Des expériences *in vivo* qui consiste à injecter en i.v. des colorants comme le bleu Evans qui se fixe à l'albumine ou de l'albumine radiomarquée permettent de démontrer clairement l'origine plasmatique de l'OC vasogénique. L'évolution spontanée de l'œdème vasogénique se fait par sa résorption, débutant vers la fin de la première semaine post-traumatique. Cet œdème est plus fréquent chez l'homme que l'œdème cytotoxique et peut être diagnostiqué par l'IRM.

L'**ischémie cérébrale (IC)** touche environ 90 % des TC grave (Graham et al., 1989) et constitue l'un des dommages cérébraux les plus rencontrés suite à un TC. L'IC se caractérise par une chute du débit sanguin cérébral (DSC). Dans les conditions physiologiques, le DSC est de 50 à 55 ml /100 g/ minute. Lors d'un TC grave, on observe une chute du DSC jusqu'à 18 ml/ 100 g/ minute dans les 6 premières heures chez un tiers des patients, ce qui conduit à une libération excessive des acides aminés excitateurs tels que le glutamate et par conséquence à une mort cellulaire excitotoxique (Bissonnette, 2000). De plus, cette chute de DSC après un TC grave est accompagnée d'une diminution de l'oxygène et du glucose, qui sont des substrats énergétiques indispensables pour la viabilité du cerveau. Pendant cette phase précoce d'hypoperfusion cérébrale, le patient est particulièrement exposé au risque d'ischémie en cas de réduction de la PPC par hypotension ou vasoconstriction artérielle cérébrale ainsi qu'en cas d'hypoxie et/ou d'anémie.

À partir de la 8ème heure et ce, jusqu'à 24h après le TC, cette chute diminue de façon significative, en corrélation avec le déficit moteur (Bouma et al., 1991). La persistance d'un DSC bas au-delà des premières 24 heures est associée à un mauvais pronostic clinique (Kelly et al., 1997). La région la plus souvent touchée par les dommages ischémiques est l'hippocampe (McIntosh et al., 1996). L'ischémie est plus souvent focale (touchant un territoire déterminé) que globale (touchant tout l'encéphale).

Le **vasospasme** est observé chez 30 % des patients (Werner & Engelhard, 2007). Il est plus fréquent chez les patients souffrant d'hémorragie sous-arachnoïdienne importante. Les vaisseaux proximaux de la surface pie-mérienne et le polygone de Willis sont fréquemment en cause. Un vasospasme chronique peut apparaître le jour du trauma ou plusieurs semaines après une hémorragie sous-arachnoïdienne. Une hypoperfusion cérébrale est mise en évidence chez 50% de patients ayant un vasospasme en développement.

Les **engagements cérébraux** sont causés par un déplacement mécanique du cerveau, du LCR, et des vaisseaux cérébraux à travers un orifice, le plus souvent le trou occipital. L'utilisation du scanner (CT-scan) ou l'IRM permet de différencier les différents types d'engagement cérébral comme la hernie subfalcine, la hernie transtentorielle (descendante et rarement ascendante), la hernie transphénoïdale (descendante et ascendante) et l'engagement des amygdales cérébelleuses. Par imagerie, on peut reconnaître la dilatation du ventricule controlatéral, la compression de la citerne basale et du parenchyme cérébral. La souffrance cérébrale induite par ces engagements est au début fonctionnelle, liée à la compression, et potentiellement réversible, mais secondairement vont apparaître des lésions ischémiques réversibles ou non.

1.3. Les atteintes comportementales

Le TC entraîne des blessures physiques, mais également des perturbations cognitives, motrices, sensorielles et psychiques. On peut ainsi observer des troubles du comportement et de la personnalité, des perturbations des actes dirigés vers un but (conduites verbales, difficultés d'organisation, de planification, d'initiative,…). Cette symptomatologie constitue un obstacle majeur à la réinsertion sociale et professionnelle. A ces dysfonctionnements comportementaux s'ajoute également le risque de développer une épilepsie post-traumatique et/ou une pathologie neurodégénérative comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson. Ces séquelles sont extrêmement variables dans leur gravité, leur aspect, leur moment d'apparition et leur durée en fonction de la sévérité du TC.

Les lobes frontaux constituent l'une des régions les moins connues du cerveau dont les structures sont associées aux fonctions les plus nobles, comme la conscience et l'intention, ainsi qu'aux différentes psychopathologies (Stuss et al., 2011 ; Ray et al., 2012). Les dommages aux régions frontales post-TC peuvent ainsi affecter des fonctions aussi diverses que le mouvement, la cognition, l'olfaction et la personnalité. Cette grande diversité est liée au fait que le cortex frontal entretient des liens étroits avec les systèmes limbique, moteur et sensoriel et contribue à leur régulation.

1.3.1. Dysfonctionnement cognitif

Les troubles cognitifs chez les patients traumatisés crâniens peuvent être éprouvés immédiatement après la lésion initiale et peuvent évoluer au cours des mois, voire des années après le TC (Kinnunen et al., 2010 ; Skandsen et al., 2010 ; Dockree et al., 2011 ; Spikman et al., 2012). Ces déficits représentent l'une des principales séquelles cognitives des TC sévères et conditionnent, en grande partie, le pronostic ultérieur et en particulier la réinsertion sociale, familiale et professionnelle.

Les **troubles de la mémoire** constituent probablement le déficit cognitif le plus fréquent des traumatisés crâniens sévères (Belmont et al., 2006). Il est habituel de distinguer deux formes bien différentes, l'amnésie post-traumatique et les déficits persistants de la mémoire. Le premier correspond à la période durant laquelle le patient au décours du traumatisme et du coma, est confus, désorienté, incapable de mémoriser des informations nouvelles et souffre d'une amnésie rétrograde. Ces troubles régressent progressivement et la durée de la phase d'amnésie post-traumatique a une valeur pronostique majeure et largement démontrée. La sortie de la phase d'amnésie post-traumatique ne veut pas dire que le fonctionnement mnésique est redevenu normal, au contraire, les troubles persistants de la mémoire sont extrêmement fréquents. Ils sont parfois reconnus par le patient lui-même sinon au moins par son entourage, et habituellement mis en évidence par les tests neuropsychologiques. Ces troubles respectent la mémoire à court terme. En revanche, la mémoire à long terme est déficitaire dans toutes ces modalités, qu'elle soit verbale, visuelle, en rappel comme en reconnaissance. Ces troubles sont de durée prolongée. Ils persistent de nombreuses années après le TC dans les cas les plus graves et leur impact péjoratif sur la réinsertion notamment professionnelle a été bien démontré.

En effet, il existe deux différents processus de mémoire : l'apprentissage et la mémorisation. L'apprentissage est une modification permanente du comportement qui marque une augmentation de connaissance, de compréhension grâce aux souvenirs mémorisés. En revanche, la mémoire est le fruit de cet apprentissage. Différents types de mémoire peuvent être distinguées **(Fig. 3):**

- La mémoire sensorielle est automatique, résulte de nos capacités perceptives, et s'évanouie généralement en moins d'une seconde.
- La mémoire à court terme permet de garder en mémoire une information pendant environ moins d'une minute et de pouvoir la restituer pendant ce délai. Elle est utilisée dans une tâche qui consiste à restituer une série d'éléments qui viennent d'être énoncés.
- La mémoire à long terme, quant à elle, peut être divisée en deux grands types de mémoire, la déclarative (ou explicite) et la non-déclarative (ou implicite). La mémoire

déclarative englobe l'ensemble des informations dont le sujet a une connaissance explicite, qu'il peut rappeler à sa conscience. Ce système de stockage peut être à son tour divisé en deux catégories : la mémoire épisodique (événements autobiographiques) et la mémoire sémantique (le savoir, la connaissance). La mémoire non-déclarative rassemble l'ensemble des procédures de pensée acquises par un individu qui facilitent par la suite ses nouvelles expériences motrices, perceptives ou cognitives, sans recours à un rappel intentionnel (Squire et al., 2004).

La mémoire utilise ainsi de très nombreuses régions dans le cerveau. Le diencéphale (thalamus et hypothalamus) joue un rôle important dans le processus de mémoire implicite, alors que le système limbique (hippocampe, noyau amygdalien région septale, gyrus cingulaire, circonvolution parahippocampique) est impliqué dans la mémoire déclarative. L'hippocampe, les lobes temporaux, de même que les structures du système limbique qui leur sont reliées, sont essentiels à la consolidation de la mémoire à long terme (Squire et al., 2004).

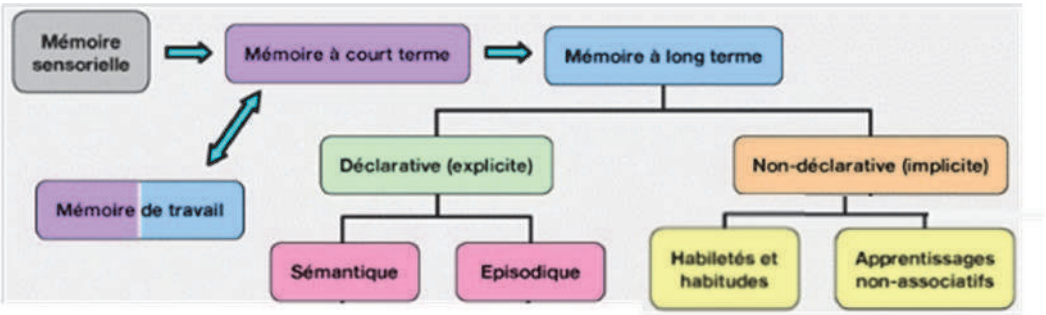


Figure 3: Les différents types de mémoire.

Les **troubles de fonctions exécutives** sont particulièrement fréquents suite à un TC et jouent un rôle majeur péjoratif dans la réinsertion professionnelle. Il s'agit à la fois de difficultés d'initiatives, de modifications dans l'organisation des stratégies et de difficultés de conceptualisation (Mattson et Levin, 1990). L'adaptation dans les situations nouvelles et l'autocorrection des comportements est limitée. Le patient a donc de nombreuses difficultés dans la vie quotidienne (faire une liste de courses, gérer son budget…) et doit être stimulé et supervisé. Le patient peut être désinhibé ou ne prendre aucune initiative, sembler indifférent (apragmatisme) et manifester des troubles du caractère, de l'humeur, et de l'anxiété. Ces modifications peuvent correspondre à des réactions psychologiques et/ou des atteintes du lobe frontal et concernent le 50 à 70 % des TC graves (Belmont et al., 2006 ; Stuss et al., 2011). Une perturbation des mécanismes d'inhibition ainsi que de la flexibilité mentale a également été retrouvée. La mise en évidence de ces perturbations des fonctions exécutives

est toutefois difficile du fait du manque de sensibilité et de spécificité des tests neuropsychologiques traditionnels.

Les **difficultés de concentration et d'attention** sont signalées par la majorité des patients et par leur famille (entre 30 à 50% des traumatisés crâniens sévères) (Azouvi et al., 1998) et se caractérisent par une incapacité à soutenir son attention pendant une durée prolongée dans le but de terminer une tâche ainsi qu'une grande sensibilité aux stimuli provoquant la déconcentration, et une difficulté importante à s'organiser dans un travail (Mathias et al., 2007). Chez l'enfant, le trouble d'attention est souvent accompagné d'une agitation motrice ou hyperactivité (ou ADHD- *Attention Deficit and Hyperactivity Disorder*) (Eme et al., 2012).

En outre, certaines victimes de TC présentent des **troubles de communication**, comme des troubles du langage (aphasie) qui peuvent être réversibles, ou fréquemment des difficultés articulatoires (dysarthrie) dont la récupération est généralement mauvaise (Basso, 1995 ; Lundgren et al., 2010). Ces troubles peuvent aussi se présenter dans un discours désorganisé, des commentaires inappropriés, un humour mal placé, des familiarités excessives et des réponses tardives. Des troubles de la compétence communicative et de la structuration du discours en rapport avec un syndrome frontal sont également fréquemment retrouvés et peuvent rendre le discours de ces patients fragmenté, insignifiant et incohérent.

1.3.2. Dysfonctionnement moteur

Le ralentissement moteur est le trouble le plus fréquemment rencontré suite à un TC sévère ou léger en phase initiale. Il se présente comme une diminution de la vitesse de traitement des informations, mais également de la vitesse de réaction motrice.

La **fatigue** est la conséquence d'une capacité diminuée pour effectuer une activité physique et/ou mentale, due à un déséquilibre dans la disponibilité, l'utilisation, ou la restauration des ressources physiologiques ou psychologiques requises pour exécuter l'activité. La fatigue est fréquemment évoquée par les patients victimes d'un TC et touche 45 à 73% d'entre eux (Belmont et al., 2006).

L'hyperactivité est un symptôme neurologique souvent accompagné d'une impulsivité, désinhibition, agitation et/ou akathisie (Van der Naalt et al., 2000; Kim, 2002). Le mécanisme de ce dysfonctionnement post-TC reste encore mal connu. La lésion d'au moins 12 différentes régions du cerveau peut augmenter l'activité locomotrice. La plupart d'entre elles sont disposées le long d'un circuit spécifique dans le cerveau. En fait, des études précliniques ont montré qu'une lésion des structures comme les bulbes olfactifs, le cortex

frontopariétal, l'hippocampe, le septum, les noyaux thalamiques réticulaires, le striatum, l'amygdale, la substance noire et le cervelet peut augmenter l'activité locomotrice (Viaggiano, 2008).

1.3.3. Dysfonctionnement sensoriel

Il est admis que l'importance des lésions olfactives à l'origine d'un **dysfonctionnement olfactif** est liée au site de l'impact et à la sévérité du TC. Différents types de dysfonctionnement olfactif peuvent survenir post-TC, tels que la hyposmie/microsmie, définie comme une diminution de la sensibilité olfactive, l'anosmie, ou l'absence de fonction olfactive, et la parosmie, qui se traduit par une perturbation de la perception des odeurs (Doty et al., 1997).

Trois mécanismes peuvent expliquer les troubles olfactifs après un traumatisme crânien : des lésions des cavités nasales et/ou des sinus (déplacement de la paroi nasale), des lésions du nerf olfactif ou des centres olfactifs centraux (Biacabe et al., 2000). L'atteinte directe des bulbes olfactifs ou des filets nerveux olfactifs est considérée comme prédominante dans les anosmies post-TC. Ces atteintes résultent le plus souvent du cisaillement des filets nerveux olfactifs consécutifs aux déplacements importants de l'encéphale dans la boîte crânienne.

L'importance des troubles olfactifs est corrélée au site et à la sévérité du traumatisme et au site du choc. Les traumatismes frontaux et occipitaux sont plus fréquemment responsables de baisses sévères des capacités olfactives que les traumatismes temporaux ou pariétaux (Doty et al., 1997 ; Fujii et al., 2002). En outre, les atteintes du système olfactif sont peu fréquentes dans les traumatismes mineurs tandis que cette fréquence augmente considérablement dans les traumatismes sévères (25 à 30 %) (Frontin et al., 2010). L'estimation de la prévalence des troubles olfactifs post-traumatiques reste difficile à évaluer car dans la plupart de ces études, elle résulte d'observations rétrospectives, et n'est pas toujours fondée sur l'utilisation de tests olfactifs mais plutôt sur les plaintes subjectives des patients.

L'anosmie peut être due à une contusion corticale localisée ou à une compression par un hématome des centres olfactifs centraux. Les lésions corticales se traduisent essentiellement par des difficultés de reconnaissance ou de mémorisation des odeurs alors que les seuils olfactifs peuvent être normaux. Les lésions prédominant sur la partie médiale du lobe frontal et la partie antérieure des lobes temporaux génèrent des problèmes d'identification des odeurs. Si des neurones olfactifs situés dans le cortex piriforme antérieur, l'amygdale ou le lobe temporal sont lésés, les difficultés de reconnaissance peuvent s'accompagner d'une perte de la mémoire des odeurs.

Une amélioration de l'état cortical ou une résorption de l'hématome compressif peuvent induire une régression des troubles olfactifs. Néanmoins, le degré de réversibilité d'un trouble d'odorat après un TC n'est pas bien évalué. Toutefois, en cas de déficits neurosensoriels, la récupération peut survenir 12 à 18 mois après le TC (Reiter et al., 2004).

Le dysfonctionnement olfactif est souvent accompagné d'un **dysfonctionnement gustatif** post-TC (Reiter et al., 2004). Les examens gustatifs chez les patients sont loin d'être réalisés en routine. Par conséquent, la plupart des données sur les troubles post-TC du goût sont des rapports de cas isolé décrivant principalement les changements qualitatifs après le TC. Puisque les déficits quantitatifs de goût (agueusie, hypogeusie) sont souvent inaperçus par les patients, leur incidence reste largement inconnue. Ce manque de données cliniques fiables est dû en partie à l'absence des dispositifs simples, reproductibles et rapides pour évaluer le goût après le TC (Landis & Lacroix, 2006). Toutefois, l'altération gustative post-TC peut survenir à la suite d'une lésion directe à la langue, des lésions aux nerfs crâniens VII ou IX, d'une contusion cérébrale ou d'une hémorragie (Reiter et al., 2004).

Le TC peut également induire un **déficit visuel**, due à une perturbation de la voie visuelle afférente de la rétine vers les centres visuels du cerveau (Atkins et al., 2008 ; Cockerham et al., 2009). En fait, les dommages directs de l'œil et de l'orbite, les lésions traumatiques optiques, les fistules carotides caverneuses, une dysfonction des nerfs crâniens III, IV ou VI ainsi que les dommages des voies visuelles intracrâniennes sont des causes classiques de la perte visuelle après le TC.

Les lésions traumatiques du nerf optique peuvent causer la cécité (aveuglement) sévère, avec une perte de la vision centrale ainsi que du champ visuel périphérique. Les traumatismes crâniens sévères peuvent diviser le chiasma optique et produire une hémianopsie bitemporale. Les impacts pénétrants peuvent également affecter des structures plus postérieures le long de la voie visuelle afférente, généralement au niveau du cortex occipital. Le TC sévère peut également affecter les tractus de la substance blanche qui constituent les radiations optiques, bien que ce type de lésion soit difficile à identifier par l'examen clinique seul. Enfin, les dommages du système vestibulaire périphérique ou central, y compris le tronc cérébral, le cortex et le cervelet, peuvent provoquer un nystagmus, une vision floue, ou une diplopie (Atkins et al., 2008 ; Kelts et al., 2010).

Les lésions traumatiques optiques du système nerveux ne sont pas réversibles par les thérapies actuelles. L'imagerie du tenseur de diffusion a la possibilité d'analyser la physiologie des voies afférentes visuelles (Kelts et al., 2010).

En ce qui concerne les autres dysfonctionnements sensoriels, Sarno et collaborateurs (2003) ont montré que les seuils **auditifs** et **tactiles** sont parfois altérés chez les traumatisés crâniens.

1.3.4. Dysfonctionnement psychique

Les **perturbations de la personnalité** post-TC peuvent être témoignées par les patients ou leurs familles. Elles peuvent retentir fortement sur l'équilibre familial et sont source, comme cela a été démontré par Brooks & McKinlay (1983), d'une sensation de fardeau importante pour l'entourage familial. Il peut s'agir soit de modification sur le versant de l'inhibition avec un apragmatisme et un manque d'initiative, soit sur le versant de la désinhibition avec une impulsivité, une intolérance aux contrariétés et aux frustrations. Ces difficultés peuvent même aboutir à des comportements anti-sociaux avec parfois une agitation, une agressivité, qui peut nécessiter un traitement spécifique.

En outre, environ 73% des patients traumatisés ont des **troubles du sommeil**, mais qui ne sont pas nettement liés à la sévérité du TC (Riggio & Wong, 2009). Ces insomnies pourraient être à l'origine de la fatigue post-TC, cependant certains patients fatigués n'ont pas de troubles du sommeil et tous les patients ayant des troubles du sommeil n'ont pas nécessairement des problèmes de fatigue (Belmont et al., 2006).

Il a été également décrit que le TC induit des **troubles d'anxiété** qui ne sont pas directement associés à l'intensité du TC (Rodgers et al., 2007). Le syndrome de stress post-traumatique (SSPT), le trouble d'anxiété généralisée (TAG) et les attaques de panique sont parmi les plus courants (Rodgers et al., 2007). Il a été estimé qu'environ 10% des patients traumatisés crâniens souffrent de TAG (Nicholl et al., 2009). Malgré le grand nombre d'études menées sur les troubles neuropsychologiques post-TC, les mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces conséquences ne sont pas élucidés. Malesh et coll. (2010) ont suggéré que la cause primaire de troubles anxieux et de dépression post-TC est la perturbation des réseaux neuronaux et du taux des neurotransmetteurs tels que la sérotonine et la norépinephrine.

La **dépression majeure** est l'une des séquelles comportementales la plus fréquemment rapportée après un TC. La prévalence réelle varie d'une étude à l'autre en fonction de la méthodologie, mais sa prévalence est d'environ 25% à 40% chez les victimes d'un TC modéré à sévère (Riggio & Wong, 2009). Une étude multicentrique prospective a rapporté la fatigue (29%), la perte d'attention (28%), la colère et l'irritabilité (28%), et la rumination (25%) comme les symptômes dépressifs les plus fréquemment observés chez les patients de TC modéré à sévère (Seel et al., 2003). Vingt-sept pour cent des patients traumatisés crâniens répondaient aux critères d'une dépression majeure, avec des sentiments de désespoir et de dévalorisation. Il est intéressant de souligner aussi que la

présence des troubles mentaux augmente d'un facteur de 10 le risque de suicide (Wasserman et al., 2008).

1.3.5. Causes des dysfonctionnements neurologiques post-TC

Plusieurs hypothèses ont été évoquées afin d'expliquer l'origine de ces troubles cognitifs, moteurs et psychiques. Parmi les différentes hypothèses, nous nous focaliserons sur les théories des atteintes des systèmes de la neurotransmission/neuromodulation qui sont principalement dues aux lésions post-TC à différents niveaux de cerveau.

Plusieurs études ont montré des altérations régionales post-TC de la neurotransmission cholinergique, dopaminergique, noradrénergique, glutamatérgique et GABAérgique. Il semble que l'altération d'un de ces systèmes peut entraîner des troubles cognitifs (notamment l'éveil, l'attention, la mémoire et les fonctions exécutives) voire augmenter ou diminuer l'activité locomotrice. Par exemple, l'hyperactivité peut être induite par une augmentation des niveaux de la dopamine (DA) ou de l'histamine, ou après l'inhibition du système cholinergique.

Théorie cholinergique : Les projections corticales des voies cholinergiques chez l'homme se font *via* la substance blanche pour innerver les structures cérébrales médianes, et à travers une distribution latérale pour innerver le cortex frontal dorsolatéral. Après un choc mécanique, ces neurones cholinergiques et leurs projections ascendantes sont particulièrement vulnérables et susceptibles d'être endommagées (Bennouna et al., 2007) .

Chez les traumatisés crâniens, il y a une diminution significative du niveau de l'acétylcholine transférase (marqueur de la fonction cholinergique) dans l'ensemble des zones corticales. Cette conséquence pourrait être associée aux séquelles cognitives et psychiques post-TC (Bennouna et al., 2007) .

Théorie dopaminérgique : La DA représente un système unique de signalisation dans le SNC du fait de son rôle neurotransmetteur et neuromodulateur. En outre, les récepteurs dopaminergiques sont abondamment exprimés dans les zones cérébrales affectées par le TC, telles que le cortex frontal et le striatum, qui sont des zones importantes pour les fonctions cognitives et motrices.

Les voies DAérgiques ascendantes dans le SNC peuvent être divisées en deux voies: la voie nigro-striée et la voie mésocorticolimbique. Les projections de la voie mésocorticolimbique semblent être impliquées dans la consolidation de la mémoire, la motivation et la dépendance. La voie nigro-striée est principalement associée aux mouvements volontaires, mais elle joue également un rôle dans l'apprentissage spatial et la mémoire (Mura et al., 2003). Il a été constaté que le système DAérgique est altéré chez les

patients traumatisés crâniens. En outre, l'augmentation de l'activité locomotrice peut être due à l'action des systèmes stimulants sous-corticaux comme la DA mais aussi à la noradrénaline (Fujinaka et al., 2003; Reid & Hamm, 2008; Viggiano, 2008).

Théorie glutamatérgique et GABAérgique : Le rôle excitotoxique du glutamate après le TC a été bien établi. La concentration cérébrale de glutamate augmente considérablement chez l'homme (Baker et al., 1993; Bullock et al., 1998) ainsi que chez les animaux (Faden et al., 1989) suite à un TC. D'autres études indiquent que les récepteurs de glutamate sont impliquées dans les processus lésionnels secondaires (Choi, 1988; Fei et al., 2007).

Le TC peut provoquer une interruption des projections excitatrices glutamatérgiques cortico-striatales et des projections inhibitrices GABAérgiques striatales (Bales et al., 2009).

1.4. Les cascades physiopathologiques après un TC

Bien que les lésions primaires post-TC soient irréversibles, les lésions secondaires pourraient être réversibles car ce sont souvent des processus retardés offrant ainsi une fenêtre d'intervention thérapeutique. Les lésions secondaires sont des cascades de réactions biologiques multiples, parallèles et interdépendantes causées par les lésions primaires. En général, les séquelles de dommages des tissus nerveux se perpétuent par l'excitotoxicité (résulte d'un excès de libération du neurotransmetteur excitateur, le glutamate), la neuro-inflammation (l'invasion du site de la lésion par les microglies et la libération des cytokines pro-inflammatoires), le stress oxydant et la mort neuronale de type nécrotique ou apoptotique. Ces processus physiopathologiques font l'objet de nombreuses recherches expérimentales sur des modèles animaux, en culture cellulaire ou tissulaire, ainsi que des recherches cliniques dans le but de développer des stratégies thérapeutiques rationnelles (pour revues : Werner & Engelhard, 2007; Park et al., 2008).

1.4.1. L'excitotoxicité

À ce jour, Il est connu que l'épisode traumatique peut être associé à une excitotoxicité, impliquant la libération d'acides aminés excitateurs (AAE), tels que le glutamate, qui peuvent déclencher plusieurs altérations subcellulaires *via* des afflux de Na^+ et de Ca^{2+} vers l'espace intracellulaire. Notamment par la technique de microdialyse, il a été montré que le niveau post-TC de glutamate était augmenté de façon précoce et progressive à la fois chez les patients et dans les modèles expérimentaux (Farkas & Povlishock, 2007).

Le défaut des pompes ioniques présynaptiques et de l'exocytose mise en jeu par le Ca^{2+} contribue en grande partie à la libération initiale de glutamate dépendante de la dépolarisation neuronale. Cet excès de glutamate contribue à l'augmentation toxique des

concentrations de Ca^{2+} intracellulaire. Cependant, des théories plus récentes suggèrent que l'excitotoxicité puisse se produire à cause des modifications des récepteurs post-synaptiques du glutamate induites par le TC et le fait que la toxicité calcique est fortement liée à la localisation de l'afflux de Ca^{2+}. Les récepteurs du glutamate peuvent être classés en trois types de récepteurs, sur la base de leur réactivité aux agonistes chimiques. Ceux-ci sont les récepteurs AMPA (acide a-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique), les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et les récepteurs métabotropiques au glutamate (Park et al., 2008).

L'activation du récepteur de type AMPA entraîne l'entrée d'ions Na^+ dans la cellule et la sortie de K^+ conduisant à une dépolarisation membranaire qui favorise l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants et l'entrée de Ca^{2+}. Le récepteur de type NMDA permet l'entrée massive d'ions Na^+ et Ca^{2+} dans la cellule. L'activation des récepteurs métabotropiques conduit à la libération de Ca^{2+}. L'entrée massive de Ca^{2+} *via* les récepteurs NMDA augmente considérablement le niveau intracellulaire de Ca^{2+} libre. Cette augmentation peut conduire à l'activation des enzymes Ca^{2+}-dépendantes comme les calpaïnes, les phosphatases, les protéines kinases et les NO synthases (NOS), les caspases et les endonucléases, les lipases telles que la phospholipase A2 (PLA2), la phospholipase C et la cyclo-oxygénase (COX), ainsi que des enzymes impliquées dans la mort cellulaire nécrotique ou apoptotique (Kermer et al., 1999; Park et al., 2008; Besson, 2009).

1.4.2. Le stress oxydant

Les radicaux libres (RLs) sont des espèces hautement réactives produites principalement lors de la respiration et du métabolisme cellulaire. Lors d'une production excessive des RLs, la capacité de défense anti-oxydante se trouve dépassée et/ou inhibée. Ce déséquilibre entre la production cellulaire et la dégradation naturelle des RLs contribue à la pathogenèse des lésions sévères du SNC. Ainsi, le stress oxydant joue un rôle majeur dans la survenue des lésions traumatiques secondaires. Après une lésion cérébrale, la surproduction d'espèces réactives d'oxygène (ERO) et d'espèces réactives d'azote (ERA) conduit à des lésions tissulaires *via* l'implication de plusieurs voies de signalisation cellulaire et moléculaire (Xiong et al., 2009).

Les RLs peuvent être synthétisés à plusieurs niveaux : 1) par les mitochondries suite à l'augmentation des concentrations intracellulaires de Ca^{2+}, 2) à partir des phospholipides membranaires, la PLA_2 génère de l'acide arachidonique à l'origine d'une production des RLs, 3) par l'activation des monoamines oxydases (MAO), des COX et des NOS ainsi que 4) par des cellules inflammatoires, telles que les macrophages et les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs). Par ailleurs, le monoxyde d'azote (NO) produit massivement par les

NOS peut se combiner aux anions superoxyde ($O2^{-}$) pour former des anions peroxynitrite ($ONOO^{-}$), qui sont de puissants agents du stress oxydant (Besson, 2009).

Les RLs peuvent induire des dommages aux lipides membranaires, aux protéines enzymatiques et structurales et aux acides nucléiques (ARN et ADN), conduisant par conséquent à la mort cellulaire. Elles sont également impliquées dans la pathogenèse des dommages microvasculaires, de l'œdème cérébral et de l'ischémie secondaire après le TC. Ainsi, de nombreux agents anti-oxydants se sont révélés neuroprotecteurs dans des modèles expérimentaux de TC (Hall et al., 2010).

1.4.3. La neuro-inflammation

La participation de la réponse neuro-inflammatoire aux endommagements secondaires post-TC est bien établie. La neuro-inflammation est caractérisée par la formation de l'œdème cérébral, l'infiltration des cellules sanguines, l'activation des microglies et des astrocytes. Même si la réponse inflammatoire est délétère dans la phase précoce après le TC, elle semble être protectrice et indispensable aux processus de réparation et de cicatrisation dans la phase tardive après le TC (Bramlett et al., 2004; Morganti-Kossmann et al., 2007). Les cellules activées sécrètent des médiateurs cytotoxiques et/ou neurotrophiques. Il a été montré que les cytokines, l'interleukine-1ß (IL-1ß) et le facteur nécrosant des tumeurs (TNFα) augmentent très précocement après un TC. L'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, augmente aussi après un TC. La neuro-inflammation post-TC est caractérisée également par une augmentation de l'expression de chimiokines, de molécules d'adhésion, et d'enzymes pro-inflammatoires (Morganti-Kossmann et al., 2007). Par ailleurs, les kinines qui sont formées dans le tissu cérébral lésé, peuvent induire une perturbation de la microcirculation, une rupture de la BHE conduisant à un gonflement cellulaire et un œdème cérébral. La bradykinine est considérée comme l'un des médiateurs importants libéré au cours de l'inflammation. Cette neuro-inflammation post-TC mise en évidence par une activation des microglies peut être observée jusqu'à 6 ans après le TC chez l'homme (Gentleman et al., 2004). De nombreux agents anti-inflammatoires se sont révélés neuroprotecteurs dans des modèles expérimentaux de TC confirmant ainsi le rôle délétère de la neuro-inflammation.

La neuro-inflammation post-TC est plus particulièrement détaillée dans le chapitre « 2 » de la partie "Rappels Bibliographiques".

1.4.4. La mort cellulaire

Ainsi, l'ensemble des facteurs décrits précédemment participe au développement des lésions observées à la suite d'un TC. Cette cascade conduit à des altérations structurales et

fonctionnelles qui participent à la mort cellulaire. La mort cellulaire est globalement classée en trois types ; la nécrose, l'apoptose (la mort cellulaire programmée) et l'autophagie (Pedersen et al., 2009) **(Fig. 4).** Enfin, une forme récente de mort cellulaire, parthanatos, PARP-1 dépendante a été également décrite (David et al., 2009). La mort cellulaire a lieu tant dans la phase précoce (au cœur et autour de la contusion cérébrale) que dans la phase tardive, résultant d'une hypoxie ou d'une ischémie.

La nécrose se fait suite à une lésion tissulaire, conduisant à un gonflement cellulaire, une fragmentation aléatoire de l'ADN, une atteinte des organites cytoplasmiques, une lyse membranaire et une stimulation des mécanismes de l'inflammation. Le parenchyme cérébral va être nettoyé des cellules nécrotiques grâce à l'activation de cellules phagocytaires (Werner & Engelhard, 2007). Contrairement à la nécrose, l'apoptose est un processus consommateur de l'énergie et qui peut être présent pendant plusieurs jours voire semaines post-TC.

L'apoptose implique l'activation des enzymes cataboliques (en particulier des protéases), la synthèse *de novo* des protéines apoptotiques (par exemple caspases), et la décomposition programmée des structures cellulaires et les organites. Cela conduit aux signes caractéristiques morphologiques de l'apoptose: la pycnose nucléaire (condensation de la chromatine), le clivage de l'ADN, la fragmentation nucléaire, le bourgeonnement de la membrane cellulaire, et enfin la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques (Zhang et al., 2005; Pedersen et al., 2009). L'apoptose est habituellement divisée en deux voies principales : l'apoptose caspase-dépendante et l'apoptose caspase-indépendante. Deux différentes voies de l'apoptose caspase-dépendante peuvent être identifiées. Dans la voie extrinsèque, les caspases sont activées par la mort extracellulaire induisant des interactions ligand-récepteur. En revanche, la voie intrinsèque est initiée par le stress au niveau des organites intracellulaires et les dommages à l'ADN. Les deux voies activent les caspases-3, -6 et -7, et cette activation entraîne la fragmentation de l'ADN, qui est caractéristique de l'apoptose. Le rôle de l'apoptose caspase-indépendante dans le TC est soutenue par le fait que les aspects morphologiques caractéristiques de l'apoptose sont présents dans les cellules dépourvues de la caspase-3 ou du facteur Apaf-1 ou après l'inhibition pharmacologique *in vivo* des caspases (Zhang et al., 2005; Pedersen et al., 2009).

L'autophagie a récemment été reconnue comme un processus cellulaire évolutif et conservé, dans laquelle les protéines cellulaires et les organites sont dégradés à la suite d'un stress cellulaire. Chez les mammifères, au moins trois différents types d'autophagie ont été identifiés : la macro-autophagie, la micro-autophagie, et l'autophagie mise en jeu par les protéines chaperons. Les différents types d'autophagie diffèrent en ce qui concerne les conditions par lesquelles le processus est préférentiellement activé, leur régulation, les

composants cellulaires transportés et la voie par laquelle ces composants sont livrés au lysosome (Pedersen et al., 2009 ; Stoica & Faden, 2010).

Il est de plus en plus admis que la mort cellulaire de type apoptotique, notamment par l'implication des caspases, joue un rôle important dans les conséquences post-TC. En effet, des inhibiteurs de ces enzymes se sont montrés neuroprotecteurs dans des modèles expérimentaux de TC (Zhang et al., 2005).

En conclusion, les cascades physiopathologiques à l'origine des conséquences d'un TC sont très complexes et intègrent de nombreux médiateurs qui sont étroitement liés entre eux.

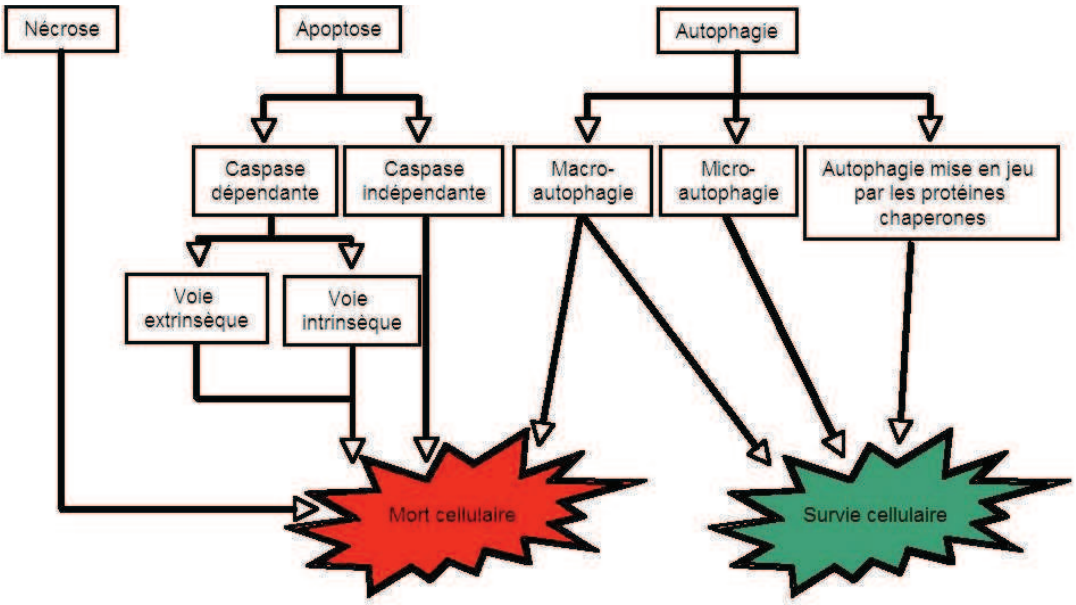


Figure 4 : **Les différentes voies de la mort cellulaire** (d'après Pedersen et al., 2009).

1.5. Évaluation et classification de la gravité du traumatisme crânien

L'examen neurologique des victimes d'un TC est indispensable et consiste à évaluer le niveau de conscience du patient 6h après le TC par l'examen des pupilles et par la recherche des signes de localisation.

Le score de coma de Glasgow (Glasgow Coma Scale ou GCS) évalue plutôt le niveau de conscience du patient que la profondeur du coma induite par le TC. Ce score a été décrit par Teasdale et Jennett (1974) et à partir de là, il a été reconnu comme critère prédictif de mortalité chez les traumatisés crâniens.

Cet examen est simple à élaborer et donne des résultats reproductibles d'un examinateur à l'autre. Il permet une approche de l'état de conscience du patient en examinant trois critères cliniques très précis : l'ouverture des yeux, la réponse verbale et la réponse motrice à des stimuli (bruit, douleur, ordre oral) (**Tableau 1**).

Réponse oculaire	
Ouverture spontanée des yeux	Y4
Ouverture à la demande verbale	Y3
Ouverture à la stimulation douloureuse	Y2
Absente	Y1
Réponse verbale	
Orale appropriée, orientée	V5
Confuse	V4
Incohérente	V3
Incompréhensible	V2
Absente	V1
Réponse motrice	
Sur demande	M6
Adaptée, orientée à la douleur	M5
Retrait en flexion (évitement)	M4
Flexion stéréotypée	M3
Extension	M2
Absente	M1
Score de Glasgow	Total / 15

Tableau 1 : Score de Coma de Glasgow.

Le TC est considéré comme léger lorsque le score de Glasgow est supérieur ou égal à 13, modéré lorsque le score est compris entre 9 et 12 et grave lorsque le score est inférieur ou égal à 8. Néanmoins, le score de Glasgow doit être décrit de façon détaillée avec ses trois paramètres (**Tableau 1**).

Cette échelle numérique allant de 3 à 15, permet d'une part, de suivre l'évolution de l'état du patient et d'autre part, de fournir des informations sur son pronostic. Selon les études épidémiologiques, généralement la gravité des TC se répartit de la manière suivante : 80-94 % des TC sont légers, 3-11 % sont des TC modérés et 3-9 % sont des TC graves (Tagliaferri et al., 2006).

L'échelle de coma de Glasgow étendue (Glasgow Coma Scale-Extended, GCS-E) permet d'évaluer l'altération de la conscience grâce au GCS classique et à la durée de l'amnésie post-TC qui reflète la gravité du TC. Le temps écoulé entre la survenue du TC et la

récupération d'une mémoire des événements d'un jour à l'autre (la durée de l'amnésie) est exprimé en score allant de 7 jusqu'à 0 selon la durée de l'amnésie : nulle, ≤ 30 min, de 30 min à 3h, de 3h à 24h, de 1j à 7j, de 8j à 30j, de 31j à 90j. L'amnésie de plus de 24h est le signe d'un TC sévère.

L'échelle de devenir de Glasgow (Glasgow Outcome Scale, GOS) permet d'évaluer le degré de gravité des séquelles intellectuelles, physiques, et comportementales. Elles sont, le plus souvent, évaluées 3 à 6 mois après le TC. On distingue généralement 5 niveaux (**Tableau 2**).

Score	Etat du patient
1	bonne récupération
2	handicap modéré (sujet handicapé mais indépendant)
3	handicap sévère (sujet conscient mais dépendant)
4	état végétatif persistant
5	mort

Tableau 2 : L'échelle de devenir de Glasgow.

Le GOS est largement employé pour évaluer l'efficacité d'un composé pharmacologique lors des essais cliniques. Cependant, cette échelle ne semble pas assez sensible pour détecter une amélioration de l'état du patient, c'est la raison pour laquelle son utilisation reste aujourd'hui un sujet à débat. Une extension de cette échelle a été faite par Jennett et collaborateurs (1981) permettant une appréciation de l'état de santé du patient à l'aide de 8 niveaux (**Tableau 3**).

À côté du GCS, les techniques d'imagerie tomographiques permettent d'analyser en urgence les lésions traumatiques chez les patients et de surveiller l'évolution anatomique des lésions diffuses, contusions, hématomes, hydrocéphalie et œdème cérébral (Gallagher et al., 2007). Parmi ces techniques, il existe le CT-scan (Computed Tomography-scan), la tomodensitométrie (TDM) dite aussi tomographie axiale calculée par ordinateur, l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM), la tomographie à émission de positron (TEP), et la tomographie à émission mono-photonique (SPECT, pour Single Photon Emission Computed Tomography).

Score	Etat du patient		
1	rétablissement satisfaisant	supérieur	aucun trouble psychologique
2		inférieur	problèmes liés au TC nuisent aux activités quotidiennes
3	invalidité modérée	supérieur	sujet capable de travailler ou d'étudier à un niveau réduit
4		inférieur	sujet incapable de travailler
5	invalidité grave	supérieur	sujet conscient dépendant, n'ayant pas besoin fréquemment d'une aide
6		inférieur	sujet conscient dépendant, ayant besoin fréquemment d'une aide
7	état végétatif persistant		
8	mort		

Tableau 3 : L'échelle de devenir de Glasgow étendue.

Le CT-scan est un examen réalisable en 1ère intention après un TC en raison de sa disponibilité, rapidité, reproductibilité et son coût modéré. Il permet la détection d'un hématome, d'un œdème cérébral, d'une contusion cérébrale, ainsi que d'une fracture du crâne. Il doit être effectué en urgence quand le GCS est inférieur à 15. La TDM est la principale technique d'imagerie pour les lésions cérébrales aiguës, donnant des informations rapidement. L'IRM offre une meilleure résolution pour les tissus mous avec des contrastes plus élevés qu'avec la TDM grâce aux différentes séquences, donc cette technique prend dans ce sens un intérêt pronostique, diagnostique et physiopathologique. La TEP et la SPECT permettent de mesurer en trois dimensions l'activité métabolique d'un organe telle que la consommation en glucose ou en oxygène grâce aux émissions produites par les positrons issus de la désintégration d'un produit radioactif injecté au préalable. Ces 2 dernières techniques sont donc très utiles pour visualiser les perturbations fonctionnelles.

Classification de la gravité du TC

Les lésions cérébrales post-traumatiques ont été classées le plus souvent de la manière suivante (Saatman et al., 2008) :

1) La classification anatomo-pathologique est utilisée pour décrire les lésions dans la phase aiguë, leur localisation et leurs aspects anatomiques.

2) La classification étiologique décrit les facteurs à prendre en compte en vue de prévenir la survenue du TC. L'ampleur et la direction de force peuvent prédire le type et la gravité de la lésion. Il y a une corrélation importante entre le mécanisme physique et l'anatomo-pathologie de la lésion.

3) La classification symptomatique (physiopathologique) décrit les manifestations cliniques à prendre en charge. Généralement, on différencie à la suite d'un TC des processus physiopathologiques «primaires» irréversibles, qui sont induits au moment de TC et des processus «secondaires» réversibles qui se produisent à des temps variables après une lésion et compliquent la lésion cérébrale.

4) La classification pronostique décrit les facteurs associés aux conséquences post-TC. Certains d'entre eux donnent un pronostic général (l'âge et la perte de conscience), alors que d'autres facteurs décrivent de façon détaillée donnant un pronostic plus pointu (le CT-scan indique la nature des lésions cérébrales).

1.6. Prise en charge des traumatisés crâniens

Sachant que le taux de mortalité à la suite d'un TC diminue de façon importante lorsque les patients arrivent dans la 1ère heure qui suit l'accident (Pace et al., 2006), des procédures pertinentes de prise en charge doivent être appliquées le plus tôt possible après la survenue du TC.

La prise en charge pré-hospitalière des traumatisés crâniens graves repose sur :

La coordination des intervenants, qui est au mieux assurée par la régulation du SAMU (Service d'Aide Médicale d'Urgence), lequel assure une écoute permanente, déclenche la réponse la plus adaptée, s'assure des disponibilités d'hospitalisation, organise les transports terrestres ou héliportés, et veille à l'admission.

La prévention des agressions cérébrales secondaires d'origine systémique est primordiale afin d'empêcher les lésions secondaires d'origine ischémique ou hémorragique de se surajouter aux lésions primaires et de lutter contre les facteurs susceptibles d'aggraver l'ischémie cérébrale. La surveillance des fonctions vitales ventilatoires et cardiocirculatoires ainsi que leur maintien et leur restauration immédiate sont les tâches les plus importantes dans la phase pré-hospitalière. D'autres facteurs, tels que les risques d'infection et les troubles de la coagulation, sont également à prendre en compte dès la phase pré-hospitalière.

La prise en charge respiratoire : L'intubation orotrachéale et la ventilation mécanique tendent à améliorer le pronostic vital et fonctionnel des patients traumatisés graves. La prise en charge respiratoire s'effectue systématiquement lorsque le GCS est inférieur ou égal à 8

(TC grave). L'intubation se fait de préférence selon la séquence d'induction rapide, en tenant compte du risque de lésion cervicale associée. La mobilisation cervicale doit donc être limitée. La ventilation artificielle doit assurer une saturation artérielle en oxygène (SaO_2) supérieure à 92 % (au mieux 95 %) et une normocapnie (pression partielle de CO_2 expirée à 35 mmHg).

La prise en charge hémodynamique : l'un des objectifs de la prise en charge pré-hospitalière est le maintien ou le rétablissement d'une stabilité tensionnelle, d'une pression de perfusion cérébrale (PPC) ainsi que d'un transport de l'O_2 adéquat. En cas d'hypertension artérielle maligne, le traitement habituel est l'osmothérapie, c'est-à-dire le traitement de la HIC (perfusion de mannitol à 20 % à la dose de 0,5 à 1 g/kg en 20 minutes). La pression artérielle systolique doit être maintenue inférieure à 190 mmHg.

L'hypotension artérielle qui est plutôt due à une lésion hémorragique est plus préoccupante et doit être rapidement traitée par remplissage ou utilisation d'agents vasopresseurs. Le remplissage vasculaire fait appel à des solutés isotoniques comme le soluté physiologique à 0,9 % qui est le vecteur idéal (perfusion de base) et le soluté de remplissage en première intention, il peut être associé, si nécessaire, aux macromolécules en solution isotonique. Le volume de liquide perfusé doit être adapté et permettre le maintien d'une concentration d'hémoglobine supérieure à 10g/100ml. Les agents vasopresseurs utilisés sont notamment l'éphédrine, la dopamine ou l'adrénaline.

L'HIC se caractérise par une élévation de la PIC de son niveau de base (> 20 mmHg). Le monitorage de la PIC et le maintien autour de 20 mmHg est souvent préconisé. Les HIC décompensées et l'engagement cérébral sont traités par osmothérapie. Devant une mydriase uni- ou bilatérale, après avoir vérifié que la sédation est bien adaptée, le mannitol à 20 % est injecté en 20 minutes (0,5 à 1 mg/kg).

La sédation pré-hospitalière : Elle est débutée après l'évaluation clinique initiale. Les objectifs de la sédation chez les patients intubés sont d'assurer l'analgésie, d'assurer la pérennité d'une intubation bien supportée et de limiter l'agitation, l'hypertonie et les manifestations végétatives. En l'absence d'hypovolémie, elle fait fréquemment appel aux benzodiazépines (Hypnovel®) et aux morphiniques (morphine, Fentanyl®).

Le contrôle de la température corporelle : L'hyperthermie est fréquente, même dans les premières heures post-traumatiques. Cette hyperthermie est secondaire à un état hypercatabolique provoqué par la cascade inflammatoire liée au TC. Le traitement implique des antipyrétiques (paracétamol) et la sédation, qui permet à la fois une baisse du catabolisme et une augmentation de la perte de chaleur.

Les gestes complémentaires : Pour éviter toute gêne au retour veineux jugulaire, la tête est maintenue dans l'axe, en évitant toute flexion ou extension excessive et le collier cervical ne doit pas comprimer les veines jugulaires. Le patient doit être transporté en décubitus strict. Les crises convulsives, facteurs d'augmentation de la PIC, doivent être traitées (benzodiazépines, barbituriques, diphénylhydantoïne).

La nutrition artificielle a pour objectif l'utilisation optimale des voies de synthèse protéique afin de limiter la dénutrition. Des contrôles réguliers de la glycémie doivent être effectués. Un apport calorique, protidique et lipidique est recommandé. A cela, doit s'ajouter un apport de potassium, de magnésium et de phosphore.

En conclusion, l'évolution de la prise en charge des TC graves, ces dernières années, a été marquée par le progrès de l'imagerie et de la réanimation. Les indications opératoires sont mieux définies. La coexistence de lésions primaires directement liées au trauma et de lésions secondaires ischémiques nécessite une prise en charge pluridisciplinaire, dans laquelle urgentistes, anesthésistes, radiologues, réanimateurs et neurochirurgiens sont impliqués. La prise en charge permet de limiter l'augmentation de la taille des lésions. Cependant, les médecins restent encore largement démunis pour traiter les lésions primaires et secondaires.

2. MODELES EXPERIMENTAUX DE TRAUMATISME CRANIEN

Afin de reproduire les conditions pathologiques mises en évidence chez les patients ayant subi un TC, plusieurs modèles expérimentaux de TC ont été développés. Ces modèles *in vitro* et *in vivo* ont pour but d'étudier les mécanismes à l'origine des lésions encéphaliques, d'étudier chacun des aspects du TC et de mimer la très grande hétérogénéité et complexité du TC chez l'homme (pour revue voir : Wang & Ma, 2010). De plus, ces modèles doivent prendre en compte les différents facteurs qui influent sur la réponse de l'organisme à un TC. Afin de valider ces modèles expérimentaux, ils doivent être caractérisés par une lésion physique, comportementale ainsi qu'anatomique, mimant les aspects du TC chez l'homme (contusion, œdème, LADs, hémorragie sous-arachnoïdienne,..). La réponse au TC doit être reproductible, quantifiable et cliniquement pertinente.

2.1. Modèles *in vitro*

Les modèles *in vitro* de TC bien que physiopathologiquement éloignés des conditions réelles du TC, permettent de décrire précisément des mécanismes cellulaires ou moléculaires impliqués dans la mort cellulaire à la suite d'un TC (Morrison et al., 2011).

2.1.1. TC sur cultures cellulaires

Ces modèles sur cultures cellulaires sont variés selon le mécanisme à l'origine du TC (transsection, compression, accélération, extension ou cisaillement) (Morrison et al., 2011; Spaethling et al., 2007).

Le modèle *in vitro* par transsection consiste à racler les cellules d'une culture cellulaire à l'aide d'un ou plusieurs stylets en plastique (1 à 6) ou des faisceaux laser, ce qui détermine la sévérité du modèle.

Le modèle de TC par compression est réalisé par le lâcher d'un poids d'une hauteur définie sur une tranche du tissu (cervelet, hippocampe) en culture organotypique. La sévérité de ce modèle varie en fonction du poids et de la hauteur utilisée.

Le modèle d'accélération *in vitro* a été validé afin de mimer un modèle *in vivo* d'accélération-décélération. Il consiste à imposer une accélération aux cellules à l'aide d'un impacteur. Cependant, le niveau de déformation cellulaire ne peut pas être mesuré.

Un autre modèle *in vitro* a été développé pour étudier les lésions causées par les forces d'inerties. Des cellules situées sur un plateau tournant sont soumises à une rotation d'un plateau à une distance prédéfinie. Les cellules subissent une force hydrodynamique contrôlée par la vitesse de rotation et la distance entre les deux plateaux.

Un dernier modèle *in vitro* est obtenu en cultivant des cellules sur une plaque de six puits dont les fonds en silicone se déforment sous une pression prédéterminée. La mesure de l'allongement du fond du puit peut déterminer l'allongement des cellules.

2.1.2. TC sur coupes

Ce modèle est utilisé surtout pour des études d'électrophysiologie (Wallis et al., 1993). Il consiste à appliquer une pression brutale sur une coupe de cerveau de l'animal, ce qui conduit à des désordres biochimiques. Les modèles de TC *in vitro* ne peuvent pas remplacer les modèles *in vivo*, mais ils se complètent de façon pertinente et donnent un espoir supplémentaire afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le TC.

2.2. Modèles *in vivo*

Les modèles *in vivo* sont plus proches de la réalité clinique du TC. Ces modèles sont globalement générés soit par un impact direct sur le cortex, ce qui induit une déformation du tissu cérébral (modèles de TC à crâne ouvert), soit par application d'une ou plusieurs forces d'accélération en absence de l'impact direct (modèles de TC à crâne fermé).

Différentes espèces animales (primate, mouton, porc, chien, chat, lapin, rat et souris) ont été utilisées afin de réaliser des modèles *in vivo* du TC pour but de mimer des aspects

particuliers du TC. Parmi ces espèces animales, les rongeurs sont les plus utilisés pour des raisons d'éthique, d'économique, d'homogénéité d'espèce et de taille (Yamori et al., 1976). La souris, plus particulièrement, possède la possibilité de produire des souches d'animaux transgéniques qui surexpriment un gène codant pour une protéine donnée et des souches d'animaux "knock-out" (KO), qui au contraire n'en expriment pas.

2.2.1. À crâne ouvert

Les modèles expérimentaux réalisés à crâne ouvert impliquent l'application directe d'un impact sur le cortex, et conduisent principalement à la formation d'une lésion focale corticale située au niveau de la zone d'impact. En fonction de la pression de percussion appliquée et de la zone percutée (centrale ou latérale), des lésions de degré de sévérité variable (trauma léger, modéré ou grave) sont alors observées.

Percussion de fluide

Le modèle de percussion de fluide consiste à percuter directement la surface du cortex par un fluide sous pression (Thompson et al., 2005).

Ce modèle de TC a été mis au point pour la première fois chez le lapin, puis il a été modifié afin de produire des lésions de degré variable (léger, modéré ou sévère) dans différentes espèces animales. Actuellement, le modèle de TC par percussion de fluide chez le rongeur est le plus couramment utilisé. La lésion est produite par une brève pulsation de fluide sous pression à la surface de la dure-mère intacte, le choc se déplace alors dans l'espace épidural de façon concentrique à partir de la surface de percussion, conduisant à une charge diffuse dans le cerveau.

Ce modèle reproduit quelques aspects des réponses mécaniques, physiologiques, neurologiques et morphologiques observés au cours d'un TC chez l'homme (Thompson et al., 2005). Selon la localisation et la sévérité de la lésion, ce modèle est caractérisé par des perturbations du métabolisme et de l'homéostasie ionique, du DSC, de la PIC et par une rupture de la BHE ainsi qu'une formation de l'œdème cérébral et une astrogliose réactive. Ce modèle produit une lésion, associée à une mort cellulaire nécrotique et apoptotique, qui évolue sur une période de quelques jours à plusieurs semaines voire jusqu'à un an après le TC. Les lésions induites par ce modèle de TC peuvent être des contusions directes sur le site d'impact du fluide, des compressions des structures du tronc cérébral ou des lésions axonales traumatiques dans la substance blanche sous-corticale et à distance du site de la percussion. Par ailleurs, ce modèle entraîne un déficit durable des fonctions motrices et cognitives.

Il existe deux types de modèles de TC par percussion de fluide, percussion de fluide central et latéral (McIntosh et al.,1989). Ils consistent à percuter le vertex ou le cortex temporal, et le choc entraîne une lésion diffuse plus ou moins importante.

Impact cortical contrôlé (ICC)

Ce modèle consiste à percuter avec un impacteur rigide la dure mère qui est chirurgicalement exposée (Cernak, 2005). Le modèle d'ICC a été décrit pour la première fois chez le furet, puis il a été adapté chez le rat et la souris. Il est possible dans ce modèle de contrôler précisément les paramètres de la déformation (durée, vitesse et profondeur de l'impact) et de régler l'angle de l'impact par rapport à la dure-mère. La sévérité de la lésion est corrélée à la profondeur de l'indentation de l'impacteur et de sa localisation. Ce modèle de trauma conduit à la formation d'un œdème cérébral, à une perturbation du DSC, à des lésions corticales, à la mort cellulaire par apoptose, à des lésions axonales traumatiques et à un déficit sévère des fonctions motrices et cognitives.

Il existe trois types de modèles de TC par impact cortical contrôlé :

- l'impact cortical contrôlé central qui produit une lésion de taille variable dans le cortex situé au site de l'impact avec un coma d'une durée variable,
- l'impact cortical contrôlé latéral qui entraîne une lésion de taille variable sous l'impact, ainsi qu'un coma très bref cohérent avec une faible proportion d'axones endommagés dans les deux hémisphères,
- et l'impact cortical contrôlé latéral avec un dégagement de la dure-mère du côté controlatéral qui produit un volume de lésion variable dans la zone du coup ou du contrecoup selon les conditions expérimentales d'impact accompagné d'un coma bref avec peu de dommages axonaux dans le tronc cérébral.

2.2.2. À crâne fermé

Les modèles expérimentaux réalisés à crâne fermé sont plus proches à la réalité clinique et consistent à percuter directement la boîte crânienne avec un poids de masse variable, ou encore d'un processus d'accélération/rotation. La percussion produit une onde de choc qui se transmet au cerveau sous forme de contraintes de déformation (torsion, étirement et/ou écrasement). Ces modèles provoquent des lésions focales et diffuses, et peuvent induire des lésions vasculaires hémorragiques et des lésions de contrecoup en fonction du degré de sévérité de l'impact appliqué.

Lâcher de poids

Initialement décrit chez les primates, il a été développé ensuite chez les rongeurs. C'est un modèle adapté pour mimer les évènements et les lésions rencontrés chez l'homme

à la suite d'un accident de la voie publique. Un poids calibré chute le long d'une tige d'impacteur sur la tête d'un animal maintenu en contention (Hellal et al., 2005 ; Homsi et al., 2009, 2010 ; Flierl et al., 2009). Une ouverture de la BHE, un œdème cérébral et un accroissement de la PIC à proximité de la zone de contusion sont des évènements qui caractérisent ce modèle. Une perte cellulaire, des LADs, un dysfonctionnement neurologique et d'ordres moteur et cognitif sont également décrits dans ce modèle.

Impact d'accélération

Le modèle initial a été développé chez le primate, puis il a été mis au point chez le chat, la souris et le rat.

Le modèle d'impact d'accélération a été développé chez les rongeurs car leur vertex est extrêmement fin. Un casque de protection en acier inoxydable permet d'éviter les fractures quand les animaux sont soumis aux traumas les plus sévères (Marmarou et al., 1994). De plus, la tête de l'animal est placée en l'absence de contention sur un matelas de mousse, dont la constante d'élasticité est connue afin d'en permettre le mouvement après l'impact. Ce modèle produit des lésions axonales traumatiques (Buki et al., 1999 ; Thornton et al., 2006) et des lésions dendritiques en l'absence de lésions focales (Folkerts et al., 1998) ainsi que des déficits moteurs et cognitifs (Adelson et al., 1997).

Inertie d'accélération-rotation

Ce modèle a été appliqué initialement chez les primates, puis il a été mis au point chez le lapin, le cochon et les rongeurs.

L'accélération-rotation ou accélération-translation due à un mouvement non restreint de la tête provoque une rotation ou une accélération de la boîte crânienne. Ces mouvements sont responsables d'une déformation du cerveau soumis à la transmission de l'énergie cinétique. La mise au point de ces modèles a pour but de mimer les conséquences des mouvements de l'encéphale à l'intérieur de la boîte crânienne, situation incriminée dans la constitution des lésions cérébrales focales et diffuses, en partie lors d'accidents de la voie publique. Ce modèle conduit à des hémorragies sous-arachnoïdiennes étendues, à une astrocytose réactive ainsi qu'à des dommages axonaux (Gutierrez et al., 2001). Il est également associé à un œdème cérébral, à une augmentation de la PIC et à la mort neuronale retardée par apoptose et par nécrose (Runnerstam et al., 2001).

En conclusion, aucun modèle expérimental de TC ne peut être parfait, car le TC n'est pas univoque. On en distingue différents types et 'il existe différentes causes et divers mécanismes responsables des lésions rencontrées en clinique (Kazanis, 2005). Un modèle

ne peut reproduire que certains aspects rencontrés en clinique. Ainsi, il faut plutôt disposer de différents modèles, afin de les utiliser pour répondre à une question précise.

3. LES ESSAIS CLINIQUES DANS LE TRAUMATISME CRANIEN

Parmi un grand nombre de molécules testées dans des différents modèles de TC *in vitro* et *in vivo*, de nombreuses molécules ont révélé un effet neuroprotecteur en expérimentation animale. Cependant, un nombre limité de ces molécules a fait l'objet d'essais cliniques. La plupart de ces molécules ciblent un mécanisme particulier de processus pathologique déclenché par le TC (Wang et al., 2006), et peu d'études ont ciblé des molécules agissant à plusieurs niveaux de la cascade physiopathologique. Malgré les résultats prometteurs en expérimentation animale de certaines de ces molécules, aucune d'entre elles n'a révélé des effets bénéfiques et neuroprotecteurs en essai clinique à ce jour (Maas et al., 2010). Les essais cliniques les plus récents chez les patients ayant subi un TC sont regroupés dans le **tableau 4.** On peut citer, de manière non-exhaustive, quelques exemples de composés qui ont passé en essai clinique pour le TC et qui n'ont pas montré d'intérêt thérapeutique significatif.

Les antagonistes glutamatérgiques

Toute une série de substances capables de bloquer la libération ou l'action du glutamate ont montré des actions bénéfiques dans les modèles animaux de TC (McIntosh et al., 1998) mais sans bénéfice en essai clinique (Royo et al., 2003).

Les antagonistes compétitifs du récepteur NMDA

Selfotel® (CGS 19755, Ciba-Geigy): suite à une évaluation préclinique intensive et des résultats promoteurs, il fût le premier antagoniste compétitif glutamatergique à passer en phase III. Ciba-Geigy a lancé 4 essais de phase III, qui ont inclus 1200 patients dans 2 essais pour l'accident vasculaire cérébral (AVC) et environ 860 patients dans 2 essais concernant le TC grave (Morris et al., 1999). Ces essais étaient interrompus prématurément à cause d'une surmortalité et des résultats négatifs dans le groupe de patients traités par le Selfotel® dans les essais concernant l'AVC (Narayan et al., 2002).

D-CPP-ène (D-3- (2-carboxypiperazine-4-yl) propenyl-1-phosphonic acid, EAA494, Sandoz): C'est un essai de phase III, dont le traitement était mis en place dans une fenêtre de 12 heures pour la 1ère administration, suivi par 2 administrations par jour pendant 5 jours. Les résultats de cette étude ont mis en évidence un léger effet délétère non significatif du traitement à 6 mois (Narayan et al., 2002).

Les antagonistes non compétitifs du récepteur NMDA

Cerestat® (CNS 1102, Aptiganel, Cambridge Neuroscience): Il agit au niveau du site de fixation du magnésium du récépteur NMDA lorsque le récepteur est activé par des concentrations élevées de glutamate. L'essai multicentrique (70 centres à travers l'Europe et les Etats-Unis) de phase III, incluant 512 patients, n'a pas permis de mettre en évidence un effet bénéfique du Cerestat® (Bullock et al., 1999). De la même façon, l'analyse des études cliniques du Cerestat® dans l'AVC n'a pas non plus montré de bénéfice thérapeutique (Narayan et al., 2002).

Les autres antagonistes du récepteur NMDA

Eliprodil (SL 82.0715, Synthélabo): C'est un antagoniste glutamatergique agissant sur le site des polyamines du récepteur NMDA. Bien que l'analyse statistique de l'étude de phase II, réalisée en France, ne montre pas d'amélioration neurologique, une analyse en sous-groupe a mis en évidence une diminution de l'œdème cérébral par l'Eliprodil (Bullock et al., 2002). Une étude clinique de phase III dans le traitement du TC n'a pas montré non plus d'effet bénéfique de ce composé (Maas, 2001).

CP-101,606 (traxoprodil, Pfizer): C'est un antagoniste glutamatergique de seconde génération qui agit de façon sélective au niveau de la sous-unité NR2B du récepteur NMDA dans les neurones du cortex et de l'hippocampe (Hatton, 2001). Les études cliniques ont montré qu'il passe rapidement et facilement dans le LCR (Bullock et al., 1999). De plus, il n'entraîne pas d'effets secondaires comportementaux. L'analyse de la phase II sur 404 patients, a mis en évidence un effet bénéfique non significatif du CP-101,606 sur le score neurologique et sur la mortalité, sans effets indésirables (Yurkewicz et al., 2005).

Les antagonistes calciques

Ces composés agissent au niveau des canaux calciques permettant de réduire l'influx calcique massif consécutif au TC (Clausen & Bullock, 2001). Ils ont une action bénéfique dans les modèles expérimentaux et chez les patients souffrant d'hémorragie méningée par rupture d'anévrisme (Maas, 2010).

Ziconotide® (SNX-111, CI-1009, Parke-Davis): Ce composé agit sur les canaux calciques présynaptiques de type N. Les études précliniques ont montré une réduction du déficit neurologique avec une fenêtre thérapeutique importante (4 heures) ainsi qu'une dose efficace faible (1 mg/kg). Une étude de phase III menée aux Etats-Unis a été suspendue

prématurément après avoir mis en évidence une augmentation de la mortalité dans le groupe de patients traités par ce composé (Narayan et al., 2002).

Nimodipine (Nimotop®, Bayer): Deux études cliniques menées dans le TC (Head Injury Trial I et II) ont montré une amélioration neurologique de 8 % bien que non significative. Une troisième étude clinique (Head Injury Trial III) a mis en évidence une amélioration neurologique des patients ayant une hémorragie sous-arachnoïdienne d'origine traumatique traités avec la nimodipine. Par la suite, une méta-analyse de ces 3 études a révélé que le traitement par la nimodipine entraîne une diminution de la mortalité et du déficit neurologique. Bien que l'utilisation de la nimodipine soit maintenant autorisée dans certains pays dans le traitement de l'hémorragie sous-arachnoïdienne d'origine traumatique, elle n'est pourtant pas largement acceptée comme traitement standard (Narayan et al., 2002). Une quatrième étude clinique (Head Injury Trial IV) n'a pas confirmé le bénéfice thérapeutique de la nimodipine dans le traitement de l'hémorragie sous-arachnoïdienne d'origine traumatique (Maas, 2001).

Les antagonistes des récepteurs B2 à la bradykinine

LF 16-0687Ms (Anatibant, Laboratoire Fournier) a montré au cours des essais de phase I réalisé dans 6 centres aux Etats-Unis une bonne tolérance aux doses de 3,75 et 22,5 mg en s.c. (Marmarou et al., 2005). Les premiers résultats de l'essai de phase II incluant 25 patients traumatisés crâniens sévères a montré que l'anatibant administré en monodose en s.c. 8 à 12 heures après le TC n'entraîne pas d'effet indésirable chez les traumatisés crâniens (Marmarou et al., 2005). La société Xytis a acheté l'anatibant (alors renomé XY2405) au Laboratoire Fournier en 2005, et un essai clinique de phase II a été commencé en 2007. En 2009, cet essai a été arrêté sans aucune preuve fiable sur des effets bénéfiques ou délétères (Shakur et al., 2009).

Les agents anti-radicaux libres et anti-oxydants

De nombreuses molécules qui piègent les RLs ont été évaluées en essai clinique (Narayan et al., 2002 ; Maas et al., 2010).

PEG-SOD : C'est un chélateur de RLs, une superoxyde dismutase (SOD) conjugée à PolyEthylène Glycol (PEG) qui augmente sa demi-vie et sa pénétration à travers la BHE. Les essais de phase II ont montré une amélioration de la PIC et de l'état clinique des patients. Néanmoins, l'essai clinique multicentrique (29 centres aux Etats-unis) de phase III chez 463 traumatisés sévères étaient sans bénéfice au niveau comportemental ou de la mortalité (Narayan et al., 2002, Hall et al., 2010).

Les corticoïdes

Initialement, les corticoïdes ont été employés en neurochirurgie pour le traitement de l'œdème associé aux tumeurs cérébrales. Les études expérimentales ont mis en évidence que ces composés sont neuroprotecteurs notamment en réduisant la production de RL.

Déxamethasone : Les six études cliniques réalisées chez les traumatisés crâniens graves n'ont montré aucun bénéfice en termes de mortalité, de morbidité ou de réduction de la PIC (Narayan et al., 2002).

Méthylprednisolone : Elle a fait l'objet d'une très grande étude internationale multicentrique randomisée contrôlée *(CRASH trial*). Le but de cette étude était d'évaluer l'effet de l'administration de la méthylprednisolone à forte dose (2 g en 1 heure suivie d'une perfusion de 0,4 g/h pendant 48 heures) sur l'amélioration neurologique après un TC. L'essai devait inclure 20 000 patients et a été interrompu à la moitié (10 008 patients). Elle a tout de même mis en évidence qu'il n'y avait pas de réduction de la mortalité 14 jours après le TC chez les patients ayant reçu le méthylprednisolone et qu'il y avait une augmentation de 18% de la mortalité (Roberts et al., 2004).

Essais cliniques récents : progestérone et érythropoïétine

Actuellement, un composé qui s'avère avoir un grand potentiel dans le traitement du TC est la progestérone. Cette dernière synthétisée en petites quantités par le cerveau quel qu'en soit le sexe, y exerce des effets neuroprotecteurs chez l'homme. Plus précisément, deux essais cliniques, menés aux USA et en Chine respectivement, ont montré que l'administration intraveineuse de progestérone réduit la mortalité chez les traumatisés sévères et améliore la récupération fonctionnelle à 30 jours (Wright et al., 2007 ; Xiao et al., 2008). Le composé est donc actuellement en essai clinique de phase III aux USA **(Tableau 4)**.

En outre, depuis quelques années, des études expérimentales ont montré que l'érythropoïétine (Epo) peut exercer un effet neuroprotecteur au-delà de ses effets hématologiques (Brines et al., 2005). Dans des modèles de TC chez la souris, il a été montré que l'érythropoïétine améliore le score neurologique et réduit la neuro-inflammation et le volume des lésions focales et diffuses (Brines et al., 2005 ; Yatsiv et al., 2005). A ce jour, le seul essai clinique avec l'EPO a été conduit chez des patients ayant un AVC ischémique récent, avec une meilleure récupération fonctionnelle et une diminution du volume cérébral infarci dans le groupe traité par l'EPO (Ehrenreich et al., 2002). L'ensemble de résultats est

prometteur et place l'EPO parmi les nouveaux agents neuroprotecteurs. Une étude clinique avec l'EPO est actuellement en cours pour le traumatisme crânien **(Tableau 4).**

4. CAUSES DES ECHECS DES ESSAIS CLINIQUES DANS LE TRAUMATISME CRANIEN

À partir des milliers de molécules criblées pour leur effet neuroprotecteur, des centaines d'entre-elles sont arrivées aux études *in vivo*. Cependant, malgré tous les résultats très encourageants de certaines molécules testées dans plusieurs modèles animaux, aucune d'entre-elles s'est avérée efficace en essai clinique. L'origine de ces échecs peut être expliquée par plusieurs hypothèses (Faden, 2002; Narayan et al., 2002; Maas et al., 2007; 2010).

Un élément important à tenir compte est l'hétérogénéité du tableau clinique des patients en termes de contusion, des LADs, d'OC, d'hématome, d'hypoxie et d'ischémie cérébrale. Donc, les essais cliniques sont soit très restrictifs au niveau des critères d'inclusion et apparaissent donc difficiles à mener à son terme, soit peu limitatifs incluant des patients très hétérogènes du point de vue clinique et l'effet bénéfique serait donc plus difficile à mettre en évidence. La définition à priori d'analyses en sous-groupe permet d'identifier un éventuel effet bénéfique chez certains groupes de patients cliniquement définis.

L'évaluation de l'effet bénéfique d'un composé pharmacologique sur la situation clinique du patient est réalisée à l'aide du GOS ou au meilleur des cas du GOS étendu (constitué de 8 niveaux), dans les 3 et/ou 6 mois qui suivent le TC. Cependant, il est aujourd'hui de plus en plus admis que ces échelles ne sont pas suffisamment sensibles pour évaluer l'amélioration clinique de tous les aspects du déficit neurologique (la mémoire, le déficit moteur, les fonctions exécutives, ..). Il est donc recommandé d'utiliser plusieurs tests permettant une appréciation plus détaillée de l'évaluation de l'état des patients (Margulies & Hicks, 2009).

À côté de cela, la prédictibilité des modèles animaux est également à l'origine de l'échec des essais cliniques. En effet, les études expérimentales sont menées sur des modèles de TC très standardisés et plus particulièrement caractérisés pour l'étude d'une variable pertinente cliniquement (hémorragie, hématome, OC, LAD,….), permettant ainsi l'étude approfondie du mécanisme physiopathologique en question. Cependant, les patients présentent, dans la plupart des cas, plusieurs composantes qui sont toutes étroitement associées (Kazanis, 2005).

De plus, les variables évaluées (volume de lésion, déficit neurologique, œdème cérébral…) dans les études expérimentales sont étudiées très tôt après le TC (dans la première semaine qui suit le TC) alors que chez les patients, les effets de traitement ne sont évalués que très tardivement (6-12 mois après le TC).

Par ailleurs, dans les études expérimentales, les traitements sont apportés en une seule administration, très souvent avant, voire peu de temps après le TC (15-30 minutes après). À l'inverse, les patients inclus dans les études cliniques ne peuvent bénéficier du traitement que dans un délai de 4 heures après le TC dans le meilleur des cas, en raison du temps nécessaire pour effectuer les examens d'imagerie médicale et l'obtention du consentement. Ces données mettent en avant l'importance des agents neuroprotecteurs ayant une fenêtre d'opportunité thérapeutique large, d'où la nécessité d'identifier des cibles thérapeutiques tardives.

De plus, la conséquence de la compétition intensive entre les firmes pharmaceutiques a fait que certains essais cliniques de phase III ont été initiés avant l'analyse complète des données obtenues lors des études de phase II.

Finalement, tenant en compte la haute complexité du TC où les mécanismes physiopathologiques sont plus ou moins associés, l'utilisation des molécules à activité pléïotrope ou l'association de plusieurs stratégies thérapeutiques agissant à différents niveaux de la cascade physiopathologique serait certainement plus appropriée et plus efficace pour obtenir un bénéfice thérapeutique chez le plus grand nombre de patients du TC (Marshall, 2000; Vink & Nimmo, 2009).

L'ensemble de ces données met en avant l'absence de traitements neuroprotecteurs en clinique et la nécessité de poursuivre la recherche des mécanismes à l'origine des conséquences post-TC. Parmi les thématiques principales de recherches expérimentales, celles portant sur la neuro-inflammation font l'objet de nombreuses études que nous détaillerons plus particulièrement dans le chapitre suivant.

Identifiant	Composé	Classe thérapeutique	Condition(s)	Protocole de traitement	date de l'étude	Phase de l'étude clinique
NCT01402882	Acide tranexamique [1]	Antifibrinolytique	TC sévère	2 g/jour	Sept.2011-Jan.2017	Phase III (CRASH-3)
NCT01013870	Atorvastatine	Hypocholestérolémiant de la famille des statines	TC léger avec troubles d'anxiété	entre 1 et 80 mg/kg, dès 24h jusqu'à 7j post-TC	Dec.2009-Jul.2013	Phase II
NCT00313716	Erythropoïétine-α	Hormone de nature glycoprotéique	TC sévère (Traitement de l'anémie & dysfonctionnements vasculaires)	Perfusion de 7gm/dl ou 10 gm/dl pendant 1-2 semaines	Avril 2006 – Fevrier 2013	Phase III
NCT00973674	Estrogène	Hormone stéroïdienne	TC sévère	1 dose (i.v) de 5 mg/ml	Jul. 2009-Juin 2012	Phase II (RESCUE-TBI)
NCT01000064	Vyvnase [2]	Psychostimulant	TC modéré à sévère (Traitement des troubles d'attention)	30 mg - 70 mg/ jour pendant 6 semaines	Oct.2009- Juin 2012	Phase III
NCT01058395	**Minocycline**	Tétracyclines de 2ème génération	**TC**	**800 mg puis 200 mg 2x/j ou 800 mg puis 400 mg 2x/j jusqu'à 7j**	**Fév. 2010 – Jan.2014**	**Phase I et II**
NCT01143064	Progestérone	Hormone stéroïdienne	TC sévère	perfusion i.v. de 0.5 mg/kg/h pendant 71 h	Jan.2009 – Mars 2012	Phase III (SyNAPSe)
NCT00822900			TC modéré à sévère	perfusion i.v. de 0.71mg/kg/h pendant 1h, suivi de 0.5mg/kg/h pendant 119 h.	Juin 2010 – Juin 2013	Phase III (ProTECT III)
NCT00704379	Sertraline	Antidépresseur de la famille des inhibiteurs sélectifs de la sérotonine.	TC léger à sévère (Prévention des troubles d'humeur post-TC)	100 mg/jour pendant 6 mois	Juin 2008– Avril 2013	Phase III

Tableau 4 : Les essais cliniques les plus récents sur le traumatisme crânien (www.clinicaltrials.gov).

[1] dérivé synthétique de la lysine, [2] Lisdexamphetamine

CHAPITRE 2 : LA NEURO-INFLAMMATION POST-TC

1. DEFINITION

Le TC déclenche une réponse neuro-inflammatoire prononcée qui est associée à un mauvais pronostic fonctionnel à long terme et qui constitue une cible pharmacologique avec une bonne fenêtre d'opportunité thérapeutique.

La neuro-inflammation est caractérisée par une cascade d'événements consécutifs à l'activation des cellules gliales et à l'infiltration des cellules immunes, conduisant à une libération de cytokines, de chimiokines et de facteurs de régulation des molécules d'adhésion, ayant pour conséquence la migration cellulaire, la prolifération et la phagocytose (Loane et al., 2010). Parmi les différentes cellules gliales, les microglies semblent jouer un rôle particulièrement important dans la réponse neuro-inflammatoire précoce et tardive post-TC. Bénéfique dans certains cas, la production de cytokines pro-inflammatoires par les microglies est plutôt connue pour ses effets délétères dans le cas d'une réponse exacerbée ou persistante comme le TC (Hailer et al., 2008 ; Lloyd et al., 2008 ; Bellander et al., 2010). Le processus neuro-inflammatoire est ainsi directement mis en cause dans l'aggravation des lésions cérébrales aiguës secondaires.

2. LES SOURCES CELLULAIRES DE LA NEURO-INFLAMMATION

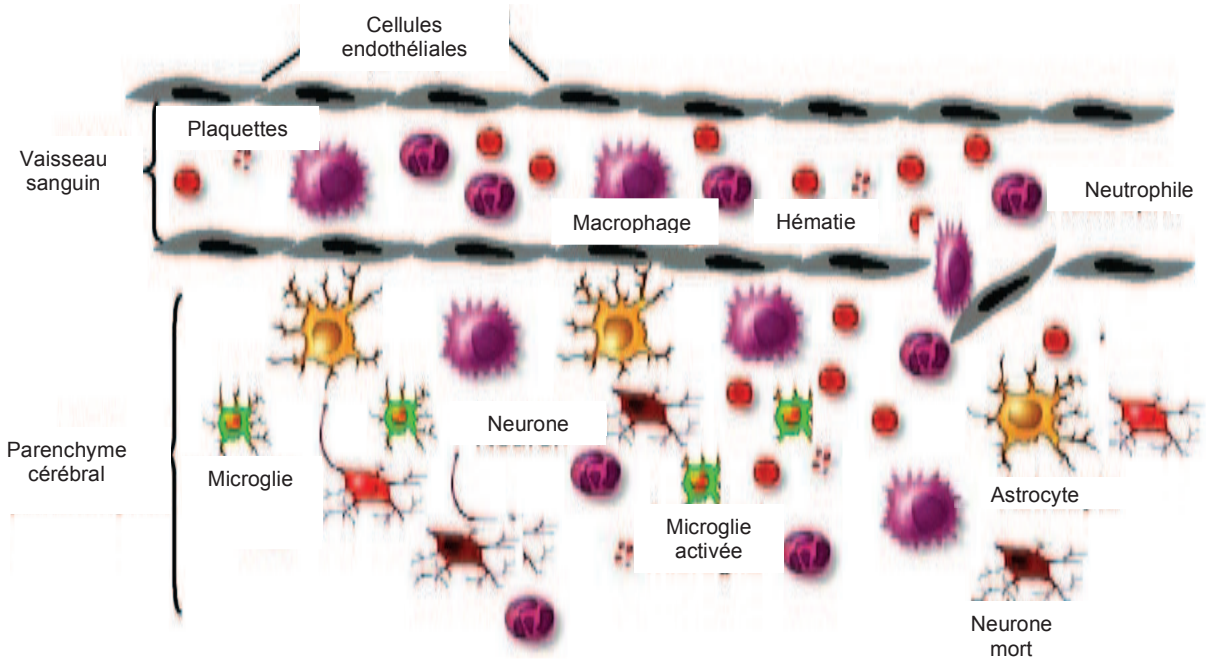
À la suite d'une lésion cérébrale aiguë, la réponse inflammatoire est caractérisée par l'accumulation de cellules inflammatoires et de médiateurs pro-inflammatoires dans le cerveau lésé. Dans le cas d'un TC, les microglies, les astrocytes, ainsi que les leucocytes infiltrés dans le cerveau, sont les principales cellules impliquées dans le processus inflammatoire cérébral **(Fig. 5).**

2.1. Les microglies

GENERALITES

Les microglies sont considérées comme des macrophages immunocompétents du SNC, qui forment un réseau d'alerte avec des macrophages ayant des capacités immunologiques de surveillance et de contrôle. Elles constituent la source cellulaire clé de la neuro-inflammation et représentent environ 5 à 20 % de la population gliale du SNC (Loane et al., 2010). Contrairement aux neurones et aux autres cellules gliales, les microglies sont d'origine hématopoïétique, et leur principale caractéristique est la rapidité de leur activation

en réponse aux événements pathologiques (Hailer et al., 2008 ; Loane et al., 2010). Dans les conditions physiologiques, les microglies ne sont pas passives ou inactives. Elles sont en mode "*standby*" équipées de capteurs ou de récepteurs situés sur leurs ramifications, pouvant détecter dans leur microenvironnement l'activité normale des neurones et les différents neurotransmetteurs et signaux qui sont émis des différentes régions du SNC. De plus, elles peuvent détecter l'apparition, les concentrations inhabituelles ou les aspects modifiés des facteurs solubles et insolubles et par la suite informer à propos des dangers ou des dommages (Van Rossum & Hanisch, 2004).



<u>Figure 5</u> : **La BHE endommagée et les différentes sources cellulaires de la neuro-inflammation à la suite d'un TC** (D'après Ziebell & Morganti-Kossmann, 2010).

L'activation de la microglie est une composante clé dans le système de défense du parenchyme cérébral contre les traumatismes, ainsi que les infections, l'ischémie, les tumeurs et les maladies neurodégénératives. Son activation semble précéder toutes autres réactions cérébrales et consiste de l'adoption d'un phénotype cellulaire « améboïde » (Kreutsberg et al., 1996) **(Fig.6)**. Les effets bénéfiques de l'activation microgliale sont associés à leur participation au nettoyage, à la réparation et à la régénérescence neuronale suite à un endommagement neuronal (Loane et al., 2010). Elles sont capables de détruire le débris potentiellement délétère (Takahashi et al., 2005) et promouvoir la réparation cellulaire en secrétant des facteurs de croissance (Elkabes et al., 1996). Les microglies activées produisent également une grande variété de médiateurs pro-inflammatoires et neurotoxiques, et c'est pour cela que leur activation excessive ou persistante peut devenir pathologique, en favorisant la neurodégénérescence (Cullheim et al., 2007).

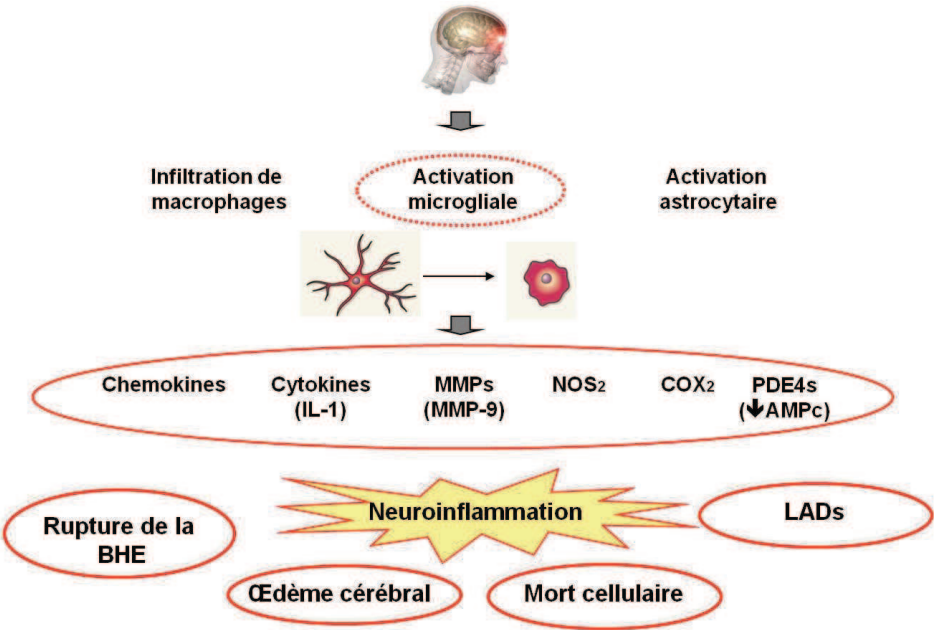


Figure 6: Les conséquences de l'activation microgliale post-TC.

LA REPONSE DES MICROGLIES AU TRAUMATISME CRANIEN

Les microglies jouent un rôle primordial dans la réponse neuro-inflammatoire déclenchée par le TC (Loane et al., 2010). Elles réagissent presque immédiatement au trauma cérébral en subissant des modifications morphologiques, altérant leur statut ramifié en améboïde, en se proliférant, en migrant vers le site de lésion et en sécrétant des différents médiateurs pro-inflammatoires (Hailer et al., 2008 ; Saijo et al., 2011) **(Fig. 7)**. Les microglies activées sont également présentes dans des sites éloignés de la lésion primaire (Aihara et al., 1995). L'activation des cellules microgliales est très précoce chez l'homme et peut persister des mois post-TC (Beschorner et al., 2002 ; Gentleman et al., 2004). Ce profil d'activation microgliale est aussi présent dans les modèles murins de TC expérimental, où l'activation microgliale est observée jusqu'à plusieurs semaines ou mois post-TC (Csuka et al., 2000 ; Raghavendra et al., 2000).

La microglie activée est capable de détruire le débris potentiellement délétère (Takahashi et al., 2005) et de promouvoir la réparation cellulaire en secrétant des facteurs de croissance, tels que le *transforming growth factor* β (TGFβ), le *nerve growth factor* (NGF), l'IL-10 et l'IL-1 *receptor antagonist* (IL-1ra) (Elkabes et al., 1996). Cependant, l'activation microgliale excessive et prolongée est plutôt connue pour ses effets délétères, notamment la sécrétion des substances cytotoxiques, telles que le monoxyde d'azote (NO), des protéases, des dérivés de l'acide arachidonique, des acides aminés excitateurs, des cytokines et des chimiokines (Rappert et al., 2004 ; Morganti-Kossmann et al., 2007 ; Israelsson et al., 2008)

(Fig. 7, 8). La synthèse excessive de ces médiateurs inflammatoires est associée au développement des lésions cérébrales (Allan et al., 2003). En effet, plusieurs gènes associés à la neuro-inflammation ont un profil de surexpression pendant la phase aiguë post-TC chez les rats et les souris (Kobori et al., 2002 ; Natale et al., 2003). Des études focalisées sur les gènes associés aux microglies ont pu montrer que des marqueurs d'activation microgliale (ex.CD68, MHCII) et d'expression des chemokines (ex. CXCL10, CXCL6) sont significativement augmentés post-TC (Israelsson et al., 2008). En outre, la quantité d'ANRm d'une cytokine clé dans la réponse inflammatoire, l'IL-1β, est augmentée pendant les premières heures post-TC et semble suivre le profil d'activation microgliale (Fan et al., 1995). Les effets délétères de l'IL-1β sont dus à l'activation de son récepteur transmembranaire IL-1R1, qui est fortement exprimé par les microglies et les neurones (Pinteaux et al., 2002). Par ailleurs, il a été montré que ce récepteur est essentiel pour l'activation microgliale et l'induction de nombreux médiateurs pro-inflammatoires post-TC (Basu et al., 2002). En dehors de son activité directe, l'IL-1β est donc indirectement délétère, en stimulant des cascades pro-inflammatoires, telles que la voie du TNF-α (Rothwell et al., 2003).

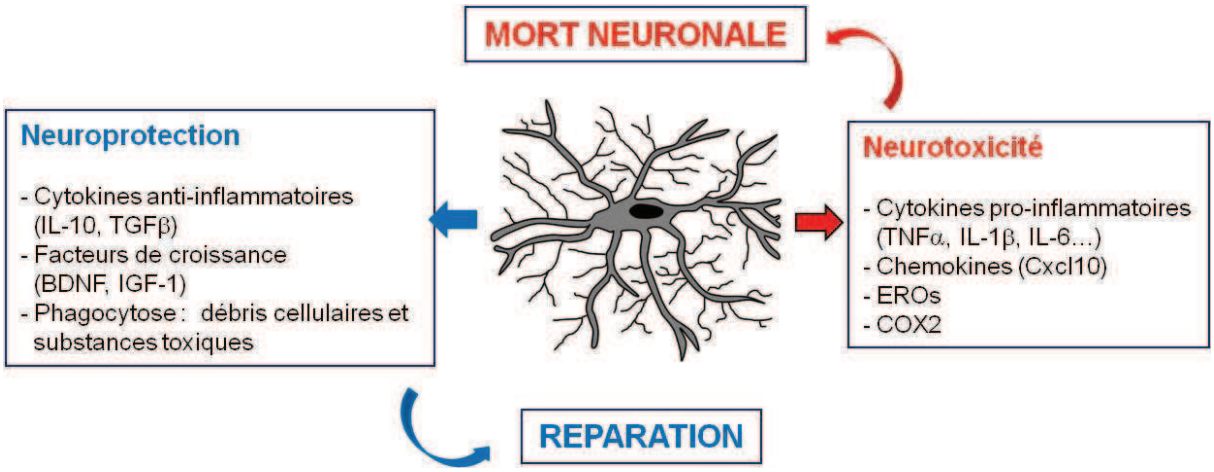


Figure 7 : Le double rôle de la microglie activée (adapté de Loane & Byrnes, 2010).

Nombreuses études ont démontré l'intérêt thérapeutique de l'inhibition microgliale et de la suppression immunitaire dans le TC et le SCI (Carlson et al., 1998 ; Kamiska et al., 2004 ; Sosa et al., 2005 ; Ibarra et Diaz-Ruiz, 2006, Bye et al., 2007 ; Hailer et al., 2008 ; Lloyd et al., 2008). En outre, la suppression de la production d'IL-1β dans les modèles expérimentaux de TC a été démontrée capable de protéger les neurones, réduire l'œdème cérébral et améliorer la récupération cognitive et fonctionnelle (Tehranian et al., 2005, Claussen et al., 2011).

Plus tardivement, la dégénérescence rétrograde de neurones qui sont connectés à la structure endommagée va entraîner une éventuelle atrophie cérébrale, voire un élargissement des ventricules (véntriculomégalie), associés à une cicatrice gliale, qui constitue une barrière physique empêchant la régénérescence des neurones. La dégénérescence Wallérienne des axones est une conséquence directe du TC, due à la mort des corps cellulaires, et elle est favorisée par la neuro-inflammation (Lingor et al., 2012). La dégénérescence Wallérienne est plus lente dans le SNC que dans le SNP, et les microglies-macrophages du SNC peuvent rester sur le site de lésion pour plusieurs années post-TC (Ramlackhansingh et al., 2011). Bien que les microglies évalués tardivement post-TC possèdent un phénotype 'activé', ils ne libèrent pas de cytokines pro-inflammatoires (Palin et al., 2008).

En effet, les données récentes de la littérature suggèrent que les microglies ont des phénotypes très distincts (M1 et M2) et qu'ils peuvent exercer un effet soit toxique, soit protecteur sur les neurones (Colton, 2009 ; Henkel et al., 2009) **(Fig. 8)**. Selon cette proposition, les microglies activées classiquement (M1) sont cytotoxiques du fait de la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires qui sont délétères pour les neurones et qui incluent des cytokines telles que le TNF-α et l'IL-1, des RLs tels que le NO et les superoxyde, des métabolites des acides gras tels que les eicosanoïdes et l'acide quinolinique (Liu & Hong, 2003). En revanche, les microglies activées de façon alternative (M2) bloquent les réponses pro-inflammatoires et produisent des niveaux élevés de cytokines anti-inflammatoires ainsi que des facteurs neurotrophiques (Henkel et al., 2009).

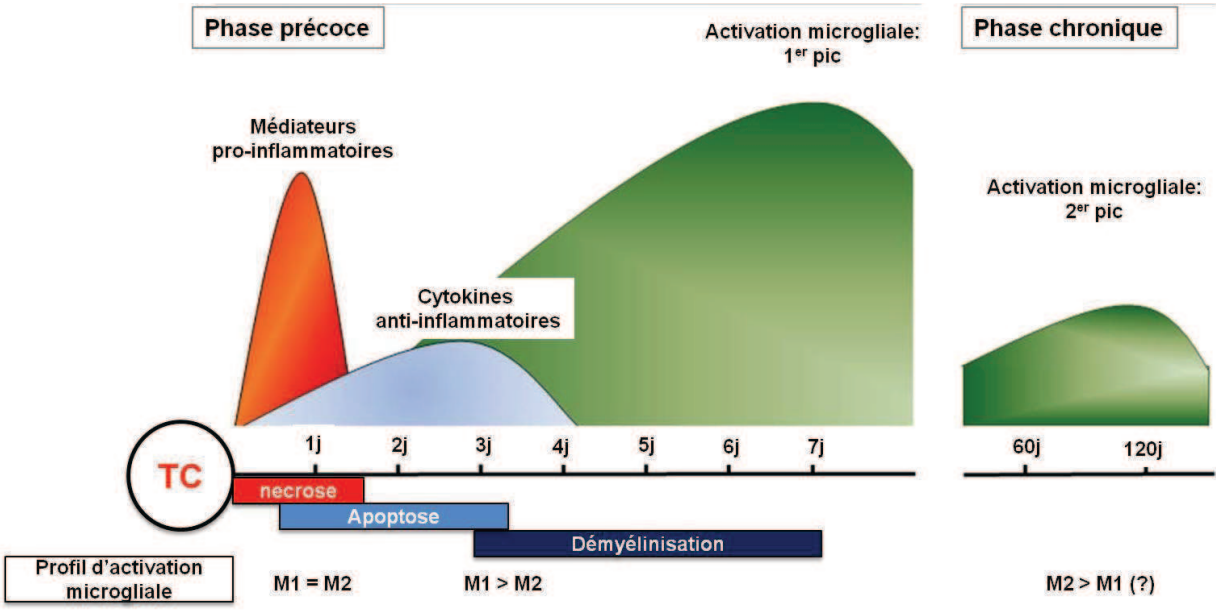


Figure 8 : Schéma représentatif de l'activation microgliale post-TC (Loane & Byrnes, 2010).

2.2. Les astrocytes

GENERALITES

L'astrocyte est le type cellulaire prédominant de l'unité neuro-vasculaire (Laird et al., 2008). Les astrocytes sont anatomiquement en juxtaposition à la fois des neurones et des vaisseaux sanguins. Ils contribuent à la formation de la BHE, régularisent le débit sanguin cérébral en réponse à l'activité neuronale, fournissent les substrats métaboliques pour les neurones et régularisent la balance oxydative dans le cerveau. Les astrocytes expriment de manière constitutive des transporteurs ioniques et plusieurs récepteurs aux neurotransmetteurs. Ils contribuent au maintien de la concentration d'ions et à la clairance du glutamate de la fente synaptique, ce qui indique un rôle important dans la régulation du pH du cerveau et de l'excitabilité neuronale. Ils jouent encore un rôle dans la libération des facteurs solubles qui stimulent la signalisation et la survie neuronale, et la plasticité synaptique (Laird et al., 2008). La reconnaissance de l'importance des astrocytes dans le fonctionnement du cerveau a pris de l'ampleur grâce aux observations récentes de la signalisation interastrocytaire, ainsi que la signalisation bidirectionnelle entre les neurones et les astrocytes au cours de l'activité synaptique (Seth & Koul, 2008). Dans l'ensemble, les astrocytes ont un rôle actif dans la régulation de la physiologie cérébrale en plus de leur rôle du soutien structurel (Laird et al., 2008).

Cependant, en dehors de leur activité réparatrice et protectrice, les astrocytes sont potentiellement délétères suite à un TC, en favorisant l'aggravation des lésions secondaires post-traumatiques (Laird et al., 2008).

LA REPONSE DES ASTROCYTES AU TRAUMATISME CRANIEN

Suite au TC, aussi bien chez l'animal que chez l'homme, les astrocytes s'activent, en subissant une hypertrophie et une hyperplasie cellulaires, des prolongements cytoplasmiques et une augmentation de l'expression de « *Glial Fibrillary Acidic Protein* » (GFAP), une protéine du filament intermédiaire du cytosquelette exprimée par les astrocytes. On parle alors d'une astrogliose. Une concentration sérique importante de la GFAP dans le sérum et le LCR des patients traumatisés crâniens est généralement associée à un mauvais profil clinique (Laird et al., 2008). Les astrocytes sont présents autour de la lésion dès 3 jours et jusqu'à plusieurs mois post-TC (Dietrich et al., 1999; van Landeghem et al., 2006) et produisent différents médiateurs, tels que des cytokines pro- et anti-inflammatoires, des chimiokines, des MMPs (en particulier la MMP-3) et du NO. Ces composants participent à l'élimination des tissus endommagés et créent un milieu favorable pour la réponse réparatrice cicatricielle (Laird et al., 2008). Celle-ci permet d'isoler la région endommagée

pour empêcher une réponse inflammatoire excessive et ainsi limiter la dégénérescence neuronale aux alentours (McGraw et al., 2001). Les astrocytes jouent également un rôle essentiel dans la réparation de la BHE, et leur ablation entraîne une augmentation de l'œdème vasogénique post-TC (Faulkner et al., 2004).

Bien qu'ils soient impliqués dans la protection et la réparation du tissu cérébral après le TC, des données contradictoires montrent que les lésions cérébrales pourraient être corrélées à l'activation des astroglies. En effet, la cicatrice formée par les astrocytes empêche éventuellement la régénérescence des neurones et la remyélinisation des axones dans les lésions traumatiques cérébrales (Carmen et al., 2007) et médullaires (Menet et al., 2003). En outre, des études chez l'homme et chez les rongeurs ont montré que le TC induit une diminution de transporteurs de glutamate GLT-1 et GLAST, au sein des astrocytes, ayant comme conséquence un dysfonctionnement de la régulation du niveau de glutamate par les astrocytes (Beschorner et al., 2007). Ces résultats suggèrent que la réponse excitotoxique post-TC pourrait être favorisée par l'incapacité des astrocytes à maintenir l'homéostasie glutamatérgique. Par conséquent, la viabilité et le bon fonctionnement des astrocytes semblent être des éléments critiques.

2.3. Les cellules sanguines

La réponse neuro-inflammatoire post-TC fait intervenir différentes variétés de cellules sanguines de la périphérie **(Fig. 9)**, mise en évidence dans des modèles expérimentaux ainsi que chez les patients traumatisés crâniens (Hausmann et al., 1999; Morganti-Kossmann et al., 2007). Après le TC, des cellules sanguines circulantes sont attirées par des molécules chimiotactiques vers les tissus lésés. Elles se mettent à rouler le long de la paroi endothéliale, adhèrent à cette paroi grâce à des molécules d'adhésion, et enfin elles passent entre les cellules endothéliales afin d'atteindre le tissu cérébral lésé et d'être activées. Par la suite, elles phagocytent les cellules mortes et les débris cellulaires et produisent des facteurs neurotrophiques en favorisant la réparation tissulaire cérébrale. D'autre part, elles aggravent les dommages post-traumatiques en libérant des substances délétères comme des cytokines pro-inflammatoires, des enzymes telles que des protéases, des MMPs et des RLs tels que les anions superoxyde et du NO suite à l'activation de la NOS2.

Les neutrophiles polymorphonucléaires (PMNs) sont les premières cellules infiltrées dans le parenchyme cérébral suite à une lésion de la BHE. Ils apparaissent rapidement après le trauma et participent directement à l'aggravation des lésions secondaires, tels que l'œdème cérébral (Lindbom et al., 2003). Chez l'homme, l'apparition des PMNs dans le parenchyme cérébral est très précoce, vers 2h après le trauma, et peut persister jusqu'à 4 semaines post-TC (Hausmann et al., 1999). Dans les modèles de TC expérimental,

l'augmentation de neutrophiles a été montrée très significative pendant les premières 24h post-trauma (Soares et al., 1995). Leur adhésion est médiée par la protéine l'ICAM-1 (*endothélial intercellular adhesion molecule*), dont l'expression est augmentée dans les modèles de TC expérimental (Carlos et al., 1997). Quand les PMNs sont recrutés au site de la lésion, ils libèrent une pléthore des médiateurs vasoactifs et des substances cytotoxiques telles que les RLs, des protéases et des cytokines pro-inflammatoires, qui sont toutes susceptibles d'altérer la perméabilité de la BHE (Lenzlinger et al., 2001). Dans une étude menée sur des modèles de TC et de SCI, le recrutement des PMNs a été observée dans la zone de rupture de la BHE, suggérant un rôle des PMNs dans l'altération de la perméabilité vasculaire et le développement des lésions secondaires (Schnell et al., 1999). En outre, chez l'homme, les concentrations d'ICAM-1 soluble dans le LCR sont corrélées à la rupture de la BHE dans les TC sévères (Pleines et al., 1998). Par ailleurs, il a été montré que la déplétion des neutrophiles entraîne une réduction de l'œdème cérébral suite à un TC chez la souris (Kenne et al., 2012). Cependant, les stratégies ayant comme cible la désactivation des PMNs ne se sont pas avérées intéressantes par rapport à leur effet sur la perméabilité de la BHE (Whalen et al., 1999, Kenne et al., 2012).

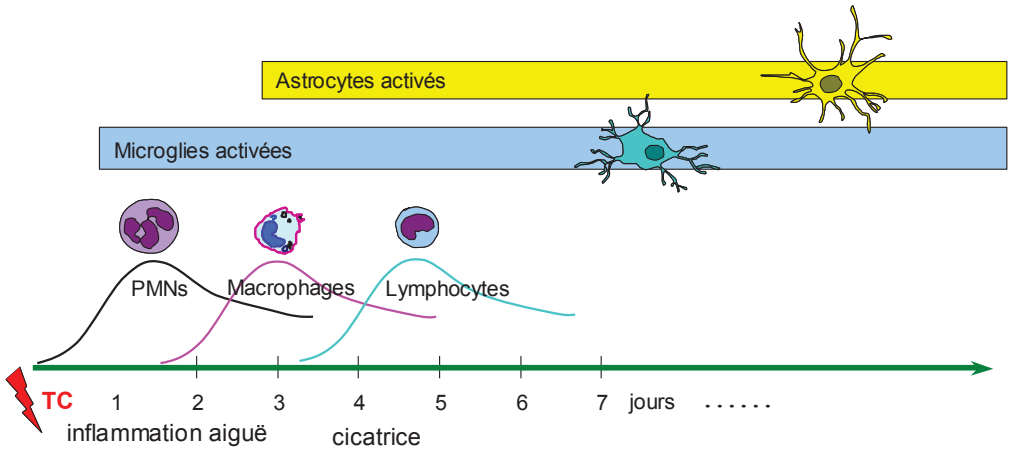


Figure 9 : Représentation schématique de la cinétique post-TC des cellules inflammatoires.

Les études immunologiques ont aussi démontré la présence de macrophages infiltrés ainsi que de lymphocytes de type « *natural killer* » (NK), de type T cytotoxique, ainsi que de type T suppresseur, qui sont présents au niveau du parenchyme cérébral précocement et qui atteignent leur pic à 48h voire à 7 jours après le TC, selon le modèle expérimental utilisé (Holmin et al., 1995 ; Soares et al., 1995; Clausen et al., 2007). Il est important de souligner que la plupart des études ne différencient pas les macrophages des cellules microgliales, car ces deux cellules sont issues de la lignée monocytaire et expriment les mêmes marqueurs cellulaires (ex. CD11b) au moment de l'activation, ce qui fait que le rôle des macrophages reste encore peu étudié dans les maladies du SNC. Quant aux lymphocytes, les données sur

leur infiltration suite au TC sont limitées. L'infiltration lymphocytaire arrive en général plus tardivement par rapport à celle des PMNs (Degos et al., 2008). Ils infiltrent le parenchyme cérébral dans 2-3 jours, selon le modèle de TC étudié (Holmin & Mathiesen, 1995; Lenzlinger et al., 2001). Le rôle exact des lymphocytes T dans les lésions cérébrales secondaires post-TC n'est pas encore élucidé, mais il semble être à la fois bénéfique, *via* des activités anti-inflammatoires et neuroprotecteurs, et délétère, en exacerbant les lésions cérébrales post-TC (Fee et al., 2003 ; Arumugam et al., 2005).

3. LES COMPOSANTS MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LE PROCESSUS NEURO-INFLAMMATOIRE POST-TC

Comme précédemment détaillé, les sources cellulaires des médiateurs de la neuro-inflammation sont les neurones, les cellules gliales (astrocytes et microglies) résidentes du SNC, ainsi que les cellules infiltrées dans le parenchyme cérébral telles que les PMNs, les monocytes/macrophages et les lymphocytes, qui provoquent une augmentation de médiateurs de l'inflammation au niveau local. Ces médiateurs sont des cytokines pro- et anti-inflammatoires, des molécules d'adhésion, des enzymes et des RLs. Leur expression ainsi que leur production sont augmentées au niveau cérébral et au niveau systémique, soulignant leur rôle dans le processus neuro-inflammatoire.

3.1. Les cytokines

La cascade inflammatoire activée après un TC est mise en jeu par la libération des cytokines pro- et anti-inflammatoires, qui sont des polypeptides, détectables normalement dans les tissus sains et rapidement surexprimés en réponse aux situations pathologiques et au stress. Outre leur implication dans les processus immunitaires, les cytokines agissent aussi comme médiateurs de la communication intercellulaire et jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie tissulaire de l'organisme adulte (Wang & Shuaib, 2002; Ziebell & Morganti-Kossmann, 2010). Compte tenu de leurs propriétés fonctionnelles, les cytokines dérivées des neurones sont principalement impliquées dans la communication cellulaire, tandis que les cytokines dérivées des cellules gliales ont un rôle de médiateur dans la croissance neuronale, la survie et la réparation. Leur taux augmente suite à certaines maladies neurodégénératives et accidents cérébraux (Ziebell & Morganti-Kossmann, 2010).

L'ensemble des données cliniques et expérimentales soulignent le rôle primordial des cytokines dans la phase neuro-inflammatoire post-TC (Lucas et al., 2006; Morganti-Kossmann et al., 2007). Elles peuvent activer directement la capacité immunitaire des neurones, des microglies, des astrocytes, des macrophages et des cellules endothéliales cérébro-vasculaires. Les cytokines activent les cellules gliales, et ces dernières produisent

des cytokines en réponse aux stimuli *in vitro* et *in vivo* (Giulian et al., 1986 ; Loane et al., 2010).

Parmi les différentes cytokines, les interleukines IL-1, IL-6 et IL-10 ainsi que les TNFα et TGFβ semblent jouer un rôle primordial dans la réponse immunitaire post-TC (Wang & Shuaib, 2002; Morganti-Kossmann et al., 2007; Ziebell & Morganti-Kossmann, 2010). Dans les modèles expérimentaux, ainsi que chez les patients traumatisés crâniens, les concentrations de ces cytokines sont augmentées dans le parenchyme cérébral (Hutchinson et al., 2007), le LCR (Kossmann et al., 1996; Shiozaki et al., 2005) et le plasma (Arand et al., 2001) dès les premières heures qui suivent le trauma. Les microglies et les macrophages activés sont les principales sources cellulaires de cytokines, même si les astrocytes, les PMNs, les lymphocytes T et les cellules endothéliales en produisent également.

La famille de l'IL-1 (IL-1β, l'IL-1α, L'IL-1 *receptor antagonist* (IL1ra) et l'IL-18) joue un rôle bien établi dans la réponse inflammatoire post-traumatique. Tous les membres de cette famille sont exprimés dans le SNC sain et sont surexprimés suite à un trauma crânien (Helmy et al., 2011). Les microglies, les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones sont tous capables de synthétiser l'IL-1 et expriment également le récepteur de signalisation de l'IL-1 (Fogal & Hewett, 2008). L'IL-1β constitue, plus précisément, la cytokine la mieux étudiée dans le TC expérimental. Sa production est significativement augmentée dans le TC expérimental, de 1h jusqu'au moins 12h post-TC selon le modèle expérimental (Vecil et al., 2000 ; Kamm et al., 2006 ; Brough et al., 2011), et cette augmentation a été également rapportée dans le LCR et le cerveau humain suite à un TC (Fogal & Hewett, 2008). L'augmentation de la concentration de l'IL-1β est associée à l'aggravation des dommages secondaires dans les modèles animaux de TC, et son inhibition entraîne des effets anti-inflammatoires, anti-œdémateux et neuroprotecteurs (Clausen et al., 2009, 2011).

L'Interleukine-6 (IL-6) est également bien connue pour son rôle neuro-inflammatoire. Elle est produite par les cellules endothéliales, les astrocytes, les microglies et les neurones, et elle est détectable dès 1h post-TC (Morganti-Kossmann et al., 2007). Il a été décrit qu'un taux élevé d'IL-6 est associé à un mauvais pronostic (Winter et al., 2004). L'IL-6 joue un double rôle dans la neuro-inflammation post-TC, ayant à la fois des propriétés anti-inflammatoires, telles que l'inhibition du TNFα et l'induction de l'IL-1ra, et des propriétés inflammatoires, en agissant sur le chimiotactisme par la production des chimiokines et l'expression des molécules d'adhésion (Morganti-Kossmann et al., 2007).

Le TNFα est une cytokine pro-inflammatoire de 17 kDa dont la production est rapidement augmentée suite à une lésion cérébrale telle que le TC, à l'origine de dommages

secondaires. Dans des modèles expérimentaux, il est détectable dès 1h post-TC et semble atteindre son maximum à 4h post-TC (Shohami et al., 1994; Knoblach et al., 1999). En tant que médiateur précoce, il exerce plusieurs fonctions décrites ci-dessus pour l'IL-1. Le TNFα affecte l'intégralité de la BHE, favorisant l'œdème cérébral, le recrutement des leucocytes et la production massive d'un grand nombre de cytokines pro- et anti-inflammatoires, des chimiokines et des molécules d'adhésion (Lenzlinger et al., 2001). C'est pour cela que son inhibition dans la phase aiguë pourrait exercer des effets protecteurs, en diminuant la formation d'œdème et en améliorant la récupération fonctionnelle (Knoblach et al., 1999 ; Shohami et al., 1999). Pourtant, des données contradictoires ont également attribué un rôle bénéfique au TNFα. Plus précisément, l'induction du NGF dans les astrocytes par le TNFα pourrait être un des mécanismes par lequel les cytokines pro-inflammatoires exercent un effet protecteur (Shohami et al., 1999 ; Kuno et al., 2006).

Le TGF-ß et l'IL-10 sont parmi les différentes cytokines ayant un rôle bénéfique dans le TC. Ils exercent des effets immunosuppresseurs *via* l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNFα, l'IL-1 et l'interféron (IFN)-γ. Le TGF-ß est significativement présent dans le LCR à 24h, tandis que les niveaux d'IL-10 augmentent au cours des premières 24 heures post-TC en corrélation avec la diminution du TNFα (Morganti-Kossmann et al., 2007).

3.2. Les chimiokines

Les chimiokines regroupent environ 50 petites protéines de 8 à 14 kDa qui régulent l'activation et la migration des leucocytes et jouent un rôle fondamental dans l'embryogenèse du système nerveux, l'homéostasie et dans la défense de l'organisme (Lynch, 2009 ; Ransohoff, 2009). Dans le SNC, les chimiokines sont sécrétées par les cellules gliales et les neurones. Ces cellules expriment également une variété de récepteurs de chimiokines. De nombreuses données ont montré la contribution des chimiokines, telles que l'IL-8, au développement des lésions cérébrales secondaires, principalement à cause de leur participation au recrutement des leucocytes activés au sein de la lésion (Ziebell & Morganti-Kossmann, 2010). Elles contribuent également à l'augmentation de la perméabilité de la BHE et à la formation d'œdème cérébral (Stamatovic et al., 2006). En effet, des concentrations élevées de l'IL-8 ont été détectées dans le LCR humain post-TC, et elles ont été associées à un dysfonctionnement sévère de la BHE (Kossmann et al., 1997). Cependant, l'IL-8 est aussi capable de stimuler la production de NGF par les astrocytes *in vitro*, suggérant qu'elle pourrait exercer des effets neurotrophiques dans certains contextes (Morganti-Kossmann et al., 2001).

3.3. Les molécules d'adhésion

Trois grandes familles de molécules d'adhésion interviennent dans les interactions entre les leucocytes et l'endothélium : les séléctines, les membres de la superfamille des immunoglobulines et les intégrines (Man et al., 2007).

Les molécules d'adhésion intercellulaires (ICAM-1 et -2) et vasculaire (VCAM-1) sont des immunoglobulines qui jouent un rôle dans l'adhésion des PMNs aux cellules endothéliales. Les interactions d'ICAM-1 ou de VCAM-1 avec les intégrines, permettent de ralentir et d'orienter les PMNs vers la zone lésée. Les molécules d'adhésion participent ainsi à l'infiltration des leucocytes dans le parenchyme cérébral après un TC (Lynch, 2009). Une expression accrue des molécules d'adhésion, telles que l'ICAM-1, est observée dans différents modèles de TC, et elle est détectable dès 3h jusqu'à 3 à 7 jours (Williams et al., 2007). En pré-clinique et en clinique, une augmentation d'ICAM-1 est également corrélée avec un mauvais pronostic (Williams et al., 2007).

3.4. Les métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMPs)

Les MMPs sont des enzymes généralement distribuées de manière ubiquitaire, synthétisées sous forme de pro-enzyme (zymogènes ou proMMP) qui devient active une fois clivée (Yong et al., 2001). Les macrophages et les PMNs sont des sources importantes des MMPs (Pagenstecher et al., 1998). Les neurones, les astrocytes, les microglies et les cellules endothéliales peuvent également produire des MMPs (Wang et al., 2002b). Ces enzymes jouent un rôle physiologique en participant à l'apoptose, le développement embryonnaire, la migration cellulaire, l'angiogenèse et le remodelage tissulaire.

Dans des conditions physiopathologiques, comme le cancer, la maladie d'Alzheimer ou l'ischémie cérébrale, ces enzymes dégradent l'intégrité de composants de la matrice extracellulaire, comme les glycoprotéines de la lame basale, la fibronéctine, la laminine, les protéines des jonctions serrées et les collagènes, qui sont tous composants structuraux de la BHE (Bauer et al., 2010). Dans le TC et l'ischémie cérébrale, les MMPs peuvent dégrader différents constituants de la lame basale entourant les vaisseaux sanguins et, par conséquent, elles participent à la formation de l'œdème et de l'hémorragie, ainsi qu'au développement des lésions secondaires (Mori et al., 2002). Les principales MMPs étudiées dans le TC et ayant un rôle dans la dégradation de la BHE, sont la MMP-2 et la MMP-9 (Yong et al., 2001). L'augmentation de l'activité proMMP-9 est corrélée à une augmentation de la perméabilité de la BHE et à la formation d'un œdème (Shigemori et al., 2006). De plus, il a été montré que l'inhibition non sélective des MMPs réduit la perméabilité de la BHE et l'œdème cérébral post-TC (Shigemori et al., 2006), soulignant le rôle délétère des MMPs dans les conséquences post-traumatiques.

3.5. NO, NO synthases (NOS) et cyclo-oxygénases (COX)

Le NO est le radical libre synthétisé par les NO synthases (NOS), *via* l'oxydation séquentielle qui transforme l'acide aminé L- arginine en L-citrulline. Trois isoformes de NOS ont été identifiés, la NOS neuronale (NOSn ou NOS_1), majoritairement exprimée par les neurones, la NOS endothéliale (NOSe ou NOS_3), principalement exprimée par les cellules endothéliales et la NOS inductible (NOSi ou NOS_2) Ca^{2+}- indépendante, qui est exprimée dans les cellules musculaires lisses, les PMNs, les neurones, les macrophages, les astrocytes et les oligodendrocytes. L'expression de la dernière est stimulée en réponse à différents médiateurs pro-inflammatoires, aux endotoxines, ainsi qu'à d'autres stimuli (Pannu & Singh, 2006). La synthèse de NO à partir de 2 isoformes constitutives, NOS_1 et NOS_3, est Ca^{2+}- dépendante, et c'est pour cela qu'un certain nombre d'agonistes qui affectent le niveau de Ca^{2+} intracellulaire interfèrent également avec la synthèse du NO (Pannu & Singh, 2006).

A part sa fonction physiologique, qui est principalement la vasodilatation et la transduction des signaux impliqués dans la plasticité synaptique et la neurogenèse, le NO peut également générer des espèces réactives de l'azote, telles que le di-azote tri-oxyde (N_2O_3) et le péroxynitrite ($ONOO^-$), qui sont neurotoxiques et bien présents dans les conditions inflammatoires et neurodégénératives (Pannu & Singh, 2006).

Des études cliniques et précliniques ont montré que l'ARNm et l'expression de la NOS_2 sont augmentés après un TC (Gahm et al., 2000 ; Jafarian-Tehrani et al., 2005). Plus précisément, l'expression de la NOS_2 est détectable à partir de 6h et jusqu'à 72h post-TC, alors que chez l'homme, son expression peut persister jusqu'à 8 jours post-TC (Orihara et al., 2001; Gahm et al., 2002). De plus, une augmentation biphasique et massive du niveau de NO a été décrite, définissant une première vague dans les premiers 5 à 30 minutes et d'une deuxième plus tardive, vers 6h post-TC (Cherian et al., 2004).

Les travaux du laboratoire ont été les premiers à montrer le rôle délétère de la NOS_1. Selon ceux-ci, l'inhibition sélective de la NOS_1 entraîne une atténuation des conséquences histologiques et fonctionnelles après un TC chez la souris (Mésenge et al., 1996). En outre, l'inhibition sélective de la NOS_2 dans la phase aiguë post-TC a été démontré capable de réduire les déficits histologiques et fonctionnels (Jafarian-Tehrani et al., 2005; Louin et al., 2006). L'ensemble des données du laboratoire et celles de la littérature souligne le rôle délétère de la NOS_2 dans la phase aiguë du TC, ainsi que l'intérêt thérapeutique de son inhibition. Cependant, des études avec des souris $NOS_2^{-/-}$ montrent que la NOS_2 pourrait jouer aussi un rôle neuroprotecteur (Bayir et al., 2005).

Les cyclo-oxygénases (COX) sont une famille d'enzymes impliquées dans la transformation de l'acide arachidonique issu des phospholipides membranaires en prostaglandines (PGs) et thromboxane. Il existe, à ce jour, trois isoformes des COX, la

COX-1 et -2, et la COX-3 (ou COX-1b) qui sont issues de l'épissage alternatif du gène de la COX-1. L'expression de la COX-1 est constitutive, mais une augmentation de son expression a été observée post-TC, à la fois chez l'homme et chez les rongeurs (Schwab et al., 2001 ; 2002). La COX-2 est majoritairement inductible, et exprimée principalement par les microglies, les macrophages et les cellules endothéliales. Dans les conditions physiopathologiques, les cytokines, les facteurs de croissance ainsi que les endotoxines bactériennes peuvent stimuler l'expression de la COX-2 (Phillis et al., 2006). L'activation de la COX-2 entraîne par la suite une production de prostaglandines, de thromboxane et de RLs, qui participent à différentes étapes inflammatoires, telles que la coagulation et la douleur (Strauss & Marini, 2002).

Dans les modèles expérimentaux de TC, l'expression de la COX-2 est observée dès 2-6h post-TC et peut durer jusqu'à 7 jours (Strauss et al., 2000). Cependant, le rôle joué par cette enzyme dans le TC reste controversé.

En conclusion, le TC déclenche une réaction inflammatoire qui est dépendante de la sévérité et du site de l'impact. C'est un ensemble de cascades complexes qui peut être à la fois bénéfique, par rapport à la réparation et la cicatrisation du tissu, mais surtout délétère quand elle est excessive et/ou persistante. Cette réponse implique l'intervention de différents types cellulaires, à la fois centrales et périphériques, et conduit à l'expression et la libération de plusieurs médiateurs neuro-inflammatoires qui participent éventuellement au développement des lésions secondaires, avec notamment la formation d'un œdème cérébral et l'aggravation des lésions focales et diffuses. Ces dernières sont caractérisées par l'accumulation de la glycoprotéine βAPP au sein des axones lésés. En outre, l'environnement neuro-inflammatoire post-TC est associé à la perturbation de la protéolyse du βAPP, en défaveur de sa forme soluble sAPPα, qui est une protéine neuroprotectrice endogène. Plus tardivement, cet environnement post-lésionnel complexe va engendrer une atrophie cérébrale et une ventriculomégalie, souvent accompagnées d'une cicatrice gliale. Ces modifications biochimiques et histologiques sont également traduites par des dysfonctionnements sensorimoteurs, et cognitifs, associées à un risque accru de la survenue tardive de l'épilepsie ou des troubles neurodégénératifs.

En raison de l'évidence du rôle neuroprotecteur de la sAPPα et de la perturbation de sa production post-TC, la stimulation de la voie non-amyloïdogénique du βAPP semble être une approche thérapeutique prometteuse pour le traitement du TC.

CHAPITRE 3 : LE PRECURSEUR DU PEPTIDE BETA AMYLOÏDE ET SA PROTEOLYSE PAR LES SECRETASES

1. LE PRECURSEUR DU PEPTIDE BETA AMYLOIDE (βAPP)

1.1. Généralités

Le βAPP fait partie d'une famille des protéines comprenant également des APLP (pour « ***A**myloid **P**recursor-**L**ike **P**roteins* ») qui est très bien conservée sur le plan de l'évolution (Van den Hulk et al., 2001). Elle est une grande protéine transmembranaire encodée par un seul gène situé sur le chromosome 21, et elle est présente dans toutes les cellules, y compris les neurones, au poids moléculaire de 100 à 135 kDa (Selkoe et al., 1988 ; Turner et al., 2003). Il existe quatre isoformes de βAPP (APP_{770}, APP_{751}, APP_{733} et APP_{695}) dont la variation de l'expression au cours du développement suggère leur implication différentielle dans l'ontogenèse du SNC.

Le βAPP est transportée le long de la voie de sécrétion du réticulum endoplasmique à l'appareil Golgi puis à la membrane plasmique (Tomimoto et al., 1995). Il présente des distributions membranaires variables selon les différentes régions du cerveau. Dans l'hippocampe, le βAPP est retrouvé de façon spécifique sur les membranes pré-synaptiques, alors que dans le cervelet il est localisé aux membranes pré- et post-synaptiques (Ribaut-Barrassin et al., 2000). La coexistence de ces deux types d'organisation au sein des synapses n'a pas de signification physiologique connue mais donne des indications sur une éventuelle fonction dans la maintenance structurale des synapses. La demi-vie du βAPP est relativement courte et la protéine étant rapidement clivée ou internalisée vers les endosomes (Weidemann et al., 1989).

Le βAPP peut subir deux voies de protéolyse, la voie physiologique ou non-amyloïdogénique, qui est sous le contrôle des enzymes α–sécrétases et γ-sécrétases, générant la partie soluble sAPPα, qui est une protéine neuroprotectrice endogène (Thornton et al., 2006 ; Corrigan et al., 2011 ; 2012 ; Kögel et al., 2011) **(Fig. 11)**. L'autre voie de protéolyse, la voie amyloïdogénique, apparaît plutôt dans des conditions pathologiques et neuro-inflammatoires, comme la maladie d'Alzheimer (O'Brien et Wong, 2011). Elle est sous le contrôle des enzymes β et γ-sécrétases, responsables de la production du peptide neurotoxique Aβ (De Strooper et Annaert, 2000) **(Fig. 12)**. La localisation du gène codant du βAPP sur le chromosome 21 explique pourquoi les patients atteints de trisomie 21 sont très souvent touchés par la maladie d'Alzheimer ou par une démence vasculaire, due à des dépôts amyloïdes dans la paroi des vaisseaux (Perluigi et

al., 2012). En raison de l'évidence de la perturbation du métabolisme du βAPP au cours de certaines maladies neurodégénératives, de nombreuses recherches se sont focalisées sur la compréhension des rôles physiologiques du βAPP et de ses dérivés (Turner et al., 2003 ; Chasseigneaux et al., 2012).

1.2. La structure et le rôle physiologique du βAPP

Le ßAPP est composé d'un domaine extracellulaire long N-terminal, qui contient la structure d'un facteur de croissance suivi par un site de liaison pour le cuivre (CuBD) **(Fig. 10)**. Ces deux régions constituent ensemble le domaine riche en cystéine de la molécule, considéré comme un médiateur important de la plasticité, la croissance et les interactions neuronales, et qui semble être à l'origine des effets neuroprotecteurs produits par la sAPPα (Corrigan et al., 2011). Le ßAPP contient également un domaine acide, un domaine glucidique, une partie transmembranaire où se trouve le site de clivage des ß-sécrétases (responsables de la production du peptide neurotoxique Aß) et, enfin, une queue cytosolique C-terminale **(Fig. 10)**. Certains isoformes du ßAPP contiennent également un inhibiteur des protéases de type *Kunitz* (KPI) et un OX-2, qui se trouvent entre les domaines acide et glucidique de la molécule (Turner et al., 2003 ; Corrigan et al., 2011).

Malgré le nombre important d'études réalisées sur le βAPP, les véritables fonctions de cette protéine ne sont pas encore entièrement élucidées. Il jouerait un rôle dans la formation des synapses, la plasticité neuronale et la potentialisation à long terme (Priller et al., 2006), et pourrait également agir comme un récepteur membranaire et/ou comme une molécule d'adhésion et réguler la transduction du signal vers l'intérieur de la cellule (Okamoto et al., 1995 ; Brouillet et al., 1999 ; Soba et al., 2005). Il a été également décrit que le βAPP pourrait réguler les concentrations de Ca^{2+} intracellulaire (Barger et Mattson, 1996) et promouvoir la croissance des neurones (Turner et al., 2003 ; Chen et al., 2006).

En ce qui concerne le TC, l'immunomarquage du ßAPP est la meilleure technique pour démontrer la présence des LADs dans les conditions expérimentales (Gentleman et al., 1993; Stone et al., 2000). Les LADs peuvent être détectées par l'accumulation axonale du ßAPP, dans les heures qui suivent le TC chez les rongeurs (Stone et al., 2000) et dans des échantillons de cerveau post-mortem des patients traumatisés crâniens (Gentleman et al., 1993). En effet, divers mécanismes neuroprotecteurs et neurotrophiques sont activés en réponse du TC afin de promouvoir la phase de réparation tissulaire, et l'augmentation de la production et de l'expression du βAPP post-TC par les neurones et les astrocytes activés est considéré comme un tel processus (Chen et al., 2004a ; Corrigan et al., 2012a). Effectivement, cette augmentation du βAPP post-TC semble être une réponse physiologique suite au stress neuronal (Gentleman et al., 1993) et il a été également décrit dans le

contexte d'ischémie cérébrale expérimentale (Popa-Wagner et al., 1998 ; Nihashi et al., 2001). Le métabolite sAPPα, exerce des effets neuroprotecteurs et neurotrophiques bien décrits post-TC (Thornton et al., 2006 ; Corrigan et al., 2011 ; 2012b). Cependant, l'accumulation axonale du βAPP a été associée à la perturbation de la protéolyse du βAPP post-TC, en faveur de la voie amyloïdogénique et la production du peptide neurotoxique Aβ (Chen et al., 2004a). Les raisons de cette perturbation restent encore non-élucidés.

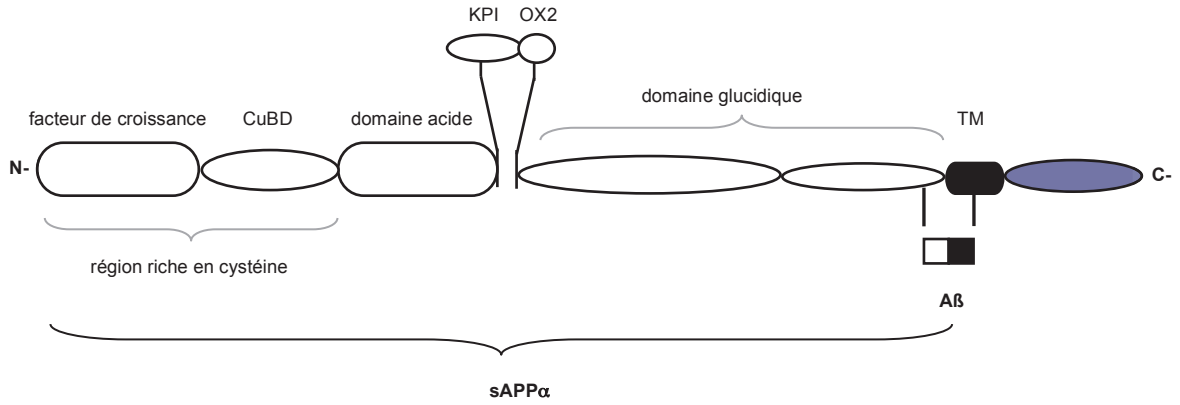


Figure 10 : Représentation des différents domaines de la molécule βAPP (Turner et al., 2003).

1.3. Les deux voies de protéolyse du βAPP

Les deux voies de protéolyse du βAPP libèrent des grands fragments d'environ 600 acides aminés par le domaine N-terminal extracellulaire, et des fragments relativement petits (83 à 99 acides aminés) par le domaine C-terminal intracellulaire (Turner et al., 2003).

La voie non-amyloïdogénique de la protéolyse du ßAPP **(Fig. 11)** est la voie prédominante et physiologique qui débute sous le contrôle des enzymes α-sécrétases, responsables de la sécrétion dans le milieu extracellulaire de la sAPPα, une protéine soluble de 612 acides aminés (De Strooper et Annaert, 2000). Le clivage par les α-sécrétases se déroule au sein du peptide Aβ, entre la lysine 16 et la leucine 17, empêchant ainsi la production des peptides amyloïdes. Ce clivage peut avoir lieu au sein du réseau *trans*-golgien ou bien au niveau de la membrane plasmique, puis la sAPPα est libérée dans l'espace extracellulaire. Le fragment C-terminal du ßAPP qui est retenu à la membrane (C83) est ensuite clivé par l'activité des enzymes γ-sécrétases, appartenant à la famille des présénilines, pour générer deux petits fragments, le peptide de 7 acides aminés *APP IntraCellular Domain* (AICD) et le peptide P3 (3 KDa) (Lammich et al., 1998). La fonction de ces petits peptides n'est pas bien connue (Nunan et Small, 2000).

La voie amyloïdogénique **(Fig. 12)**, qui apparaît plutôt dans les conditions pathologiques et neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer, est caractérisée par

l'action séquentielle des β- et γ-sécrétases. La première enzyme à agir est la β-sécrétase qui coupe le βAPP et produit ainsi le fragment soluble sAPPβ et un fragment C99, qui reste transmembranaire et contient toute la séquence de l'Aβ intacte. Le fragment C99 peut alors subir le clivage par la γ-sécrétase, ce qui va conduire à la libération du peptide amyloïde et d'un fragment C-terminal (AICD).

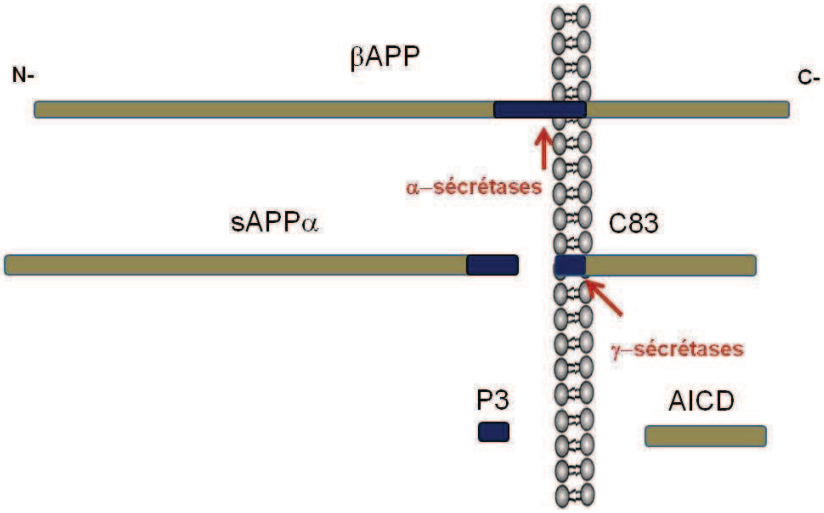


Figure 11 : La voie non-amyloïdogénique de protéolyse du ßAPP. L'action des α-sécrétases sur le βAPP produit le fragment neuroprotecteur sAPPα et C83. L'action des γ-sécrétases sur le fragment C83 libère les fragments P3 et AICD (De Strooper et Annaert, 2000).

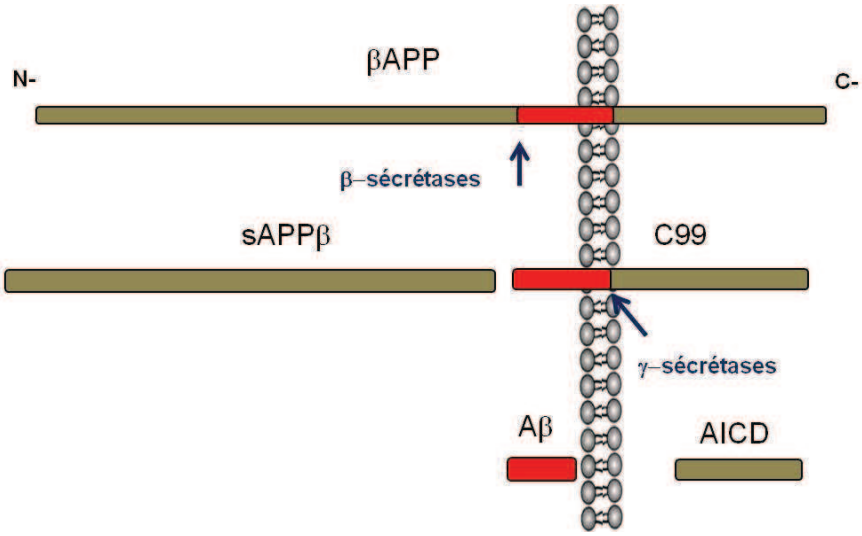


Figure 12 : La voie amyloïdogénique de protéolyse du ßAPP. L'action des β-sécrétases sur le βAPP produit le fragment sAPPβ et C99. L'action des β-sécrétases sur le fragment C99 libère le fragment Aβ et un produit C-terminal AICD (De Strooper et Annaert, 2000).

Le peptide Aß, à part la formation de plaques amyloïdes neurotoxiques (Chen et al., 2004a), est directement cytotoxique, *via* l'activation des voies inflammatoires et pro-apoptotiques, cascades biochimiques qui entraînent une neurodégénérescence aiguë ou chronique (Walsh et al., 2002). Le clivage par les β- et γ-sécrétases peut survenir au niveau du réticulum endoplasmique, au sein du réseau *trans*-golgien ou bien au niveau de la membrane plasmique. L'équilibre entre la production et la dégradation du peptide Aß se stabilise dans les conditions normales à un seuil en dessous duquel le peptide reste soluble, et le dérèglement de cet équilibre peut conduire à l'accumulation du peptide Aß insoluble dans le système limbique et, plus particulièrement, dans l'hippocampe, entraînant la formation de plaques amyloïdes (De Strooper et Annaert, 2000).

2. LES SECRETASES

2.1. Les α-sécrétases (ADAMs)

Généralités

Les enzymes α-sécrétases sont des membres de la famille Adamalysin ou ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease Domain*) protéines transmembranaires à activité endoprotéolytique que l'on retrouve dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques **(Tableau 5)**. À ce jour, on a pu identifier l'activité α-sécrétase d'un grand nombre de protéases, mais ce sont principalement les ADAM 9, ADAM 10 et ADAM 17 qui participent au clivage du βAPP et à la production de la sAPPα (Buxbaum et al., 1998 ; Lammich et al., 1999).

Les ADAMs ont une structure complexe comprenant 6 domaines **(Fig. 13)** :

1. Un domaine cytoplasmique qui contient des sites de phosphorylation
2. Un domaine transmembranaire hydrophobique
3. Un domaine riche en cystéine
4. Un domaine « disintégrine »
5. Un domaine catalytique (zinc-dépendant)
6. Un peptide de signalisation N-terminal

Ces protéases sont adressées à la membrane plasmique grâce à un peptide signal C-terminal court. Elles arrivent dans l'appareil Golgi sous forme d'un précurseur inactif, et sont activées lorsqu'elles sont clivées par des protéines convertases. Ce clivage libère un pro-domaine et découvre un site catalytique des métalloprotéases, où viendra se fixer un ion Zn^{2+} **(Fig. 13)** (Edwards et al., 2008).

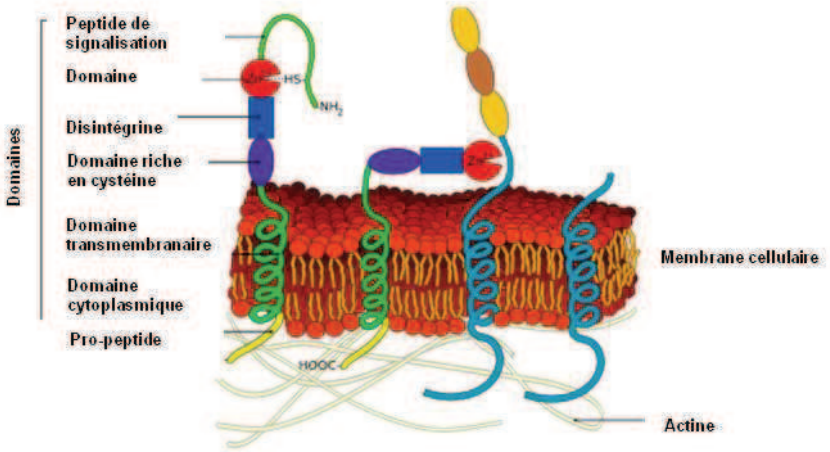


Figure 13 : La structure d'une ADAM classique (d'après Edwards et al., 2008).

Les premières données sur la fonction du domaine métalloprotéase suggèrent que l'activité protéolytique des protéines ADAM 9, 10 et 17 active des facteurs de croissance, des cytokines et des récepteurs, et en conséquence, la voie de transmission des signaux issus de ces récepteurs activés. En effet, il a été suggéré que ces enzymes joueraient un rôle important, direct et indirect, dans le développement du SNC et plus particulièrement, dans la prolifération, la migration, la différentiation, la signalisation intra et extracellulaire et la survie des diverses cellules du SNC, ainsi que dans la croissance axonale et la myélinisation (Yang et al., 2006 ; Fahrenholz et al., 2007). Les ADAMs sont ainsi généralement impliquées dans le clivage de différentes protéines transmembranaires y compris le βAPP (Lammich et al., 1999 ; Yang et al., 2006) **(Tableau 5).**

Les ADAM 10 et ADAM 17 sont les mieux étudiées des protéines de la famille ADAM. Ces deux protéines ne reconnaissent pas spécifiquement des motifs d'acides aminés mais clivent des liaisons peptidiques en fonction de leur distance par rapport à la membrane plasmique. Ceci peut expliquer que ces ADAMs clivent plus de 50 protéines ainsi que des substrats *GPI-anchored* (Vincent et Checler, 2012). Elles ont 18 substrats communs mais leurs activités respectives ne sont pas redondantes en raison de leur distribution tissulaire différente. Le rôle des ces protéines dans les phénomènes d'inflammation a été particulièrement étudié. En effet, elles participent à plusieurs niveaux des cascades de réactions inflammatoires, à la fois physiologique et pathologique (Saftiq et al., 2011). L'arthrite rhumatoïde, une maladie inflammatoire chronique, est un bon exemple d'étude pour déterminer le rôle des ADAMs dans l'inflammation.

Certaines protéines transmembranaires comme le pro-TNF-α *(Tumor Necrosis Factor-α), le Pro-Heparin-Binding-Epidermal Growth Factor* (Pro-HB-EGF) et le *Neuronal Cell Adhesion Molecule* (NCAM) sont coupés par l'activité des ADAMs **(Tableau 5)**. La

maturation de ces précurseurs en cytokines actives requiert leur clivage par des protéases de surface. Le mécanisme de clivage du pro-TNF-α, qui conduit à la sécrétion extracellulaire de TNFα, implique majoritairement l'activité protéolytique de la protéine ADAM 17 (TACE) mais également celle des ADAM 9 et 10 (Black et al., 1997).

Les ADAM 10 et ADAM 17 sont également impliquées dans le cancer. En effet, il apparaît qu'elles agissent au cours de l'oncogenèse permettant aux cellules cancéreuses de migrer et de proliférer (Duffy et al., 2011) **(Tableau 5**).

L'ADAM 9

L'ADAM 9 aussi appelée MDC9 ou meltrin-γ est très conservée chez l'homme, la souris et le xénope, suggérant un rôle physiologique important de la protéine. ADAM 9 est synthétisée comme un précurseur inactif d'environ 110 KDa qui subit un clivage de son pro-domaine par des pro-protéines convertases dans le réseau *trans*-golgien, conduisant à sa forme mature de 84 KDa, qui est principalement localisée à la surface cellulaire. Elle est exprimée par les cellules mésenchymateuses, le cœur et le cerveau (Peduto, 2009).

De manière intéressante, il y a une expression importante d'ADAM 9 dans de nombreux carcinomes humains affectant le foie, le pancréas, la prostate et le système gastro-intestinal (Saftig et al., 2011). En effet, des études récentes montrent que l'ADAM 9 est capable de cliver l'EGF (*Epithelial Growth Factor*), une protéine ayant un rôle établi dans les cancers de la prostate, conduisant à l'activation de son récepteur EGFR et à la prolifération des cellules épithéliales (Izumi et al., 1998) **(Tableau 5)**. Par ailleurs, ADAM 9 régule les taux intracellulaires de la cadhérine épithéliale (E-cad) en empêchant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Hirao et al., 2006). Elle fournit ainsi une corrélation supplémentaire entre le niveau d'expression de la disintégrine et la progression des tumeurs malignes. De façon générale, ADAM 9 pourrait constituer un bon marqueur biologique pour certains cancers et faire l'objet d'une thérapie visant à inhiber son activité dans ce paradigme.

Des souris invalidées pour l'ADAM 9 sont viables et fertiles et ne manifestent aucun changement phénotypique apparent ni de disfonctionnements du point de vue physiologique (Weskamp et al., 2002). Ces résultats laissent penser que malgré son expression ubiquitaire, cette protéine n'a pas un rôle essentiel ou que d'autres membres de cette famille d'enzymes pourraient compenser son invalidation.

ADAM	Substrats	Effets des produits libérés
ADAM 9	βAPP	neuroprotection
	ADAM10	modulation de la neuro-inflammation
	Delta-like 1	Prolifération, migration
	HB-EGF	angiogenèse
	VCAM-1	adhésion
	VE-cadhérine	perméabilité
ADAM 10	βAPP	neuroprotection
	CD44	angiogenèse, migration
	CX3CL1	adhésion, migration
	CXCL16	transmigration
	E-cadhérine	adhésion
	Eph	motilité, adhésion, forme cellulaire
	HB-EGF	angiogenèse
	IL-6R	inflammation
	N-cadhérine	adhésion
	Notch	développement cardiovasculaire
	VE-cadhérine	perméabilité
	VEGFR	angiogenèse
	Pro-TNF-α	inflammation
ADAM 17	βAPP	neuroprotection
	ACE2	régulation de la pression sanguine
	CD44	angiogenèse, migration
	CD40	suppression immunitaire
	CX3CL1	adhésion, migration
	Delta-like 1	prolifération, migration
	EGFR	prolifération, différentiation
	HB-EGF	angiogenèse
	ICAM-1	adhésion
	IL-6R	inflammation
	IL-1R	anti-inflammatoire
	L-séléctine	adhésion
	NGF	neurogenèse
	Notch	développement cardiovasculaire
	VCAM-1	adhésion
	VEGFR2	angiogenèse
	Pro-TNF-α	inflammation

Tableau 5 : Les substrats des ADAMs 9, 10 et 17 et les effets des produits libérés (d'après Dreymueller et al., 2011 ; Postina et al., 2012).

L'ADAM 10

La première ADAM 10, qui est également nommée MADM (*Mammalian Disintegrin-Metalloprotease*), a été isolée et caractérisée par des chercheurs anglais en 1989 à partir de membranes myéliniques dérivées de cerveaux bovins (Chantry et al., 1989). La séquence de cette protéine purifiée a servi par la suite à synthétiser des oligonucléotides et à cribler une banque d'ADNc de cerveaux bovins, permettant ainsi le clonage de l'ADAM 10. Cette enzyme est très conservée chez les différentes espèces animales et clive une large variété de protéines impliquées dans les phénomènes d'adhésion cellulaire, notamment les cadhérines qui jouent un rôle très important durant l'embryogenèse (Reiss et al., 2005).

L'ADAM 10 joue aussi un rôle important dans la détermination des cellules neurales de la drosophile. Dans une population de cellules ectodermiques de potentiel initialement équivalent, seules certaines s'engagent dans la voie de différenciation neurale. Elles le font en inhibant la différenciation neurale de leurs voisines par l'intermédiaire de l'activation de Notch par son ligand Delta (processus dit d'inhibition latérale). Ce processus est sous le contrôle de l'ADAM 10 qui, en clivant soit le récepteur Notch soit le ligand Delta, serait indispensable à la transmission du signal Notch (Qi et al., 1999). Enfin, l'activité protéolytique d'ADAM 10 est aussi indispensable à l'extension des axones chez la drosophile et probablement chez les vertébrés. Dans ce cas, l'activité protéolytique de la protéine dégraderait localement la matrice extracellulaire et faciliterait ainsi le passage de l'axone (Fambrough et al., 1996). L'ADAM 10 régule également la fonction des récepteurs appelés Eph faisant partie de la sous-famille des récepteurs tyrosine kinase, et leurs ligands appelés éphrines qui sont des médiateurs des communications intercellulaires régulant la motilité, l'adhésion et la forme des cellules (Poliakov et al., 2004) **(Tableau 5)**.

Des souris ADAM10$^{+/-}$ arborent un phénotype normal et sont fertiles, alors que les souris ADAM10$^{-/-}$ meurent au jour 9 de l'embryogenèse avec des défauts majeurs de mise en place du système nerveux central et du système cardiovasculaire, qui s'accompagnent d'une réduction importante de l'expression des gènes cibles de la voie Notch (Hartmann et al., 2002).

Des inhibiteurs endogènes de l'ADAM 10 ont été identifiés, tels que les protéines sécrétées TIMP-1 (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1*) et TIMP-3 et la protéine transmembranaire RECK (Muraguchi et al. 2007). Cette dernière agit comme un inhibiteur physiologique de l'ADAM10, en régulant la signalisation Notch pendant la neurogenèse corticale. RECK se trouve généralement au sein des domaines riches en cholestérol, alors que l'ADAM 10 est majoritairement située au sein des régions phospholipidiques, pauvres en cholestérol.

L'ADAM 17

Il y a eu beaucoup de recherches effectuées sur ADAM 17 depuis le clonage de son gène en 1997. Cette enzyme a été premièrement caractérisée pour le clivage du TNFα, d'où son nom de TACE (*Tumor necrosis factor-α Converting Enzyme*), qui est associée à plusieurs maladies auto-immunes telles que les arthrites ou la maladie de Crohn (Vassalli et al., 1992 ; Locksley et al., 2001). Par ailleurs, l'ADAM 17 est aussi impliqué dans le clivage de la L-séléctine, qui conduit à une modulation de la réponse inflammatoire, ainsi qu'à la stimulation de l'activité de l'IL-6 et de la molécule d'adhésion de cellule vasculaire de type 1 (VCAM-1) (Garton et *al*., 2003). En outre, deux travaux ont montré l'implication de l'ADAM 17 dans les cardiomyopathies dilatées avec excès de TNFα libéré (Fedak et *al*., 2006). Une autre étude a montré que le niveau d'expression et l'activité d'ADAM 17 en terme de libération du TNFα par les monocytes *ex vivo* sont associés aux complications cardiaques ultérieures de patients ayant eu un infarctus du myocarde (Shimoda et *al*., 2005) **(Tableau 5)**.

De manière intéressante, des souris invalidées pour ADAM17 meurent entre le 17ème jour du stade embryonnaire et le 1er jour post-natal (Peschon et al., 1998), suggérant un rôle important de l'enzyme pendant le développement. De plus, ADAM17 a été impliquée dans le clivage du récepteur de l'hormone de croissance NGF (*Nerve Growth Factor*) (Diaz-Rodriguez et al., 1999) et dans le clivage de Notch au site S2 (Brou et al., 2000). Par ailleurs, ACE2 (*Angiotensin Converting Enzyme 2*) qui est une protéine impliquée dans la régulation de la pression artérielle et de la fonction cardiaque est également clivée par ADAM17 (Lambert et al., 2005). Les souris KO pour l'ADAM 17 développent des problèmes cardiaques, cutanés, ainsi que des déficits oculaires, liés à une altération de la signalisation de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) (Chalaris et al., 2010).

Parmi les quatre membres de la famille des inhibiteurs naturels de métalloprotéases, les TIMPs, seul TIMP-3 inhibe l'activité d'ADAM 17 (Amour et *al*., 1998). L'expression de TIMP-3 est principalement induite par des cytokines anti-inflammatoires comme le TGFβ (Edwards et *al*., 1996), mais est diminuée par les cytokines pro-inflammatoires TNFα et IL-1β (Bugno et *al*., 1999).

Le rôle des α–sécrétases dans la protéolyse du βAPP

Sur la surface cellulaire, le ßAPP subit la protéolyse par les α-sécrétases, qui séparent la molécule entre la région Lys16 et Leu17 du peptide Aβ, en libérant un ectodomaine large et soluble, la sAPPα **(Fig. 11).** Les premiers travaux impliquant des

ADAMs dans la coupure de type α-sécrétase proviennent d'études pharmacologiques montrant que des inhibiteurs de métalloprotéases conduisent à une baisse de plus de 92% de la sécrétion de sAPPα par des lignées SH-5YSY dérivées de neuroblastomes humains (Parvathy et al., 1998). Il a été ensuite montré que l'ADAM17 est capable de cliver le βAPP recombinant au niveau de son site α (Buxbaum et al., 1998).

En effet, il existe deux voies α-sécrétases distinctes : une voie sécrétoire constitutive et une voie de sécrétion régulée. La voie régulée de production de la sAPPα est sous le contrôle de la protéine kinase C (PKC) (Octave et al., 1995). Elle conduit de manière concomitante à la diminution de la production de peptide Aβ, en accord avec l'hypothèse selon laquelle les productions des peptides Aβ et sAPPα ne seraient pas mutuellement exclusives. Il a été décrit que la voie α-sécrétase pouvait aussi être contrôlée par une activité de type protéine kinase A (PKA) dépendante de l'AMPc (Marambaud et al., 1998). Les cibles de la PKA semblent être différentes de celles de la PKC puisque la stimulation de la voie PKA entraîne aussi une augmentation de peptide Aβ, ce qui a conduit à proposer que la PKA ciblerait une protéine située en amont des α- et β/γ-sécrétases (Marambaud et al., 1998).

L'α-sécrétase intervient vraisemblablement dans deux compartiments cellulaires distincts. Une coupure intervient dans les compartiments golgiens, c'est-à-dire assez tôt dans les voies sécrétoires (Checler et al., 1995). Il apparaît clairement qu'une fraction du βAPP échappe à cette protéolyse et est intégrée à la membrane plasmique où elle y subit l'attaque protéolytique. La nature des compartiments où la protéolyse s'effectue permettait de supposer, *a priori*, l'occurrence d'α-sécrétases distinctes, puisque le pH des organites (acide dans le Golgi ou neutre au niveau de la membrane plasmique) sous-tend des propriétés physico-chimiques distinctes des enzymes intracellulaires et membranaires. Il apparaît donc que l'ADAM 10 contribue aux deux voies - constitutive et régulée (Lammich et al., 1999), alors que l'ADAM 17 est essentiellement impliquée dans la voie régulée dépendante de la PKC (Buxbaum et al., 1998).

Les souris KO pour l'ADAM 9 ne démontrent pas d'altération dans la protéolyse du βAPP (Weskamp et al. 2002), suggérant l'hypothèse qu'elle n'agit pas directement sur le clivage α-sécrétase du βAPP et qu'elle participe plutôt à la maturation de l'ADAM 10 (Kuhn et al. 2010). En revanche, chez des souris KO pour l'ADAM 10, le clivage du βAPP sur le site des α-sécrétases est inhibé (Jorissen et al. 2010). Une étude parallèle a montré que la surexpression de l'ADAM 10 dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, conduit à une augmentation de la production de la sAPPα et qu'elle est en mesure d'inhiber la production

de fragments Aβ (Kuhn et al. 2010). Une approche non-transgénique a montré, de manière intéressante, que le blocage du transport de l'ADAM 10 dans la membrane post-synaptique conduit à une réduction de l'activité α-sécrétase et à une augmentation de la voie amyloïdogénique du βAPP (Marcello et al. 2007; Epis et al. 2010). Buxbaum et ses collaborateurs (1998) ont montré *in vitro* que l'ADAM 17 est capable de cliver le βAPP directement sur le site des α-sécrétases, et qu'elle suit la voie régulée de production de la sAPPα, sous le contrôle de la PKC.

Ces résultats soulignent le rôle important des ADAM 10 et 17 dans la voie non-amyloïdogénique du βAPP (Postina et al. 2004) et, grâce à ces données, l'activation des ces enzymes est actuellement considérée comme une stratégie thérapeutique prometteuse contre la maladie d'Alzheimer (Fahrenholz et Postina, 2006).

Les composés qui stimulent l'activité α-sécrétase

Les approches décrites pour stimuler l'activité α–sécrétase, et favoriser la production de la sAPPα, mettent en jeu l'activation de récepteurs couplés aux protéines G, tels que les récepteurs muscariniques ou le récepteur métabotropique au glutamate (Kim et al., 2005 ; Kojro et al., 2006 ; Mousavi et al., 2009 ; Bailey et al., 2011) et des systèmes de protéine kinase C (PKC) (Etcheberrigaray et al., 2004 ; Zhang et al., 2005). Tels exemples sont la stimulation des voies PKC-dépendantes par les esters de phorbol (Chen et al., 2004b) ou encore par des agonistes des récepteurs de la sérotonine 5-HT (Russo et al., 2009). D'autres voies mettent en jeu le récepteur de la sérotonine 5-HT, connu pour jouer un rôle dans la cognition et la mémoire, *via* la production d'AMPc (Cachard-Chastel et al., 2007). Certaines hormones et facteurs de croissance, tels que l'EGF et l'insuline sont également connus pour stimuler la production de la sAPPα, *via* une action sur la PKC (Zhang et al., 2005).

D'autres agents pharmacologiques ont été récemment décrits comme «stimulateurs de la production de la sAPPα » selon une voie AMPc-PKA, comme la forskoline (Efthimiopoulos et al., 1996), ou selon une voie PKC/MAP-kinase, comme les agents anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), tels que les inhibiteurs de la cyclooxygénase (COX) (Avramovich et al., 2002) et les dérivés de la rasagiline (Youdim et al., 2005). Cependant, les données sur la capacité des AINS à stimuler l'activité des α-sécrétases restent contradictoires. Une étude récente a montré que ni l'ibuprofène ni l'indométacine stimulent la production de la sAPPα dans des cultures neuronales et non-neuronales (Leuchtenberger et al., 2009).

En outre, il a été montré que le cholestérol, qui constitue un élément important des radeaux lipidiques (*lipid rafts*), inhibe l'activité des α-sécrétases *in vivo* et *in vitro* (Bodovitz et al., 1996 ; Howland et al., 1998). Depuis cette découverte, les statines, inhibiteurs de la HMG-CoA réductase, se sont avérés bénéfiques par l'activation des α-sécrétases (Kojro et al., 2001). Des études ont montré que les statines agissent sur l'expression de l'ADAM 10 et/ou sur son transport vers des régions non-radeaux de la membrane plasmique (Kojro et al., 2001).

Enfin, des extraits végétaux, tels que le *Ginkgo biloba* et le thé vert (epigallocatechine-3-gallate) montrent une activité « stimulateur des α-sécrétases » (Colciaghi et al., 2004 ; Obregon et al., 2006). Le *Ginkgo biloba* induit une modification, PKC-dépendante, de l'expression des α-sécrétases, alors que le thé vert favorise la maturation de la ProADAM10 et, parallèlement, il inhibe l'activation de la BACE1 (Colciaghi et al., 2004 ; Obregon et al., 2006). De plus, deux études récentes ont montré que le FLZ (un analogue synthétique du squamosamide, isolé à partir des feuilles de *l'Annoma Squamosa*) ainsi que la Cryptotanshinone (un extrait de la *Salvia miltiorrhiza*) stimulent le clivage du βAPP par les α-sécrétases, et améliorent la mémoire spatiale dans des modèles de la maladie d'Alzheimer (Hou et al., 2009 ; Mei et al., 2009).

Au vue de ces données, il est important de souligner que la stimulation de l'activité et/ou de l'expression des ADAMs, par l'utilisation des agents pharmacologiques, doit être bien contrôlée afin de diminuer le risque d'effets systémiques indésirables liés à leurs effets pléiotropes et leur profil ubiquitaire. Une activation forte, prolongée et généralisée des α-sécrétases pourrait promouvoir la croissance de tumeurs, à cause de clivage des substrats tels que l'EGF. En revanche, une activation « compensatrice » des α-sécrétases, comme dans le cas d'une lésion cérébrale aiguë ou d'une dégénérescence âge-dépendante, pourrait avoir des bénéfices thérapeutiques.

2.2. Les ß-sécrétases

Les ß-sécrétases identifiées à ce jour sont nommées BACE-1 et BACE-2 (pour *« ß-site APP Cleaving Enzyme »)* et sont des protéases transmembranaires du type I (Stockley et O'Neill, 2007). BACE-1 est exprimée principalement par les neurones (Blasko et al., 2004), mais sous conditions de stress chronique, elle peut également être exprimée par les astrocytes (Hartlage-Rübsamen, 2003).

Le site du clivage de BACE-1 dans le βAPP se trouve dans la partie N-terminal du domaine Aß, et son expression augmente la production des produits du clivage des

β-sécrétases, comme le peptide Aβ. En revanche, l'utilisation des séquences anti-sens diminue fortement la production de tels produits. En effet, des expériences avec des souris BACE $^{-/-}$ ont montré qu'une déficience de BACE-1 empêche la formation du peptide Aß (Cai et al., 2001 ; Luo et al., 2001). Ainsi, les recherches thérapeutiques actuelles contre la maladie d'Alzheimer visent, entre autres, à réduire l'activité de BACE-1 afin de réduire la production du peptide Aß. L'activité enzymatique de BACE-1 est très dépendante de son environnement lipidique. Certains lipides, tels que les glycosphingolipides neutres (cérébrosides), les glycérophospholipides anioniques et les stérols (cholestérol) induisent directement une augmentation de l'activité β-sécrétase (Kalvodova et al., 2005).

BACE-1 est détectée sous sa forme active dans les vésicules golgiennes et les endosomes (Huse et al., 2002) et clive le βAPP en deux sites distincts :

a) au niveau de l'aspartate 1, qui constitue le clivage prédominant, donnant les peptides amyloïdes Aβ « classiques ».

b) au niveau du glutamate 11, donnant des peptides amyloïdes plus courts que l'on retrouve également dans les plaques séniles (Naslund et al., 1994).

BACE-2 est l'homologue de BACE-1 et sa fonction physiologique n'est pas encore bien connue. Elle est capable de cliver le βAPP en position 1 de la séquence de l'Aβ, comme BACE-1, mais peut également, et beaucoup plus efficacement, cliver le βAPP sur la phénylalanine 19 ou la phénylalanine 20 (Farzan et al., 2000). Ces sites de clivages alternatifs laissent penser que la BACE-2 n'est pas la β-sécrétase classique et qu'elle serait impliquée dans la maladie d'Alzheimer dans le cas de mutation « Flemish » du βAPP, qui touche l'alanine 21 de l'Aβ (Farzan et al., 2000). Ceci pourrait expliquer l'absence de détection du peptide Aβ chez les souris KO pour le gène de BACE-2 (Cai et al., 2001 ; John et al., 2003).

Les inhibiteurs des β-sécrétases pourraient également apporter un bénéfice thérapeutique dans le contexte des lésions traumatiques cérébrales. La voie amyloïdogénique du βAPP, qui est activée de façon chronique dans la maladie d'Alzheimer, est activée de façon aiguë suite à un TC (Lesné et al., 2005 ; Loane et al., 2009). Il a été aussi observé que le TC expérimental induit une accumulation du βAPP et des β- et γ-sécrétases au sein des axons traumatisés (Chen et al., 2004a). En effet, il a été décrit que le TC induit un facteur de risque de survenu de la maladie d'Alzheimer, puisque des études *post-mortem* ont mis en évidence des dépôts amyloïdes chez 30 % des victimes de TC, qui peuvent survenir dès le premier jour du traumatisme crânien (Van Den Heuvel et al., 2007). Loane et coll. (2009) ont ainsi montré, dans un modèle murin de TC, que l'inhibition

des β ou γ sécrétases peut réduire la production du peptide neurotoxique Aβ et les lésions cérébrales, et améliorer les fonctions cognitive et motrice post-TC.

2.3. Les γ-sécrétases

La nature des γ-sécrétases fait encore aujourd'hui l'objet de débat. On a d'abord cru que des protéines nommées présénilines (PS1 et PS2) pouvaient avoir une activité γ-sécrétase, mais il semblerait que les présénilines représentent plutôt une des parties d'un « complexe protéique à activité γ-sécrétase » (De Stooper, 2003). Les présénilines (PS1 et PS2) sont des protéines transmembranaires multifonctionnelles, qui sont exprimées de façon ubiquitaire et codées par des gènes situés sur les chromosomes 14 et 1 chez l'homme (Nunan et Small, 2000). Elles semblent être en majorité situées dans les membranes du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi et possèdent 8 domaines transmembranaires et une longue boucle cytoplasmique, au niveau de laquelle existent des sites de coupure par des protéases (Capell et al., 1998).

Il a été proposé que les présénilines jouent le rôle de protéine *chaperon*, c'est-à-dire qu'elles soient capables d'interagir avec d'autres protéines (par exemple le βAPP) et de les stabiliser au niveau d'un complexe (Van Gassen et al., 2000). Ainsi, les présénilines ne sont pas seulement impliquées dans la formation du complexe à activité γ-sécrétase capable de cliver le βAPP, mais également dans d'autres voies de protéolyse comme celle de la protéine Notch (De Strooper, 2003). Étant donné que la protéine Notch joue un rôle important dans la différentiation des cellules, les stratégies visant à diminuer l'activité γ-sécrétase afin de réduire la production du peptide Aß ne semblent pas dénuées de risques d'effets secondaires majeurs, comme une immunodéficience.

3. LES PRODUITS PRINCIPAUX DE LA PROTEOLYSE DU βAPP

3.1. La forme soluble α du précurseur du peptide β amyloïde (SAPPα)

Pendant le clivage non-amyloïdogénique du βAPP, ce dernier est coupé par une α-sécrétase intracellulaire. Cette coupure libère le fragment soluble sAPPα, qui est engendré par la voie sécrétoire constitutive, ou régulée par la protéine kinase C. Un *pool* de βAPP échappe à cette coupure intracellulaire et est intégré dans la membrane plasmique où une α-sécrétase membranaire engendre la même coupure. Cette voie de maturation du βAPP est considérée comme « non-amyloïdogénique » puisque les α- sécrétases interviennent au milieu du peptide amyloïde Aβ, prévenant ainsi sa formation (Vincent et al., 2012). Par

ailleurs, de nombreuses études ont montré que le taux de sAPPα est diminué dans le LCR des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Lannfelt et al., 1995).

La sAPPα, est une protéine soluble, contenant 612 acides-aminés **(Fig. 14)**, qui s'est avérée neuroprotectrice *in vitro* et *in vivo*. Elle est naturellement présente dans le cerveau et circule librement dans le LCR (Palmert et al., 1989). De nombreuses études ont montré qu'elle exerce des effets bénéfiques par son effet neuroprotecteur (Kögel et al., 2011), la modulation de l'excitabilité neuronale (Mattson et al., 1993 ; Mattson and Furukawa, 1998), la plasticité neuronale (Turner et al., 2003 ; Ring et al., 2007), la croissance et la ramification des axones (Ikin et al., 2007), la croissance des dendrites (Mattson, 1997) et la synaptogenèse (Moya et al., 1994). Les effets bénéfiques de la sAPPα sont partiellement liés à la présence, dans son domaine C-terminal d'un domaine fixant à l'héparine (Mattson et al., 1993) **(Fig. 14)**. Ce domaine permet la fixation du βAPP sur divers protéoglycanes qui jouent un rôle important dans la plasticité, la croissance et les interactions neuronales (Storey and Cappai, 1999). De plus, les régions N-terminale et CuBD de la sAPPα constituent ensemble un domaine riche en cystéine qui semble être à l'origine des ses effets neuroprotecteurs (Corrigan et al., 2011).

Une étude a montré que les déficits obtenus chez des souris KO pour le βAPP, tels que la diminution du poids corporel et du tissu neuronal, sont absents chez les souris KI pour la sAPPα, soulignant le rôle neuroprotecteur important de la sAPPα (Ring et al. 2007).

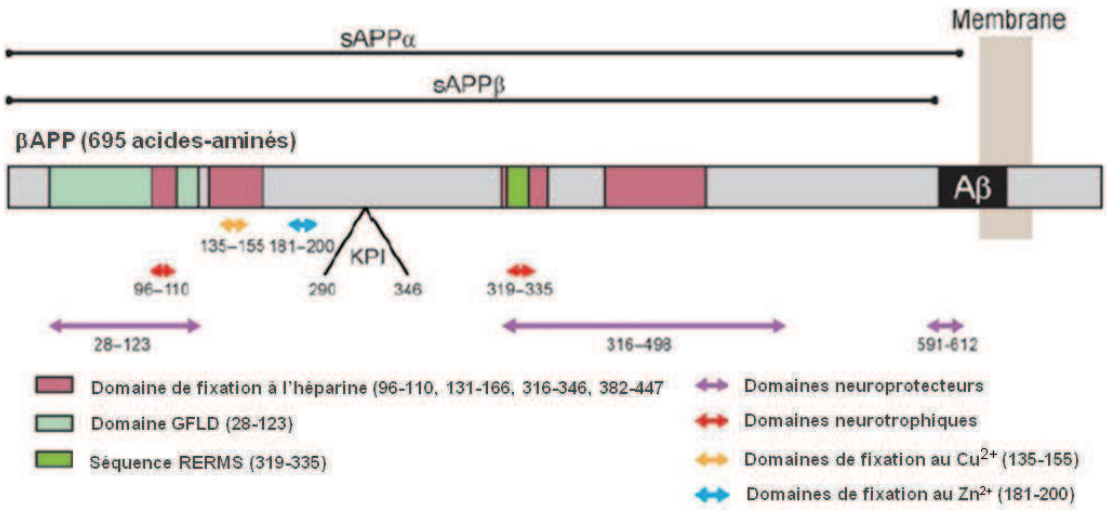


Figure 14 : Représentation des domaines solubles sAPPα et sAPPβ (D'après Chasseigneaux et al., 2012). GFLD : *Growth Factor-Like Domain*, KPI : *Kunitz Protease Inhibitor*.

Des études *in vivo* et *in vitro* ont mis en évidence différents effets et mécanisme(s) d'action de la sAPPα **(Tableau 6).**

sAPPα : Effets observés / Mécanisme(s) d'action	Références
Etudes *in vitro*	
Stimulation de la prolifération de cellules progénitrices et de la différentiation microgliale dans l'hippocampe	Baratchi et al., 2011
Stimulation de la croissance de neurones *via* l'activation de la voie MAPK	Ohsawa et al., 1995; 1997; Gakhar-Koppole et al., 2008
Augmentation de la densité synaptique	Morimoto et al., 1998; Claasen et al., 2009
Régulation de la potentialisation à long terme (LTP)	Taylor et al., 2008
Activité anti-apoptotique, *via* les voies ERK- et p38-MAP kinase	Guo et al., 1998 ; Greenberg et al., 1995 ; Cheng et al., 2002 ; Venezia et al., 2006 ; Gralle et al., 2009
Normalisation de la concentration intracellulaire en Ca^{++} et protection de neurones contre l'excitotoxicité	Mattson et al., 1993
Hyperpolarization de neurones *via* l'activation des canaux K^+	Furukawa et al., 1996
Inhibition des récepteurs NMDA	Furukawa et al., 1996 ; Furukawa et Mattson, 1998
Diminution de la mort neuronale induite par le peptide Aβ	Goodman et Mattson, 1994
Diminution de la mort neuronale et de la dégénérescence des dendrites induites par l'inhibition de protéasomes	Copanaki et al., 2010
Etudes *in vivo*	
Augmentation de la densité synaptique	Meziane et al., 1988 ; Roch et al., 1994 ; Morimoto et al., 1998
Amélioration de la mémoire spatiale et non-spatiale, et atténuation des effets amnésiques de la scopolamine	Meziane et al., 1988
Prolifération de cellules progénitrices dans la zone subventriculaire	Caillé et al., 2004
Stimulation de la croissance de neurones	Young-Pearse et al., 2008
Augmentation de la densité synaptique dans le cortex frontopariétal	Roch et al., 1994
Augmentation de la puissance des EEGs au niveau du cortex et de l'hippocampe chez le rat âgé	Sànchez-Alavez et al., 2007
Amélioration de la mémoire spatiale et de la LTP	Taylor et al., 2008
Augmentation de la survie neuronale dans l'hippocampe et de la fonctionnalité des neurones suite à une ischémie cérébrale	Smith-Swintosky et al., 1994
Amélioration de la mémoire spatiale et de l'apprentissage chez le rat âgé	Roch et al., 1994
Réduction des LADs post-TC	Thornton et al., 2006
Diminution de cellules apoptotiques dans le cortex et l'hippocampe et amélioration cognitive et motrice post-TC	Thornton et al., 2006 ; Corrigan et al., 2011, 2012

Tableau 6 : Les mécanismes d'action de la sAPPα et les effets produits.

Effets anti-excitotoxiques

Il a été récemment montré que la production de la sAPPα est stimulée sous conditions d'excitotoxicité, probablement comme un mécanisme de défense, et qu'elle protège les neurones contre les dommages associés à l'excitotoxicité (Fahrenholz et al., 2007).

Les effets neuroprotecteurs de la sAPPα pourraient être associés à sa participation au bon fonctionnement des canaux ioniques (Mattson et al., 1997). En effet, il a été décrit que la sAPPα, et plus particulièrement son site de liaison à l'héparine, peut normaliser la concentration intracellulaire en Ca^{++}, stabiliser l'homéostasie calcique et protéger les neurones contre l'excitotoxicité. Ce dernier est probablement dû à l'activation des canaux potassiques de forte conductance, qui à leur tour hyperpolarisent la cellule et donc diminuent l'excitabilité neuronale (Mattson et al., 1993). De plus, il a été décrit que la sAPPα inhibe les récepteurs NMDA, ayant comme conséquence une diminution de la concentration intracellulaire en Ca^{++} et des dommages neuronaux liés à l'excitotoxicité (Furukawa et al., 1996 ; Furukawa et Mattson, 1998 ; La Ferla, 2002). De façon intéressante, la sAPPα peut significativement atténuer la mort neuronale induite par le peptide Aβ dans des cultures des neurones de l'hippocampe (Goodman et Mattson, 1994) et du cortex (Marcade et al., 2008).

De plus, la grande affinité de la sAPPα pour le Zn^{2+} et le Cu^{2+} suggère qu'elle peut agir comme un transporteur des métaux et/ou une protéine chaperon qui régule l'homéostasie des métaux (Treiber et al. 2004).

Effets neurotrophiques

Différents composés de la matrice extracellulaire, y compris les HSPGs (*Heparan Sulfate Proteoglycans*) se fixent sur la sAPPα, et cette fixation entraîne une croissance de neurones hippocampiques. La réponse physiologique de la sAPPα est dépendante du type de l'HSPG (Small et al. 1992). Dans une étude récente par Chasseigneaux et collaborateurs (2011), l'ajout de sAPPα dans une culture de cellules corticales embryonnaires a entraîné une diminution de l'adhésion cellulaire, une diminution des dendrites et une augmentation de la croissance axonale, des effets qui sont reproduits par l'ajout des héparanes sulfates (Lafont et al. 1992). En outre, la séquence RERMS des acides-aminés 319–335, au sein de la sAPPα, est également impliquée dans la croissance de neurones (Jin et al. 1994).

La sAPPα est capable de promouvoir la survie neuronale et la croissance de neurones *in vitro* et *in vivo* (Small et al., 1994 ; Ring et al., 2007 ; Young-Pearse et al., 2008) ainsi que la prolifération de cellules progénitrices dans le cerveau adulte (Caillé et al., 2004).

Ces propriétés neurotrophiques, associés à la présence dans la sAPPα d'un facteur de croissance riche en cystéine **(Fig. 14)**, suggèrent que la sAPPα peut agir comme un facteur de croissance *in vivo* (Rossjohn et al., 1999).

L'ajout d'un anticorps ciblant le domaine neurotrophique de la sAPPα entraîne une inhibition de la formation des synapses (Morimoto et al., 1998) et une diminution de la croissance neuronale (Gakhar-Koppole et al., 2008). De plus, l'infusion cérébrale de sAPPα entraîne une augmentation de la densité synaptique, une amélioration de la mémoire et de l'apprentissage et une régulation de la potentialisation à long terme (LTP) (Meziane et al., 1988 ; Roch et al., 1994 ; Taylor et al., 2008). En outre, il a été récemment montré que la sAPPα potentialise l'effet de l'EGF sur la prolifération des neuroblastes adultes dans la zone SVZ, *in vitro* et *in vivo* (Caillé et al. 2004).

Effets neuroprotecteurs

La propriété la plus importante de la sAPPα est son effet neuroprotecteur, démontré sous conditions d'excitotoxicité induite par le glutamate et le peptide Aβ (Mattson et al. 1993, 1994; Goodman and Mattson 1994). La sAPPα peut également protéger les cellules PC12 contre des dommages liés à l'irradiation UV (Copanaki et al. 2010). Les effets neuroprotecteurs *in vitro* de la sAPPα ont été attribués à sa partie C-terminale (résidus 591-612), et les héparinases inhibent cette action (Furukawa et al., 1996).

Dans le contexte de lésions cérébrales aiguës, des études récentes ont montré que l'administration de la sAPPα, par voie intracérébroventriculaire (i.c.v.), suite à un TC expérimental entraîne une réduction des LADs, une diminution de cellules apoptotiques dans le cortex et l'hippocampe et une amélioration cognitive et motrice (Thornton et al., 2006 ; Corrigan et al., 2011, 2012). Plus précisément, il a été montré que deux domaines de la sAPPα sont responsables de cet effet neuroprotecteur de la sAPPα post-TC, et que ceux-ci ont la capacité de se fixer aux HSPGs (Corrigan et al., 2011). En outre, Smith-Swintosky et collaborateurs ont montré que l'administration (i.c.v.) de la sAPPα chez le rat exerce des effets neuroprotecteurs dans un modèle d'ischémie cérébrale (Smith-Swintosky et al., 1994). Plus précisément, il a été montré que le traitement avec la sAPPα favorise la survie et la fonction neuronale dans l'hippocampe.

Participation à la signalisation cellulaire

La sAPPα exerce une activité anti-apoptotique, principalement *via* sa participation dans diverses voies de signalisation cellulaire, notamment celles du NF-kB (Guo et al., 1998 ; Cheng et al., 2002) et de la ERK-MAP kinase (Greenberg et al., 1995 ; Venezia et al.,

2006). La signalisation anti-apoptotique engendrée par la sAPPα pourrait également impliquer la voie p38-MAP kinase (Burton et al., 2002). Le holo-βAPP membranaire constitue un récepteur membranaire de la sAPPα. L'homodimérization du βAPP est un phénomène bien établi (Soba et al., 2005) qui conduit à une stimulation de l'activité des caspases et donc à la mort apoptotique (Bouron et al., 2004). Une étude récente a révélé que la sAPPα peut se fixer à holo-APP et, par conséquent, perturber son homodimérization. Ce phénomène semble être indispensable pour l'activité anti-apoptotique de la sAPPα (Gralle et al., 2009).

Coagulation et immunité

Sous stimulation par la thrombine, les plaquettes secrètent de la sAPPα et cette dernière inhibe le facteur de coagulation XIa, ce qui suggère qu'elle pourrait jouer un rôle important dans la coagulation (Van Nostrand et al. 1991). En outre, la stimulation des lymphocytes T (CD4 et CD8) infiltrés conduit à la sécrétion de la sAPPα, montrant l'implication de cette protéine dans les processus immunitaires au niveau du SNC et du SNP (Monning et al. 1990, 1992).

3.2. La forme soluble β du précurseur du peptide beta amyloïde (sAPPβ)

Peu d'études se sont focalisées aux propriétés de la sAPPβ. Cette protéine partage la même séquence que sAPPα, avec l'exception des 16 derniers acides-aminés. Ainsi, les effets neuroprotecteurs de la sAPPβ contre la toxicité du glutamate et d'Aβ, sont 50 à 100 fois moins puissants que ceux de la sAPPα (Furukawa et al.,1996). En outre, la sAPPβ ne réduit pas la mort neuronale induite par l'inhibiteur de protéasomes, époxomine (Copanaki et al. 2010) et n'est pas associée à la LTP (Taylor et al., 2008). Cela souligne le rôle important des 16 derniers acides-aminés de la séquence de la sAPPα dans la neuroprotection et la promotion de la LTP (Taylor et al., 2008).

Des études récentes ont mis l'accent sur les différences fonctionnelles entre les sAPPα et sAPPβ, en montrant que chez les souris KI pour la sAPPβ, contrairement aux souris KI pour la sAPPα, la mortalité périnatale issue de l'invalidation génique de l'βAPP n'est pas atténuée (Weyer et al. 2011).

3.3. Le peptide Abeta (Aβ)

Il existe deux formes principales du peptide amyloïde : la forme courte Aβ (1-40) qui possède des capacités d'agrégation lentes et la forme longue Aβ (1-42) qui s'agrège rapidement et produit les principaux effets toxiques. Le ratio de ces deux formes est très

largement en faveur de la forme courte dans les conditions physiologiques et on observe un changement de ce ratio dans la maladie d'Alzheimer (Walsh et al., 2000).

L'Aβ existe sous différentes formes allant du monomère et des petits oligomères à des formes fibrillaires insolubles. Les formes solubles sont des monomères, dimères, trimères et de plus grands oligomères (Walsh et al., 2000). Une agrégation produit les formes insolubles d'Aβ, fibrilles proprement dites, qui vont former les corps des plaques amyloïdes au sein du cerveau (Walsh et al., 2000). L'hétérogénéité de l'extrémité C-terminale des peptides amyloïdes, c'est-à-dire 40 *vs* 42 acides aminés, est responsable des effets toxiques de ceux-ci. Cette différence de deux acides aminés est très importante pour la pathogénicité et la formation des plaques séniles. En effet, les plaques diffuses, qui sont les premiers signes de dépôt d'Aβ dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de syndrome Down, sont presque exclusivement composées d'Aβ42 (Iwatsubo et al., 1995 ; Lemere et al., 1996).

La voie sécrétoire constitutive conduisant à la sécrétion de peptide Aβ a établi que le peptide Aβ42 était produit très tôt dans le réticulum endoplasmique alors que le peptide Aβ40 apparaissait plus tard, dans le réseau *trans*-golgien (TGN). Un *pool* de βAPP échappe à ces coupures intracellulaires et est intégré dans la membrane plasmique. Après endocytose, ce βAPP subit dans les endosomes précoces les coupures engendrant le peptide amyloïde qui est ensuite sécrété. Il apparaît que le βAPP peut aussi être dirigé vers le compartiment lysosomial pour une dégradation finale (Checler et al., 2007).

En cherchant les protéines qui peuvent lier différents fragments du βAPP, plusieurs partenaires ont été découverts. Un de ces partenaires est l'ApoE, qui peut lier différents fragments du βAPP (Ohm et al., 1999). L'Aβ entre en compétition avec les lipides pour la liaison à l'ApoE, laissant penser que l'Aβ pourrait altérer l'homéostasie du cholestérol (Ohm et al., 1999). Enfin, parmi les récepteurs qui lient l'Aβ, on distingue les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChR) (Wang et al., 2000) et les protéoglycanes à héparanes sulfates (Scharnagl et al., 1999).

CHAPITRE 4 : LA MINOCYCLINE

1. GENERALITES

La minocycline est un dérivé semi-synthétique de tétracyclines de deuxième génération, une molécule lipophosoluble qui traverse bien la BHE (Kim et al., 2009). Elle est un composé aux effets pléiotropes, puisqu'elle exerce en dehors de son activité anti-bactérienne, une activité anti-inflammatoire associée à une inhibition de l'activation microgliale, et un effet neuroprotecteur démontrés dans divers modèles animaux des pathologies du système nerveux central **(Tableau 7)**. Notamment dans les modèles de la maladie d'Alzheimer, il a été montré que la minocycline est capable d'inhiber la formation du peptide Aβ et de réduire le déficit cognitif (Seabrook et al., 2006 ; Choi et al., 2007), ce qui suggère que la minocycline pourrait stimuler directement ou indirectement l'activité des α-sécrétases, conduisant à une augmentation de la production de sAPPα et, conjointement, à une diminution de la formation du peptide Aβ.

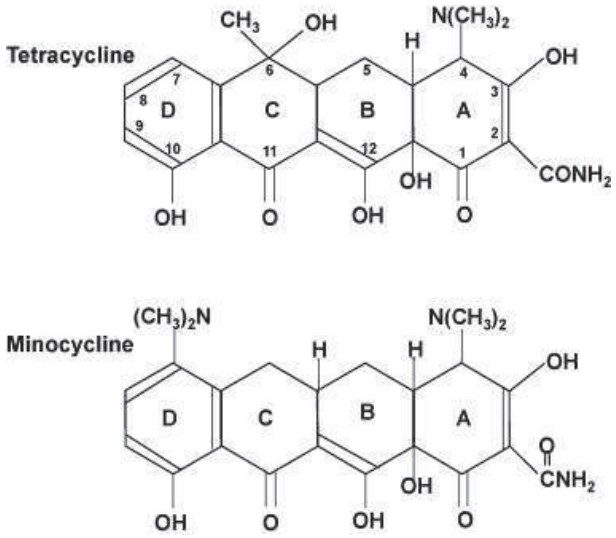
De façon intéressante, notre laboratoire a récemment montré qu'un traitement précoce avec la minocycline suite à un TC par percussion mécanique chez la souris, entraîne une amélioration fonctionnelle motrice à long terme, associée à une inhibition microgliale, une réduction du volume de la lésion et un effet anti-inflammatoire et anti-œdémateux pendant la phase aigu neuro-inflammatoire (Homsi et al., 2009 ; 2010). La question qui se pose par la suite est de savoir si l'effet neuroprotecteur persistant de la minocycline post-TC est associé à une restauration de la production de la sAPPα et à une amélioration cognitive et/ou sensorielle post-TC.

1.1. La famille des tétracyclines

Les tétracyclines sont des antibiotiques isolés d'une bactérie (Actinomycètes, Gram$^+$) du genre Streptomyces. Elles doivent leur nom à leur structure tétracyclique commune **(Fig. 15)**. Ce sont des composés bactériostatiques dont le spectre d'activité s'étend à de nombreuses bactéries Gram$^+$ et Gram$^-$, aux mycoplasmes, aux chlamydiées et aux rickettsies. Néanmoins, leur usage est aujourd'hui limité par l'émergence de résistances (Zemke & Majid, 2004).

Les tétracyclines sont des substances amphotères faiblement solubles dans l'eau à pH 7 et dont la biodisponibilité orale varie fortement selon la forme galénique et le type de molécule. Leur forte liposolubilité leur permet de bien diffuser à travers les barrières biologiques et atteindre des concentrations efficaces, y compris dans les milieux

intracellulaires, notamment dans le placenta, les glandes mammaires, les sécrétions bronchiques et les liquides d'ascite.



<u>Figure 15</u> : Structures chimiques de la tétracycline et de la minocycline.

Il existe des tétracyclines naturelles, des tétracyclines semi-synthétiques et des tétracyclines chimiquement modifiées. Des modifications sur la structure chimique des tétracyclines ont permis d'augmenter leur activité antibactérienne et d'améliorer leur absorption ainsi que leur demi-vie. En fonction de leur pharmacocinétique et leurs propriétés antibiotiques, on peut distinguer trois types de tétracyclines (Agwuh & MacGowan, 2006) :

- De première génération, comme chlortétracycline, oxytétracycline, tétracycline, déméclocycline, méthacycline
- De deuxième génération, tels que la doxycycline et la minocycline
- Des tétracyclines chimiquement modifiées (glycylcyclines), comme tigecycline.

La minocycline, synthétisée initialement en 1967, a subi une amélioration favorisant son absorption et sa lipophilie. Ainsi, sa solubilité lipidique peut atteindre 10 fois plus que celle d'autres tétracyclines, ce qui lui permet de diffuser facilement dans les tissus et de pénétrer à travers la BHE dans le cerveau.

La minocycline est utilisée chez l'homme en administration orale, à la dose de 100-200 mg/jour, pour le traitement de l'acné, la parodontite, la polyarthrite rhumatoïde et les infections à transmission sexuelle (Blum et al., 2004; Zemke & Majid, 2004). La minocycline est bien tolérée en clinique et ses effets indésirables graves, comme le Lupus, l'hypersensibilité et les troubles vestibulaires, sont assez rares. Des effets secondaires réversibles sont rapportés comme les troubles digestifs, la coloration des dents permanents et l'hypertension intracrânienne bénigne (Blum et al., 2004).

1.2. La pharmacocinétique de la minocycline

L'absorption de la minocycline est rapide et quasi complète (95-100%) principalement dans l'estomac, le duodénum et le jéjunum, et sa concentration maximale C_{max} est observée à 2-4h suite une administration orale (Agwuh & MacGowan, 2006; Bishburg & Bishburg, 2009). La biodisponibilité de la minocycline est très élevée chez l'homme (Blum et al., 2004). Lors de l'administration intraveineuse (i.v.) de la minocycline à la dose de 200 mg/jour, la C_{max} plasmatique atteint le 6 µg/ml (Zemke & Majid, 2004).

Le volume de distribution de la minocycline est 80-115 L (ou 1,17 L/kg). La concentration de la minocycline dans le LCR est moins de 50% de sa concentration plasmatique (Agwuh & MacGowan, 2006; Bishburg & Bishburg, 2009).

Il existe au moins six métabolites de la minocycline. Certains d'entre eux ont une activité anti-bactérienne et se trouvent dans l'urine. Le métabolite principal est le 9-hydroxyminocycline (Agwuh & MacGowan, 2006 ; Bishburg & Bishburg, 2009).

L'excrétion de la minocycline est rénale et biliaire chez l'homme. L'excrétion urinaire est moins importante que celle d'autres tétracyclines de 1ère génération. Seulement 5 à 12% de la dose de la minocycline se trouve dans l'urine, alors que l'élimination fécale comprend 20 à 35%. L'élimination de la minocycline est donc indépendante des fonctions rénale et hépatique (Blum et al., 2004; Agwuh & MacGowan, 2006; Bishburg & Bishburg, 2009). La minocycline a une demi-vie ($t_{1/2}$) plus longue que celle d'autres tétracyclines de 1ère génération. Sa demi-vie prolongée ($t_{1/2}$ = 15-19h) est due à sa pénétration tissulaire extensive et à sa liaison aux protéines.

Chez les animaux, la dose létale de la minocycline est extrêmement élevée (DL_{50} : 3600 mg/kg) (Blum et al., 2004). Sa demi-vie chez les rongeurs est de 2-3h (Andes & Craig, 2002; Colovic & Caccia, 2003) et sa concentration cérébrale atteint le tiers de sa concentration plasmatique (Colovic & Caccia, 2003).

2. LES MECANISMES D'ACTION DE LA MINOCYCLINE

Activité antibactérienne

La minocycline inhibe la synthèse protéique des bactéries en se fixant à la sous-unité 30S des ribosomes. Elle s'oppose à la fixation de l'amino-acyl-ARNt sur un accepteur constitué du complexe ARNm-ribosome, conduisant à un effet anti-bactérien *via* l'arrêt de la synthèse protéïque des bactéries (Zemke & Majid, 2004; Bishburg & Bishburg, 2009; Kim & Suh, 2009).

Activité neuroprotectrice

Depuis plus de 10 ans, la minocycline est considérée comme une nouvelle molécule neuroprotectrice (Yrjanheikki et al., 1998), dont les effets neuroprotecteurs sont distincts et indépendants de son activité antibactérienne. Le mécanisme d'action à l'origine de son effet neuroprotecteur n'est pas encore entièrement élucidé, mais différentes hypothèses ont été proposées, entre autres l'inhibition des microglies et l'atténuation de la réponse excitotoxique et neuro-inflammatoire. Etant donné que la minocycline exerce des effets pléiotropes, il est fortement probable que son effet neuroprotecteur soit issu de plusieurs mécanismes distincts et/ou associés. Les mécanismes d'action proposés à l'origine de l'effet neuroprotecteur de la minocycline sont présentés dans le **Tableau 7**, en s'appuyant sur les effets *in vitro* (**Tableau 8**) et *in vivo* (**Tableau 9**) de la minocycline.

Activité anti-oxydante et anti-excitotoxique

La minocycline inhibe la production des EROs par les leucocytes, exerçant ainsi une activité anti-oxydante (Miyachi et al., 1986; Lin et al., 2003) et inhibe la production des radicaux libres et la péroxydation des lipides induites par le DPPH (diphenyl-*p*-picrylhydrazyl) (Morimoto et al., 2005; Kraus et al., 2005). De plus, la minocycline agit comme un piégeur de radicaux libres comme les superoxides/ peroxynitrite (Whiteman & Halliwell, 1997; Kraus et al., 2005; Morimoto et al., 2005; Gieseler et al., 2009).

Activité anti-excitotoxique

L'effet neuroprotecteur de la minocycline peut être également associé à la diminution de l'excitotoxicité. La minocycline diminue l'excitabilité neuronale en bloquant les canaux sodiques et calciques et en réduisant la surcharge de Ca^{2+} ainsi que la libération de glutamate, à l'origine de l'effet neuroprotecteur de la minocycline (Morimoto et al., 2005; Gonzalez et al., 2007).

Activité chélatrice des ions bivalents

L'activité anti-inflammatoire et neuroprotectrice de la minocycline pourrait être également associée à sa capacité de chélater des ions bivalents, comme Ca^{2+} et Fe^{2+} (Chen-Roetling et al., 2009 ; Antonenko et al., 2010 ; Garcia-Martinez et al., 2010 ; Zhao et al., 2011). L'excitotoxicité post-TC conduit à une augmentation significative du taux de Ca^{2+} intracellulaire et des EROs, ainsi qu'à une déplétion énergétique, ce qui entraine un dysfonctionnement mitochondrial et une augmentation de la mort apoptotique (Giorgi et al.,

2012). Ainsi, les composés qui inhibent des voies de signalisation intracellulaires du Ca^{2+} ont un potentiel thérapeutique dans le TC et l'IC (Weber, 2012)

Inhibition microgliale et activité anti-inflammatoire

La minocycline inhibe la formation de la poly-(ADP-ribose) qui est un marqueur de l'activation de la PARP-1 et cet effet peut être dû à la compétition avec le NAD^+, qui est le substrat de la PARP-1. L'inhibition de la PARP-1 est fortement corrélée à l'activité neuroprotectrice de la minocycline dans des cultures de neurones (Alano et al., 2006). Par ailleurs, l'inhibition de la PARP-1 est associée aux effets anti-inflammatoires (Graziani et al., 2005), et elle conduit aux effets neuroprotecteurs dans le TC (Besson et al., 2003, 2005 ; Kövesdi et al., 2010 ; Lescot 2010b).

La minocycline exerce une activité anti-inflammatoire en agissant principalement sur les microglies, qui constituent une source cellulaire majeure à l'origine de la neuro-inflammation induite par des lésions ou des pathologies du SNC. La minocycline réduit la prolifération et l'activation des cellules microgliales (Fan et al., 2005; Bye et al., 2007; Homsi et al., 2009 ; Lazarini et al., 2012) et elle ainsi diminue la libération de différents médiateurs de l'inflammation comme des cytokines, telles que l'IL-1ß et le TNFα (Tikka et al., 2001, 2002; Chen et al., 2000; Kim et al., 2004; Bye et al., 2007; Crack et al., 2009 ; Homsi et al., 2009) et des chémokines (Kremlev et al., 2004). La minocycline diminue également la production et l'activité des MMPs notamment les MMP-2, -9 et -12 (Brundula et al., 2002; Homsi et al., 2009), transcription et l'activité de la NOS_2 ainsi que la libération du NO (Kim et al., 2004). Par ailleurs, l'activité de la NADPH oxydase (Wu et al., 2002) et de la COX-2 ainsi que la production de la prostaglandine E_2 (PGE_2) (Yrjanheikki et al., 1999; Kim et al., 2004) sont inhibées par la minocycline. De plus, l'effet neuroprotecteur de la minocycline peut être associé à sa capacité à réduire la transmigration des leukocytes (Brundula et al., 2002) ou à bloquer l'activité protéolytique de la calpaïne (Arvin et al., 2002).

Il semble que ces effets anti-inflammatoires sont partiellement mises en jeu par l'inhibition de la phosphorylation de la p38 MAPK (Lin et al., 2001; Tikka et al., 2001, 2002; Guo et al., 2007) ou par l'inhibition de la PARP-1 au niveau des microglies (Alano et al., 2006).

Activité anti-apoptotique

Dans différents modèles expérimentaux, il a été montré que la minocycline est capable de réduire la taille de la lésion (Yrjanheikki et al., 1999; Dommergues et al., 2003 ; Homsi et al., 2010) et diminuer la mort neuronale (Wu et al., 2002; He et al., 2001; Tikka et al., 2001; Lin et al., 2001; Guo et al. 2007).

En effet, la minocycline inhibe l'expression et l'activité de la caspase-1 (Chen et al., 2000; Sanchez-Mejia et al., 2001) et de la caspase-3 (Chen et al., 2000; Arvin et al., 2002). La minocycline agit également en inhibant la libération du cytochrome *c,* bloquant ainsi l'ouverture des mPTPs (*mitochondrial permeability transition pores*) (Matsuki et al., 2003; Gieseler et al., 2009). Cependant, elle peut également perturber plusieurs fonctions mitochondriales dépendantes d'énergie *in vitro* (Kupsch et al., 2009).

3. LA MINOCYCLINE ET LES PATHOLOGIES DU SNC

La minocycline a été utilisée dans divers modèles animaux des pathologies du SNC comme l'IC, le traumatisme médullaire (SCI), l'hémorragie intracérébrale (HIC) et la maladie d'Alzheimer (AD) entre autres (**Tableau 9**).

À ce jour, peu d'études ont montré des effets délétères de la minocycline dans ces différents modèles (**Tableau 9**).

4. LA MINOCYCLINE ET LE TRAUMATISME CRANIEN

L'intérêt thérapeutique de la minocycline dans le TC a été mis en évidence ces dernières années (Sanchez-Mejia et al., 2001; Bye et al., 2007 ; Homsi et al., 2009 ; 2010 ; Wu et al. ; 2009 ; Abdel Baki et al., 2010 ; Kelso et al., 2011). Il a été décrit que la minocycline exerce un effet anti-inflammatoire post-TC qui s'accompagne d'une réduction de l'activation microgliale et d'une amélioration fonctionnelle (Sanchez et al., 2001 ; Bye et al., 2006). Récemment, notre laboratoire a été le premier à montrer que la minocycline exerce un effet anti-œdémateux et une amélioration fonctionnelle à long terme, à savoir une diminution de l'activité locomotrice, dans un modèle de percussion mécanique chez la souris (Homsi et al., 2009 ; 2010).

Crack et collaborateurs (2009) ont étudié la modification d'expression des gènes de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires afin d'étudier l'effet de la minocycline sur l'expression de ces gènes après le TC. Cette étude a confirmé le fait que plusieurs voies de régulation sont activées ou réprimées à la suite d'un TC, et que la minocycline s'oppose à la modification post-traumatique de certaines d'entre elles. Plus précisément, la minocycline diminue l'expression de gènes des chimiokines CCL4, CXCL1 et CXCL2 et des cytokines, comme IL-1 et IL-6.

En outre, deux études récentes ont démontré l'effet neuroprotecteur de la minocycline sur le plan cognitif post-TC (Abdel Baki et al., 2010 ; Kelso et al., 2011), lors d'une co-administration avec la N-acétylcystéine (Abdel Baki et al., 2010) ou avec la mélatonine (Kelso et al., 2011).

5. LES ESSAIS CLINIQUES AVEC LA MINOCYCLINE

Les études expérimentales *in vitro* et *in vivo* ont favorisé le passage de la minocycline aux essais cliniques pour le traitement de différentes pathologies du SNC (**Tableau 10**), telles que l'ischémie cérébrale et la maladie de Huntington. Ces données renforcent l'intérêt de la minocycline dans le traitement du TC et, à cet égard, il est important de rappeler qu'en Février 2010 la minocycline est entrée en essai clinique chez les traumatisés crâniens aux Etats-Unis (www.clinicaltrials.com).

Tableau 7 : Mécanismes d'action proposés à l'origine de l'effet neuroprotecteur de la minocycline (1/2).

Mécanismes d'action	Références
Chélation des ions bivalents	
Chélation des ions Ca^{2+} et Fe^{2+}	Chen-Roetling et al., 2009 ; Antonenko et al., 2010 ; Garcia-Martinez et al., 2010 ; Zhao et al., 2011
Activité anti-oxydante et anti-excitotoxique	
Réduction de la production des EROs et piégeur de radicaux libres	Kraus et al., 2005; Morimoto et al., 2005 ; Gieseler et al., 2009 ; Schildknecht et al., 2010
Réduction de la libération de glutamate et de Ca^{2+}	Gonzalez et al., 2007
Activité anti-inflammatoire	
Réduction de la prolifération/ activation des microglies	Bye et al., 2007; Eikelenboom et al., 2008; Filipovic et al., 2008 ; Homsi et al., 2010 ; Lazarini et al., 2012 ; Ng et al., 2012
Diminution de la libération des cytokines et chimiokines	Tikka et al., 2001, 2002; Chen et al., 2000; Kim et al., 2004 ; Kremlev et al., 2004 ; Bye et al., 2007 ; Dunston et al., 2010
Diminution de la production/ activité des MMPs	Brundula et al., 2002; Crack et al., 2009
Diminution de la transcription/ activité NOS2 et la libération de NO	Tikka et al., 2001, 2002 ; Wu et al., 2002; Kim et al., 2004 ; Ferretti et al., 2012
Diminution de la transcription/ activité COX-2 et la production de PGE2	Yrjanheikki et al., 1999; Kim et al., 2004 ; Ferretti et al., 2012
Blocage de l'activité de la calpaïne	Arvin et al., 2002
Inhibition de la voie de phosphorylation de p38 MAPK	Lin et al., 2001; Tikka et al., 2001, 2002; Guo et al., 2007

Tableau 7 : Mécanismes d'action proposés à l'origine de l'effet neuroprotecteur de la minocycline Suite (2/2).

Mécanismes	Références
Activité anti-inflammatoire (suite)	
Diminution de la transcription/ activité PARP-1	Alano et al., 2006
Diminution de l'activité de BACE1 et de la production d'Aβ	Ferretti et al., 2012
Activité anti-apoptotique	
Inhibition de l'expression/activité caspase-1	Chen et al., 2000; Sanchez-Mejia et al., 2001
Inhibition de l'expression/activité caspase-3	Arvin et al., 2002 ; Chen et al., 2000; Stirling et al., 2005; Zhu et al., 2002
Diminution de la libération de cytochrome c et de l'ouverture des mPTP	Zhu et al., 2002; Matsuki et al., 2003; Stirling et al., 2005; Gieseler et al., 2009 ; Garcia-Martinez et al., 2010

BACE : beta-site APP cleaving enzyme; Caspase : cysteinyl aspartate-specific proteinase; COX : cyclo-oxygénase; EROs : espèces réactives de l'oxygène; MAPK : mitogen-activated protein kinase; MMPs : métallo-protéinases de la matrice; mPTPs : mitochondrial permeability transition pores; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogéné; NO : monoxyde d'azote; NOS2 : NO-synthase inductible; PARP : poly (ADP)-ribose polymérase; PGE : prostaglandine. Adapté et mis à jour de Homsi, 2010.

Tableau 8 : Effets *in vitro* de la minocycline (1/2).

Système *in vitro*		**[minocycline]**	**Effets de la minocycline**	**Références**
Culture des cellules non nerveuses	Culture cellulaire de microglies	1-10 µM	↓ la production microgliale de l'IL-1ß, IL-6, NGF et TNFα	Seabrook et al., 2006
	Culture de cellules PC12 NGF-différenciées, traitée par Aß$_{1-42}$	10 µM	↓ l'augmentation d'eIF-2α, l'activation de caspase-12 et la phosphorylation des ARN double brin-dépendant de sérine/threonine protéine kinases induite par Aß$_{1-42}$	Choi et al., 2007
	Culture cellulaire de microglies	1 ou 10 µM	↓ la production d'IL-1ß et de TNFα induite par la thrombine	Wu et al., 2009
Culture des cellules nerveuses	Culture de neurones de la couche granulaire du cervelet de rat	10 µM	↓ la mort neuronale, la génération des radicaux libres et neurotoxicité induites par 6-OHDA	Lin et al., 2003
	Culture de neurones corticaux	30 µM	Chélation des ions de Fe^{3+} et protection des neurones	Chen-Roetling et al., 2009
	Culture neuronale mixte de rat	3, 10, 30 ou 100 µM	effet antioxydant potentiel en piégeant les radicaux libres	Kraus et al., 2005
	Culture de neurones corticaux du fœtus de rat	0,2 ou 2 µM	↓ la mort neuronale induite par le glutamate et la péroxydation des lipides, piégeur des radicaux libres	Morimoto et al., 2005
	Culture de neurones corticaux de souris avec PARP-1 activée par des agents génotoxiques tels que MNNG et SIN-1	100 nM	↓ la mort neuronale, bloque l'épuisement de la NAD^+ neuronale et la formation de PAR	Alano et al., 2006
	Culture de neurones corticaux traités par la roténone de l'embryon de rat	100 µM	effet antioxydant potentiel, diminution dose-dépendante de l'ouverture des mPTPs, diminution de la dérégulation de Ca^{2+} induite par la roténone	Gieseler et al., 2009

Tableau 8 : **Effets *in vitro* de la minocycline Suite (2/2).**

Système *in vitro*		**[minocycline]**	**Effets de la minocycline**	**Références**
Culture des cellules nerveuses	Culture primaire de neurones corticaux de l'embryon de rat	10 µM	↓ la mort neuronale, l'activation de caspase-3 et la génération des fragments de protéine tau clivés par caspase-3 induites par Aß	Noble et al., 2009
	Culture de neurones hippocampiques de l'embryon de rat	10-150 µM	↓ la mort et l'excitabilité neuronale, ↓ la libération du glutamate et du Ca^{2+} et l'amplitude des courants excitateurs post-synaptiques	Gonzalez et al., 2007
	Culture de neurones cervicaux de rat	100 µM	↓ activité de NADH-cytochrome c reductase et ↓ de l'activité de la cytochrome-c oxidase ↓ERO et ↓Ca^{2+}	Garcia-Martinez et al., 2010
	Culture neuronale et microgliale (souris)	2 µM	↓ mort neuronale due à la manque de glucose et d'oxygène	Huang et al., 2010

↓ : diminution; ↔ : inchangé; 6-OHDA : 6-Hydroxydopamine; Aß : ß-amyloïde; ARN : acide ribonucléique; Ca^{2+}: calcium; Caspase : cysteinyl aspartate-specific proteinase; eIF-2α : eukaryotic initiation translation factor 2 alpha; IL : interleukine; KCl : chlorure de potassium; MMPs : métalloprotéinase de la matrice extracellulaire; MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; MPP+ : 1-methyl-4-phenyl-pyridinum ion;; mPTPs : mitochondrial permeability transition pores; NAD^+ : nicotinamide adénine dinucléotide; NGF: facteur de croissance neuronal; PAR : poly (ADP)-ribose; PARP : poly-(ADP)-ribose polymérase; SIN-1 : 3-morpholinosydnonimine; TNF-α: tumor necrosis factor α. Adapté et mis à jour de Homsi, 2010.

Tableau 9 : Effets *in vivo* de la minocycline dans des modèles animaux des pathologies du SNC (1/5).

Pathologie SNC	Modèle animal	Espèce	Protocole d'administration	Effets de traitement	Référence
Traumatisme crânien (TC)	impact cortical contrôlé (crâne ouvert)	rat	45 mg/kg de minocycline co-administrée avec 150 mg/kg de N-acétylcystéine (i.p.) à 1h, 24h et 48h post-TC	Minocycline seule et en co-administration avec la N-acétylcystéine : ↓ la dégradation de la myéline, le déficit cognitif post-TC.	Abdel Baki et al., 2010
	lâcher de poids (crâne fermé)	souris	90 mg/kg (i.p.) 5 min après le TC puis 45 mg/kg (i.p.) à 3 et 9h post-TC	↓ la taille de lésion, la production d'IL-1ß, l'activation des MMP-9, l'œdème cérébral, l'activation microgliale et l'hyperactivité locomotrice	Homsi et al., 2009 ; 2010
	impact cortical contrôlé (crâne ouvert)		45 mg/kg (i.p.) 12h av. TC puis 90 mg/kg (i.p.) 30 min, 12 et 24h puis 45 mg/kg 2/j jusqu'au sacrifice (J 1,2,3 ou 4), évaluations à J1 et J4	↓ la taille de lésion et la production d'IL-1ß, ↑ la fonction neurologique et ↑ l'activation de caspase-1	Sanchez-Mejia et al., 2001
			90 mg/kg (i.p.) 30 min, 12 et 24h puis 45 mg/kg 2/j jusqu'au sacrifice (J 1,2,3 ou 4), évaluations à J1 et J4		
	lâcher de poids (crâne ouvert)		45 mg/kg (i.p.) 30 min et 12h post-TC, évaluations à 2, 6 et 24h	modification de profils d'expression de gènes (IL-1, IL-6, caspase-3, -8, Bcl2,…..)	Crack et al., 2008
	lâcher de poids (crâne ouvert)		45 mg/kg (i.p.) 30 min et 2/j jusqu'à 3j max., évaluations à J1 et J4	↓ l'activation microgliale et la production d'IL-1ß	Bye et al., 2007
Ischémie cérébrale (IC)	IC/ hypoxie	souris (nn)	45 mg/kg (s.c.) 12h av. fin HI 2/j1 puis 23 mg/kg 2/j 2,3	↑ la lésion cérébrale surtout dans le striatum, ↔ la mortalité et le poids corporel	Tsuji et al., 2004
			135 mg/kg (s.c.) 12h av. fin HI 2/j1 puis 68 mg/kg 2/j 2,3		
	IC focale OPACM	Souris (MMP-9$^{-/-}$)	45 mg/kg (i.p.) 12h av. IC ou 2h post-IC puis 60 mg/kg 2/j1 puis 45 mg/kg 2/j 2,3	↓ la taille de lésion et les pro MMP-2 et -9	Koistinaho et al., 2005
	IC focale OTACM (2h)	souris	45 mg/kg (i.p.) 30 min puis 12h post-IC	↓ la taille de lésion, l'ouverture de la BHE et l'hémorragie et ↑ le score neurologique	Yenari et al., 2006
	IC focale OTACM (3h)	rat	45 mg/kg (i.p.) 5 min puis 12h post-IC	↓ les formes actives de MMP-2 et -9	Machado et al., 2006

Tableau 9 : **Effets *in vivo* de la minocycline dans des modèles animaux des pathologies du SNC Suite (2/5).**

Pathologie SNC	Modèle animal	Espèce	Protocole d'administration	Effets de traitement	Référence
Ischémie cérébrale (IC)	IC/ hypoxie	souris (nn)	45 mg/kg (s.c.) 12h av. fin HI	↓ la lésion cérébrale, ↔ la mortalité, poids corporel	Tsuji et al., 2004
		rat (nn)	45 mg/kg (i.p.) 12h av. fin HI		
			45 mg/kg (i.p.) directement av. fin HI		
	IC focale OTACM (90 min)	rat	3 ou 10 mg/kg (i.v.) 4h ou 5h post-IC 3x avec une intervalle de 4h	↓ la taille de lésion, ↑ la fonction neurologique	Xu et al., 2004
	IC focale OTACM (4h)	souris	1, 5 ou 10 mg/kg (i.p.) 24h post-IC puis 1/j jusqu'à J14	↑ la survie, l'atrophie et le score neurologique et ↓ les microglies	Hayakawa et al., 2008
	IC focale OTACM (60 min) ou OPACM	souris	45 mg/kg (i.p.) 2h post-IC 1/j, 3 jours max.	↓ la taille de lésion, ↑ la fonction neurologique	Weng & Kriz, 2007
	IC/ hypoxie	rat (nn)	45 mg/kg (i.p.) 2h post-HI puis 22,5 mg/kg 1/j pendant 7 jours	↓ l'activation microgliale, ↓ la lésion de substance blanche et ↑ le contenu en myéline	Carty et al., 2008
			22,5 mg/kg (i.p.) 2h post-HI puis 10 mg/kg 1/j pendant 7 jours		
	IC focale OTACM (2h)	rat	90 mg/kg (i.p.) 2h post-IC puis 45 mg/kg 1/j	↓ l'activation microgliale, les PMN, l'activité MPO et la neurogenèse	Kim et al., 2009
	IC focale OTACM (3h)	rat (avec tPA)	3 mg/kg (i.v.) 5 min après tPA puis 45 mg/kg (i.p.) à 12h	↓ la mortalité, MMP-2 et -9 et l'incidence d'hémorragie, ↔ l'effet fibrinolytique de tPA ou l'œdème cérébral et ↑ le score neurologique	Machado et al., 2009
			45 mg/kg (i.p.) 5 min après tPA puis 45 mg/kg (i.p.) à 12h	↔ sur les MMP-2 et -9, l'effet fibrinolytique de tPA, le score neurologique ou l'œdème cérébral	

Tableau 9 : Effets *in vivo* de la minocycline dans des modèles animaux des pathologies du SNC Suite (3/5).

Pathologie SNC	Modèle animal	Espèce	Protocole d'administration	Effets de traitement	Référence
Ischémie cérébrale (IC)	IC focale OTACM	rat (avec tPA)	3 mg/kg (i.v.) 4h post-IC + tPA 6h post-IC	↓ la taille de lésion, l'hémorragie cérébrale et la MMP-9 plasmatique	Murata et al., 2008
	IC focale OTACM (90 min)	rat	30 mg/kg (i.v.) 1h post-IC puis 30 mg/kg (i.p.) 2/j	↓ la taille de lésion, la dégradation de la BHE et les MMP-2 et -9 et ↑ le score neurologique	Nagel et al., 2008
Traumatisme médullaire (SCI)	T10 contusion	rat	90 mg/kg (i.p.) 1h post-SCI puis 45 mg/kg 2/j jusqu'à J5	↓ la perte tissulaire et l'astrogliose, ↓ la libération cytosolique de cytochrome *c*, ↑ la fonction locomotrice	Teng et al., 2004
	T3/4 compression	souris	50 mg/kg (i.p.) 1h et 24h post-SCI puis 25 mg/kg 1/j jusqu'à J5	↓ la mortalité, la taille de lésion et ↑ la fonction locomotrice	Wells et al., 2003
	C7-C8 transection de la colonne dorsale	rat	50 mg/kg (i.p.) 30 min et 12h post-SCI puis 2/j jusqu'à J3	↓ la taille de lésion, l'activation microgliale et les microglies et oligodendrocytes apoptotiques et ↑ la fonction neurologique	Stirling et al., 2004
	T13 hemisection de la moelle épinière	rat	40 mg/kg (i.p.) 30 min post-SCI 2/j jusqu'à J2	↓ l'activation microgliale et le développement de sensation de douleur	Marchand et al., 2009
Stress oxydant	Injection stéréotaxique de NMDA dans le striatum	rat	90 mg/kg/j (i.p.) à 2h post-injection	↓de la perte de myéline et ↓ de la mort des oligodendrocytes	Guimaraes et al., 2010
	Aß injectée dans l'hippocampe de rat	rat	50 mg/kg (i.p.) H0 après l'injection de Aß et à 12h puis 25 mg/kg 1/j	↓ les microglies, les astrocytes, la perte neuronale et la COX_2	Ryu et al., 2004
Traumatisme médullaire (SCI)	T9 contusion contrôlée	rat	30 mg/kg (i.p.) 0,5, 1 et 24h post-SCI et 90 mg/kg (i.p.) 0,5 ou 1 ou 24h post-SCI	↑ la fonction motrice et ↓ l'activation microgliale, TNFα, caspase-3 et les protéines clivées par les caspases	Festoff et al., 2006

Tableau 9 : Effets *in vivo* de la minocycline dans des modèles animaux des pathologies du SNC Suite (4/5).

Pathologie SNC	Modèle animal	Espèce	Protocole d'administration	Effets de traitement	Référence
Traumatisme médullaire (SCI)	T9-T10 contusion	rat	90 mg/kg (i.p.) H0 puis 45 mg/kg 12 et 24h post-SCI	pas d'amélioration histologique ou comportementale	Pinzon et al., 2008
			90 mg/kg (i.v.) H0 puis 45 mg/kg 12 et 24h post-SCI		
Hémorragie intracérébrale (HIC)	injection de la collagénase type IV	rat	45 mg/kg (i.p.) 3h et 15h post-HIC puis 22,5 mg/kg 2/j jusqu'à J5	↓ l'activation microgliale, → taille de lésion ou de la fonction neurologique	Szymanska et al., 2006
	infusion de la collagénase type IV	rat	45 mg/kg (i.v.) 6h post-HIC puis 45 mg/kg (i.p.) 24, 48 et 72h post-HIC	↓ l'activation microgliale et les neutrophiles, ↔ sur la taille de lésion et la perte neuronale, ↓ l'œdème cérébral, la perte de microvaisseaux, les neutrophiles et l'expression de TNF-α et MMP-12	Wasserman & Schlichter, 2007a,b
	infusion du sang autologue	rat	45 mg/kg (i.p.) à 2 et 12h post-HIC, suivi par 22.5 mg/kg (x2/j) pendant 7 j	↓ du Fe^{3+} et ↓ mort neuronale	Zhao et al., 2011
	infusion du sang autologue	rat	45 mg/kg (i.p.) 0h et 12h post-HIC puis 22,5 mg/kg 2/j 2 et 3	↓ l'œdème cérébral, l'atrophie cérébrale et le déficit neurologique	Wu et al., 2010
Stress oxydant	Injection stéréotaxique de NMDA dans le striatum	rat	90 mg/kg/j (i.p.) à 2h post-injection	↓de la perte de myéline et ↓ de la mort des oligodendrocytes	Guimaraes et al., 2010
	Aß injectée dans l'hippocampe de rat	rat	50 mg/kg (i.p.) H0 après l'injection de Aß et à 12h puis 25 mg/kg 1/j	↓ les microglies, les astrocytes, la perte neuronale et la COX_2	Ryu et al., 2004
La maladie de Parkinson (PD)	Par l'injection de MPTP	souris	60, 90, ou 120 mg/kg/j (per os) pour 9 jours, avant, en cours et après le traitement avec MPTP	↓ la neurotoxicité des neurones dopaminergiques, la perte de la dopamine striatale et ses métabolites et l'expression de la NOS_2 et de la caspase-1 induites par la MPTP, ↔ l'activité de MAO	Du et al., 2001
	Par l'injection de MPTP	souris	45 mg/kg (i.p.) 2/j (J-1) et (J0) puis 22,5 mg/kg (i.p.) 2/j (J1)	↓ l'activation microgliale, ↑ la perte des neurones dopaminergiques	Yang et al., 2003
La sclérose en plaque (SEP)	EAE	souris	50 mg/kg (i.p.) 2/j pour 2j, puis 50 mg/kg 1/j pour 5j, puis 25 mg/kg 1/j jusqu'à sacrifice	retard de début et la progression de la maladie, ↓ la sévérité des symptômes et la démyélinisation des nerfs optiques	Brundula et al., 2002

Tableau 9 : Effets *in vivo* de la minocycline dans des modèles animaux des pathologies du SNC Suite (5/5).

Pathologie SNC	Modèle animal	Espèce	Protocole d'administration	Effets de traitement	Référence
La maladie d'Alzheimer (AD)	Aß infusée	rat	50 mg/kg/j (i.p.) pour 7 jours	↓ la difficulté d'apprentissage et de mémorisation	Choi et al., 2007
	transplantation de cellules de la moëlle osseuse	souris AD + LPS	50 mg/kg (i.p.) 2h av. LPS puis 2/j pour 2 jours	modulation des aspects inflammatoires des microglies/macrophages	Malm et al., 2008
	Injection de protéine ''tau''	souris	10 mg/kg/j (i.p.) pour 14 jours	↓ la phosphorylation de la protéine tau et la tau insoluble clivée par la caspase-3	Noble et al., 2009
La maladie de Huntington (HD)	R6/2	souris	5 mg/kg/j (i.p.)	retarde la progression de la maladie, ↓ l'activité NOS_2 et caspase-1 et -3	Chen et al., 2000
	Injection d'acide quinolinique	rat	50 mg/kg (i.p.) 1h av. et 12h après injection puis 25 mg/kg/j pour 7 ou 21 jours	↓ l'activation des microglies et des astrocytes, les protéines de COX_2 et NOS_2, la phosphorylation lipidique, la lésion oxydative de l'ADN, la production des EROs et la perte neuronale	Ryu et al., 2006
	Par l'injection de 3-NP	souris	45 mg/kg (i.p.) 2/j	↑ la difficulté motrice et la perte des cellules striatales	Diguet et al., 2003
La sclérose latérale amyotrophique (SLA)	SOD^{G37R}	souris	1 g/kg (per os; dans la nourriture)	↑ la survie de l'animal, retarde l'inflammation, la dégénérescence et la progression de la maladie	Kriz et al., 2002
	$SOD1^{G93A}$	souris	10 mg/kg/j (i.p.)	retarde le début de la maladie et du déficit moteur, ↓ la mort cellulaire, l'activation des caspases 3,9 et ↓ la libération de cytochrome *c*	Zhu et al., 2002
	$SOD1^{G93A}$	souris	22 mg/kg/j (i.p.)	↑ la fonction motrice et la survie	Zhang et al., 2003
Douleur neuropathique	Ligation du nerf spinal (SNL)	rat	100 μg/rat, injectée (i.t.) à 1, 3, 7, 10 ou 21 j post-SNL	↓ activation des microglies spinaux, ↓de l'allodynie	Mei et al., 2011
Dépression	*Learned Helplessness*	rat	Injection stéréotaxique de 160 ou 20 µg/10 min	↑sérotonine et dopamine, ↓dépression	Arakawa et al., 2011

↑ : augmentation; ↓ : diminution; ↔ : inchangé; 3-NP : 3-Nitropropionic acid; Aß : ß-amyloïde; ADN : acide désoxyribonucléique; av. : avant; BHE : barrière hémato-encéphalique; Caspase : cysteinyl aspartate-specific proteinase; COX : cyclo-oxygénase; EAE : encephalomyelite autoimmune experimentale, EROs : espèces réactives de l'oxygène; HI : hypoxie/ ischemie; IL : interleukine; i.p. : intrapéritonéale; i.v. : intraveineuse; j : jour; LPS : lipopolysaccharides; max : maximum; MAO : monoamine oxydase; MMPs : métalloprotéinase de la matrice extracellulaire; MPO : myéloperoxydase; MPTP : 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; nn : nouveau-né; NOS2 : NO-synthase inductible; OPACM : occlusion permanante de l'artère cérébrale moyenne; OTACM : occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne; per os : par voie orale; PGE : prostaglandine; PMN : polymorphonucléaire neutrophile; s.c. : sous-cutané; SNC : système nerveux central; TNF-α: tumor necrosis factor α; tPA : activateur de la plasminogène tissulaire. Adapté et mis à jour de Homsi, 2010.

Tableau 10 : Les essais cliniques les plus récents avec la minocycline pour des pathologies du SNC.

Pathologie	Identifiant	Phase	Associations	Doses	Dates de l'étude	Sponsor
Dépression bipolaire	NCT01514422	Phase IV	-	Per os: 100 to 300 mg pour 8 semaines	Mai 2011- Novembre 2013	*Mount Sinai School of Medicine*
	NCT01429272	Phase III	aspirine	Per os : 100 mg 2x/j pour 6 semaines	Septembre 2011- Septembre 2013	*Laureate Institute for Brain Research* et *Stanley Medical Research Institute University of Oklahoma*
	NCT01403662	Phase III	-	Per os : 100 mg 2x/j pour 8 semaines	Jul.2011- Août 2013	*University Health Network, Toronto*
IC	NCT01556802	Phase I	-	Per os : 100mg 2x/j pour 5 jours	Octobre 2011- Janvier 2013	Hôpital Universitaire Hernando Moncaleano Perdomo
MA	NCT01463384	Phase II	-	Per os: 50mg, 2 x/j pour 6 mois	Septembre 2011- Novembre 2012	*Huntington Medical Research Institutes*
Schizophrénie	NCT01433055	Phase III	clozapine	Per os : 50, 75 and 100 mg pendant 10 semaines	Juillet 2011- Juillet 2016	Université de Maryland
	NCT01133080	Phase IV	-	Per os: 100 mg 2x/j pour 2 semaines et 200 mg x2/j pendant les semaines 3-5.	Janvier 2010-Janvier 2013	*Shalvata Mental Health Center*
	NCT01403662	Phase III	-	Per os : 100 mg 2x/j pour 8 semaines	Jul.2011- Août 2013	*University Health Network, Toronto*
TC	**NCT01058395**	**Phase I et II**	**-**	**800 mg puis 200 mg 2x/j ou 800 mg puis 400 mg 2x/j jusqu'à 7j**	**Fév. 2010 – Jan.2014**	***Wayne State University***

Adapté de http://clinicaltrials.gov/
IC : Ischémie cérébrale; MA : Maladie d'Alzheimer ; TC : traumatisme crânien

CHAPITRE 5 : L'ETAZOLATE

1. GENERALITES

L'étazolate est un inhibiteur des phosphodiésterases de type 4, appartenant à la famille des pyrazolopyridines **(Fig. 16)**, dont la capacité de moduler les récepteurs $GABA_A$ ($RcGABA_A$) et d'augmenter l'effet des benzodiazépines a été très étudiée pendant les années 1970 et 1980. Depuis, d'autres propriétés lui ont été attribuées **(Tableau 11**), telles que l'antagonisme des Rc de l'adénosine. Plus récemment, une étude a montré que l'étazolate est capable de stimuler l'activité des α-sécrétases et la production de la sAPPα *in vivo* et *in vitro* et de s'opposer à la toxicité induite par le peptide neurotoxique Aβ (Marcade et al., 2008). Par ailleurs, l'étazolate est récemment entré en essai clinique de phase IIA pour le traitement de la maladie d'Alzheimer avec des premiers résultats encourageants (Vellas et al., 2011).

Cependant, jusqu'à ce moment aucune étude ne s'est intéressée à l'évaluation de l'intérêt thérapeutique de l'étazolate dans les lésions cérébrales, qu'elles soient d'origine ischémique ou traumatique.

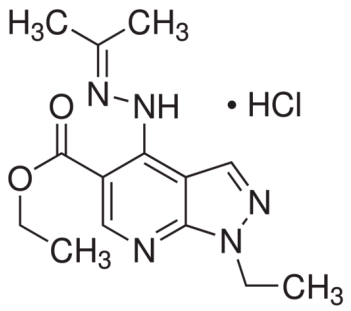


Figure 16 : Structure chimique de l'étazolate.

2. LES MECANISMES D'ACTION DE L'ETAZOLATE

2.1. Inhibition des phosphodiésterases de type 4

Plusieurs études ont montré la capacité importante d'étazolate à inhiber sélectivement les phosphodiésterases de type 4 (Chasin et al., 1972 ; Schultz et al., 1974 ; Glass et al., 1979 ; Wang et al., 1997 ; Alonso et al., 2006). Les phosphodiésterases (PDE) sont des enzymes présentes dans de nombreux types de cellules, incluant les hépatocytes, les cellules musculaires, les neurones, les cellules rénales, cardiaques, pulmonaires, sanguines et inflammatoires.

Type d'étude	ETAZOLATE	Références
Mécanisme(s) d'action		
in vitro	Inhibition sélective de la PDE4 et stimulation de la production de l'AMPc	Chasin et al., 1972 ; Schultz et al., 1974; Glass and Moore, 1979 ; Wang et al., 1997 ; Alonso et al., 2007
in vitro	Modulation des $RcGABA_A$ et stimulation de la voie $GABA_A$érgique	Williams et Risley, 1979 ; Supavilai et Karobath 1979 ; 1980 ;1981 ; Placheta et Karobath., 1980 ; Leeb-Lundberg et al., 1981 ; Olsen et al., 1981 ; Barnes et al., 1983 ; Borea et al., 1983
in vitro	Antagonisme de l'activité de l'adénosine	Schultz et al., 1974 ; Psychoyos et al., 1981
in vitro	Inhibition du TNFα cardiaque	Bergman et al., 1996
in vitro	Inhibition de l'IL-13 et de la LTC4 pulmonaires	Yao et al., 2005
in vitro et in vivo	Stimulation de l'activité des α-sécrétases	Marcade et al., 2008
Effets pharmacologiques		
in vitro	Facilitation de la neurotransmission au niveau de la jonction neuromusculaire	Jacobs et McNiece, 1977
in vivo	Effets anxiolytiques	Beer et al., 1972; 1978
in vivo	Effets neuroprotecteurs et pro-cognitifs	Marcade et al., 2008; Drott et al., 2010
Etude clinique & Brevet		
Phase IIA	Maladie d'Alzheimer (159 patients) EHT-0202 : 3 mois à 40 ou 80 mg, 2x/ j Bien toléré	Vellas et al., 2011
Brevet EP1594498	Traitement potentiel pour les maladies neurodégénératives oculaires	compagnie pharmaceutique 'Exnhit Therapeutics' (2010)

Tableau 11 : Etazolate : mécanismes d'action, effets pharmacologiques, étude clinique & brevet.

Selon leur spécificité, les PDEs sont divisées en 3 catégories :

- Les PDEs AMPc-spécifiques (PDE4, PDE7, PDE8)
- Les PDEs GMPc-spécifiques (PDE5, PDE9)
- Les PDEs non-spécifiques, qui agissent sur l'AMPc et le GMPc (PDE1, PDE2 et PDE10) (Menniti et al., 2006),

Les inhibiteurs des phosphodiésterases bloquent l'action d'un ou plusieurs sous-types de phosphodiésterases, empêchant ainsi la dégradation de deux messagers secondaires intracellulaires, l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et la guanosine monophosphate cyclique (GMPc), par les différents sous-types de PDE. Bien qu'un grand nombre d'études ait été mené sur les inhibiteurs de PDEs pendant les dernières décennies, leur intérêt thérapeutique a porté jusqu'à maintenant uniquement sur les troubles d'érection et l'hypertension pulmonaire (Menniti et al., 2006). Cependant, l'expression et l'activité des PDEs dans le cerveau sont bien plus importantes que dans d'autres tissus (Williams et al., 1969). C'est pour cela que la recherche actuelle commence à s'intéresser à l'évaluation du potentiel thérapeutique des inhibiteurs de PDEs, notamment des PDE4, dans le traitement des maladies neurodégénératives (Houslay et al., 2005).

LA FAMILLE DES PDE4

Quatre gènes encodent les enzymes PDE4, dont les PDE4A, PDE4B, PDE4D, mais pas les PDE4C, sont exprimés en abondance dans le SNC, notamment dans le cortex cérébral, l'hippocampe, l'hypothalamus, le striatum et la substance noire. Le gène codant pour les PDE4A est localisé sur le chromosome 19, celui codant pour les PDE4B est sur le chromosome 1, celui codant pour les PDE4C est situé sur le chromosome 19, sur un locus proche du gène codant pour les PDE4A et enfin, celui codant pour les PDE4D est localisé sur le chromosome 5 (Houslay et al., 2005).

Les PDE4 constituent la principale famille d'enzymes qui dégradent l'AMPc (Houslay et al., 2003) et probablement la famille de PDEs la plus complexe et la mieux étudiée. Le rôle prépondérant de la voie de signalisation de l'AMPc dans la formation de mémoire à long terme indique bien tout l'intérêt thérapeutique de l'inhibition de PDE4 (Menniti et al., 2006). L'AMPc stimule la phosphorylation de la *AMPc-Response Element Binding protein* (CREB) par la PKA **(Fig. 17)**, qui à son tour stimule différentes cascades intracellulaires impliquées dans la mémoire et dans d'autres phénomènes, comme l'apprentissage et l'anxiété (Carlezon et al., 2005).

Les PDE4 sont exprimées de façon ubiquitaire dans différents tissus (**Tableau 12**) et peuvent être régulées par phosphorylation *via* différentes kinases, telles que la protéine

kinase A (PKA) et l'ERK (*Extracellular signal-regulated kinase)* (Beltman et al., 1993), et elles participent donc vivement à la voie de signalisation de l'AMPc (Cherry et al., 1999).

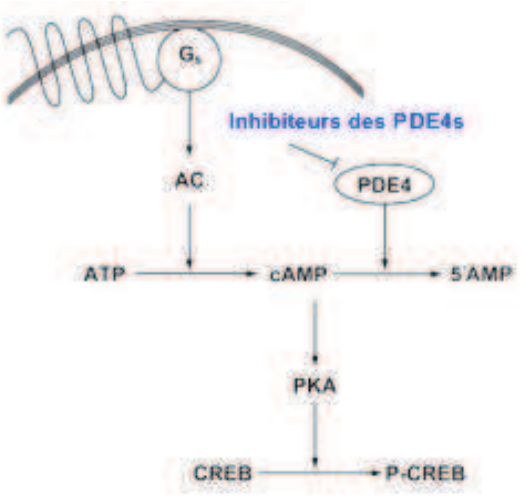


Figure 17 : Le mécanisme d'action des inhibiteurs de phosphodiésterases du type 4 (AC : adénylate cyclase, ATP : adenosine triphosphate, AMPc : adénosine monophosphate cyclique, CREB : AMPc-*response element binding,* PKA : protéine kinase A).

L'INTERET THERAPEUTIQUE DE L'INHIBITION DE PDE4 DANS LE SNC

De nombreuses études ont montré que l'augmentation de la production de l'AMPc, et donc la stimulation de la voie AMPc/CREB, par inhibition de PDE4 favorise la consolidation et la rétention de la mémoire à long terme (Carlezon et al., 2005 ; Rose et al., 2005). Plus précisément, il a été décrit que le rolipram, un puissant inhibiteur de PDE4 qui est utilisé comme produit de référence, facilite l'induction de la potentialisation à long terme (LTP) dans l'hippocampe (Barad et al., 1998) en stimulant la phosphorylation de CREB (Monti et al., 2006). Il a été également décrit que l'inhibition de PDE4 par rolipram s'oppose à la réduction de la phosphorylation de la CREB induite par le glutamate, ainsi qu'à l'inhibition de la LTP produite par le peptide neurotoxique Aβ (Vitolo et al., 2002). L'activation de la cascade AMPc/CREB favorise la mémoire à long terme mais pas la mémoire à court terme. Il serait donc intéressant d'examiner l'intérêt thérapeutique de cette voie dans d'autres fonctions cognitives, telles que l'attention et les fonctions exécutives, dans le but de mieux connaître son potentiel thérapeutique au niveau de la cognition.

En outre, depuis la découverte des effets antidépresseurs de rolipram chez l'homme (Zeller et al., 1984), l'utilisation des inhibiteurs de PDE4 pour le traitement de la dépression suscite un grand intérêt scientifique (Wachtel et al., 1983 ; Overstreet et al., 1989 ; O'Donnell et al., 2004 ; Li et al., 2009). Des études précliniques ont suggéré que les effets antidépresseurs issus de l'inhibition de PDE4 sont dus, entre autres, à l'augmentation de la

production de facteurs de croissance tels que le *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) (Itoh et al., 2004), et à la stimulation de la neurogenèse dans l'hippocampe (Nakagawa et al., 2002). Par ailleurs, une étude récente a montré que l'inhibition de PDE4 améliore le comportement sexuel de la souris (Yuan et al., 2011). Une autre indication thérapeutique potentielle serait le traitement de la psychose, puisque le rolipram a été montré capable de reverser les effets de l'amphétamine chez le rat, par l'inhibition de PDE4s (Maxwell et al., 2004).

Type cellulaire	**PDE4**			
	4A	**4B**	**4C**	**4D**
Eosinophiles	+	+	-	+
Neutrophiles	+	+	-	+
Monocytes	+	+	-	+
Macrophages	+	+	-	+
T cells	+	+	-	+
CD4+	+	+	-	+
CD8+	+	+	-	+
B cells	+	+	-	+
Basophiles	+	+	+	+
Mastocytes	+	+	+	+
Fibroblastes	+	+	+	+
Cellules endothéliales	+	+	nd	+
Cellules épithéliales pulmonaires	+	-	+	+
Cellules musculaires lisses vasculaires	-	-	-	+
Cellules musculaires lisses pulmonaires	-	+	-	+
cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires	+	+	+	+

Tableau 12 : L'expression des sous-familles de PDE4 dans les différents tissus et populations cellulaires humaines (+: présent, - : absent, nd ; non-déterminé) (Press et al., 2009).

De plus, le rolipram exerce des effets anxiolytiques en traitement aigu (Silvestre et al., 1999) et chronique (Li et al., 2009), et il s'oppose à l'expression de la peur conditionnée chez la souris (Mueller et al., 2010). En effet, il a été décrit qu'une réduction du niveau de la

CREB dans l'amygdale est associée à une augmentation de la peur et de l'anxiété (Pandey et al., 2005).

Les effets bénéfiques des inhibiteurs de PDE4 sur la signalisation de CREB, l'expression de BDNF et la neurogenèse pourraient suggérer un potentiel thérapeutique de ces composés dans les maladies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson (Parkes et al.,1984). L'amélioration de la survie des neurones dopaminergiques par une inhibition de PDE4 illustre cet effet bénéfique (Yamashita et al., 1997). Il a été également décrit que l'inhibition de PDE4 s'oppose à la déplétion de dopamine dans le striatum chez des souris ayant été administrées par la toxine MPTP (Hulley et al., 1995).

En ce qui concerne les modèles des lésions aigües, il a été montré que le niveau de l'AMPc est significativement diminué post-TC, et que ce phénomène est associé à une aggravation des lésions secondaires (Atkins et al., 2007). L'inhibition pharmacologique de PDE4 s'oppose à la réduction du niveau de l'AMPc induite par le traumatisme crânien, et elle est associée à une réduction de la lésion focale et des lésions axonales, ainsi qu'à une atténuation de la neuro-inflammation (Atkins et al., 2007). En outre, l'inhibition de PDE4 à été démontrée neuroprotectrice dans le SCI, en favorisant la régénération axonale et la récupération fonctionnelle (Nikulina et al., 2004 ; Pearse et al., 2004). Par ailleurs, un des mécanismes neurotrophiques du BDNF est l'induction de cascades de signalisation qui annulent l'inhibition de la croissance axonale induite par des composés de la myéline. Cela implique une élévation du niveau de l'AMPc qui est secondaire à une inhibition de PDE4 (Gao et al., 2003).

En accord avec les modèles de trauma, l'effet neuroprotecteur de l'inhibition de PDE4 a été également illustré dans un modèle préclinique de la maladie d'Alzheimer chez la souris. Plus précisément, il a été montré qu'un traitement chronique avec le rolipram entraîne une amélioration cognitive persistante (Gong et al., 2004).

L'effet neuroprotecteur issu de l'inhibition des PDE4s pourrait être également lié à un effet anti-inflammatoire bien établi. En effet, dans les leucocytes, la production d'AMPc est stimulée par des catécholamines β-adrénergiques, l'histamine et les prostaglandines E (Moore et al., 1995), qui se lient à un récepteur couplé à une AC qui fournit ensuite de l'AMPc. Ce dernier réduit l'activité cellulaire de la majorité des cellules inflammatoires et diminue quantitativement la libération de l'histamine et des leucotriènes par les mastocytes ainsi que celle des monocytes et diminue la capacité de migration des neutrophiles. Cela s'explique par le fait que l'AMPc fait partie d'un mécanisme endogène de contrôle négatif de la réponse inflammatoire, empêchant une inflammation aiguë de se prolonger en inflammation chronique. Il existe un nombre considérable d'études qui rapportent une activité anti-inflammatoire importante pour les inhibiteurs sélectifs de PDE4. Les plus nombreuses concernent la réaction inflammatoire d'origine allergique, comme l'asthme et celles liées à

une infection bactérienne (ex/choc septique ou syndrome de détresse respiratoire aiguë) (Teixeira et al., 1997). De nombreuses études ont montré le fort potentiel pour les inhibiteurs de PDE4 à inhiber le recrutement des cellules inflammatoires *in vitro* et *in vivo*, et principalement les polynucléaires neutrophiles et les éosinophiles, et de moduler la libération de médiateurs inflammatoires par des cellules résidentes, tels que les macrophages et les mastocytes, ainsi que par les cellules recrutées, telles que les éosinophiles, les neutrophiles et les monocytes (Teixeira at al., 1997).

La plupart des inhibiteurs de PDE4 présentent encore de nombreux effets indésirables qui se traduisent par des vomissements, des diarrhées, une augmentation de la sécrétion d'acide ou une stimulation du système nerveux central. Des données récentes montrent que certains inhibiteurs ayant une structure différente de celle de rolipram entrainent moins d'effets indésirables (Boichot et al., 2000).

2.2. Modulation des récepteurs $GABA_A$

Plusieurs études ont montré l'effet modulateur de l'étazolate sur les récepteurs $GABA_A$. Plus particulièrement, il a été décrit qu'une concentration faible d'étazolate est capable de renforcer la fixation des benzodiazépines à ses récepteurs (Supavilai et Karrobath, 1979, Williams et Risley, 1979 ; Leeb-Lundberg et al., 1981), et que ce renforcement est Cl^--dépendant (Supavilai et Karobath, 1979 ; 1981) et sensible aux antagonistes de $RcGABA_A$, bicuculline et picrotoxine (Leeb-Lundberg et al., 1981 ; Supavilai et Karobath, 1979 ; 1981). En outre, l'étazolate peut stimuler la fixation Na^+-dépendente de GABA (Placheta et Karobath, 1980) ainsi que la fixation GABA-dépendante des benzodiazépines (Supavilai et Karrobath, 1979 ; 1981). Il a été suggéré que le renforcement de la fixation des benzodiazépines par l'étazolate est médiée par une partie du complexe $RcGABA_A$, identifiée comme le site de fixation des picrotoxine/bicuculline (Leed-Lundberg et al., 1981 ; Olsen et al., 1981). Cependant, le(s) site(s) de fixation de l'étazolate au sein du $RcGABA_A$ n'est (sont) pas encore bien élucidé(s).

GENERALITES

Les $RcGABA_A$ sont des récepteurs ionotropes voltage-dépendants, distribués en abondance dans le SNC, qui démontrent une hétérogénéité_considérable (Sieghart et al., 2002). Ces récepteurs-canaux sont des pentamères dans lesquels les sous-unités sont assemblées autour d'un canal ionique central (pore). A l'heure actuelle, différentes sous-unités ont été identifiées, telles que les α_{1-6}, β_{1-3}, γ_{1-3}, δ, ε, π, et θ. La principale forme de récepteur $GABA_A$ comprend au moins trois sous-unités distinctes, α, β et γ **(Fig. 18)**. Les différences dans la distribution anatomique de ces sous-unités et dans leur apparition au

cours du développement suggèrent qu'il existe une grande variabilité de fonctions entre chaque sous-type de récepteur.

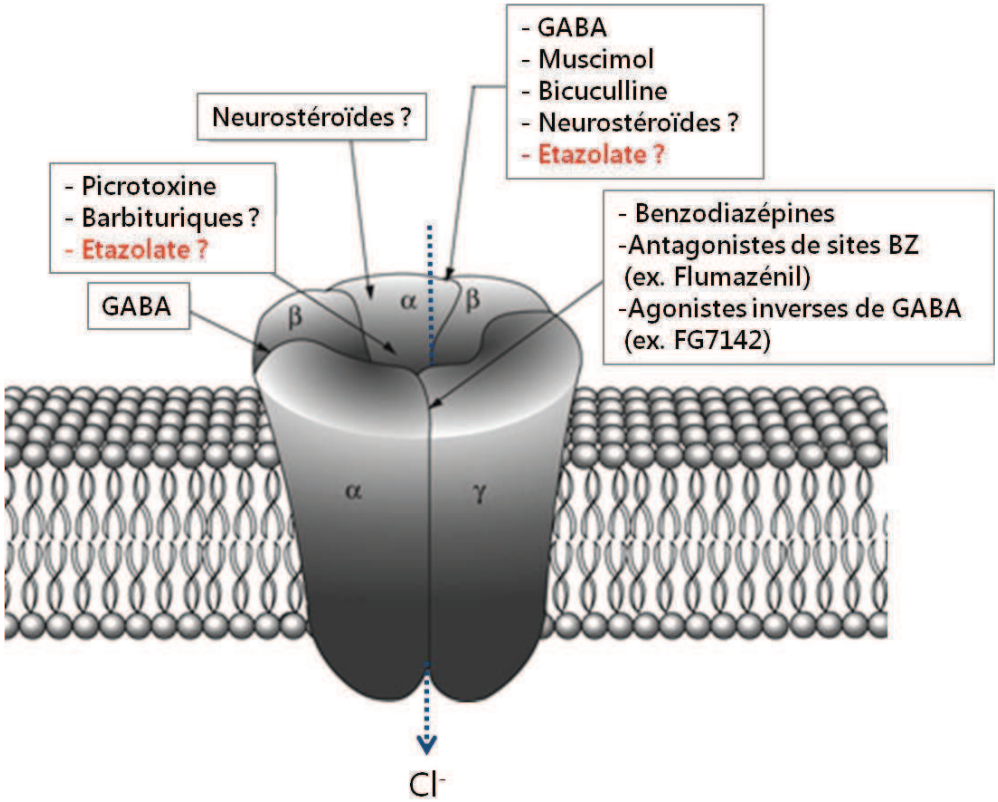


Figure 18 : Schéma hypothétique des différents sites fonctionnels au sein du récepteur $GABA_A$ (Makkar et al., 2010).

Les $RcGABA_A$ sont activés par la fixation de l'acide γ-aminobutyrique (GABA), à l'origine d'un courant entrant de Cl^- hyperpolarisant et donc, inhibiteur. Les $RcGABA_A$ régulent ainsi la neurotransmission inhibitrice rapide dans le SNC mammalien. Ils sont sensibles au muscimol (agoniste) comme à la bicuculline et à la picrotoxine (antagonistes) (Leed-Lundberg et al., 1981). Dans le cerveau mammalien, la majorité des $RcGABA_A$ se trouvent dans le cortex, l'hippocampe, le thalamus, le striatum, les ganglions de la base, le cervelet et la moelle épinière (Belelli et al., 2009). Les $RcGABA_A$ peuvent réguler la voie inhibitrice du SNC en hyperpolarisant la membrane du neurone post-synaptique, entraînant ainsi un potentiel inhibiteur post-synaptique (IPSP) qui réduit la probabilité d'une décharge neuronale (*firing*). Le $RcGABA_A$ est composé de 5 sous unités qui ont différentes propriétés physiologiques et dont l'activation peut induire différents effets pharmacologiques (Sieghart et al., 2006).

En dehors des sites récepteurs au GABA, il existe une variété de sites de liaison topographiquement distincts capables de reconnaître des substances pharmacologiquement actives, comme l'étazolate et d'autres pyrazolopyridines, les benzodiazépines (BZDs), les barbituriques, les neurostéroïdes, les convulsivants ou l'alcool entre autres (Leed-Lumberg

et al., 1981 ; Korpi et al., 2002 ; Sieghart et al.,2006) **(Fig. 18)**. Ces substances n'interagissent pas directement avec le site de liaison de GABA, mais exercent leur activité en agissant de manière allostérique avec les sites récepteurs au GABA et modulent ainsi la réponse au $GABA_A$ (D'Hulst et al., 2009).

L'INTERET THERAPEUTIQUE DE L'ACTIVATION DES RECEPTEURS $GABA_A$ DANS LE SNC

Les BZDs, comme diazépam, sont des puissants composés anxiolytiques, anticonvulsants, myorelaxants, et sédatifs-hypnotiques, souvent utilisés en clinique. Elles favorisent l'action de GABA sur les $RcGABA_A$ en provoquant une modulation allostérique du récepteur. Puisque les composés qui agissent sur le site de fixation des BZD ne sont pas capables d'induire un flux de Cl^- en absence de GABA, ils n'exercent pas une toxicité importante (MacDonald et Olsen, 1994).

De nombreuses données pharmacologiques ont révélé le rôle important des $RcGABA_A$ dans le control de l'excitabilité neuronale, la modulation de l'anxiété, le rythme circadien, la cognition, la vigilance, la mémoire et l'apprentissage (Atack et al., 2011a, b). De façon intéressante, les microglies, les astrocytes ainsi que les macrophages de la périphérie portent des $RcGABA_A$ et ces derniers peuvent moduler la réponse inflammatoire, en diminuant la production de cytokines et en atténuant la réponse immunitaire (Lee et al., 2011a,b). En outre, il a été décrit que l'activation des $RcGABA_A$ au niveau des astrocytes et des microglies entraîne une suppression de l'inflammation provoquée par le LPS, à savoir une réduction de la production des cytokines TNFα et IL-6 et une inhibition des voies inflammatoires NFκB et p38 MAPK (Lee et al., 2011b). Différents déficits de la fonction des $RcGABA_A$ caractérisent des dysfonctionnements neuropsychiatriques tels que l'autisme, l'anxiété, la schizophrénie et l'épilepsie (Moult et al., 2009).

Les études expérimentales sur les lésions cérébrales aigües ont montré une inhibition aigüe et chronique post-lésionnelle de la neurotransmission $GABA_A$érgique, et une stimulation des voies excitatrices, qui pourraient être à l'origine d'une augmentation de l'excitabilité neuronale et de l'épileptogenèse (O'Dell et al., 2000 ; Imbrosci et al., 2011). Par ailleurs, la stimulation des $RcGABA_A$ a été décrite comme stratégie neuroprotectrice dans des modèles expérimentaux de TC et d'ischémie cérébrale (O'Dell et al., 2000 ; Pavlov et al., 2011 ; Rudolph et al., 2011).

2.3. Stimulation de l'activité des α-sécrétases

Une étude a récemment montré que l'étazolate protège les neurones contre la neurotoxicité induite par le peptide Aβ d'une manière qui implique la stimulation des

$RcGABA_A$ et la stimulation de la production de la sAPPα par les α-sécrétases (Marcade et al., 2008) **(Tableau 11)**. Plus précisément, dans une culture de cellules corticales, l'étazolate administré en concentrations nano- et micromolaires, favorise la production de la sAPPα d'une manière dose-dépendante. La production maximale de sAPPα est atteinte avec 2 μM d'étazolate, avant d'atteindre une phase de plateau. Par contre, il a été montré que l'étazolate n'agit pas sur l'activité des β-sécrétases (voie amyloïdogénique) ni sur la production du peptide Aβ. Dans la même étude, l'ajout d'étazolate (2 μM) dans le milieu de culture de cellules corticales a permis de réduire très significativement la mort neuronale provoquée par le peptide Aβ ainsi que la production du cytochrome *c* par les mitochondries, un signe d'activation des caspases. *In vivo*, l'administration *per os* de 10 mg/kg d'étazolate pendant 15 jours entraîne une augmentation maximale de la production de sAPPα (Marcade et al., 2008).

Les effets neuroprotecteurs d'étazolate ont été annulés par l'ajout des antagonistes des $RcGABA_A$ (bicuculline et picrotoxine) démontrant l'implication des $RcGABA_A$ dans la neuroprotection induite par l'étazolate (Marcade et al., 2008). Etant donnée que la neurotoxicité du peptide Aβ est induite, entre autres, par l'augmentation de l'excitabilité neuronale (Lee et al., 2005), l'effet neuroprotecteur de l'étazolate pourrait alors être associé à une normalisation du flux de Cl^- *via* la stimulation des $RcGABA_A$.

De façon intéressante, la neutralisation de la sAPPα (par l'Ac 22C11) a également inversé l'effet neuroprotecteur de l'étazolate, impliquant un rôle essentiel de la sAPPα dans la neuroprotection induite par l'étazolate (Marcade et al., 2008). Des études supplémentaires sont donc nécessaires afin de déterminer le mécanisme associant la stimulation des $RcGABA_A$ et la production de la sAPPα.

L'INTERET THERAPEUTIQUE DE L'ACTIVATION DES α-SECRETASES DANS LE SNC

A ce jour, la stimulation des α-sécrétases, et surtout de l'ADAM10, n'a été étudiée que comme une approche pharmacologique pour le traitement symptomatologique de la maladie d'Alzheimer (MA) (Bandyopadhyay et al., 2007). Les stimulateurs des α-sécrétases ont pour objectif d'orienter la protéolyse du βAPP vers la voie physiologique non-amyloïdogénique et ainsi de diminuer la production du peptide neurotoxique Aβ qui est à l'origine des plaques amyloïdes.

Il n'existe pas à ce jour d'activateur spécifique pour les ADAMs, mais plusieurs composés ont été identifiés comme capables de stimuler l'activité des α-sécrétases, comme

les activateurs de PKC et de MAPK (revue de Postina et al., 2012). Certains d'entre eux ont été évalués dans des modèles expérimentaux de la MA, comme la bryostatine-1, un activateur de la PKC qui augmente significativement l'activité des α-sécrétases et réduit le taux d'Aβ42 dans le cerveau de souris transgéniques qui surproduisent l'Aβ (Etcheberrigaray et al., 2004). Dans la mesure où la bryostatine-1 est déjà largement testée dans le traitement du cancer, des essais pourraient être assez rapidement mis en place chez les patients de la MA (Etcheberrigaray et al., 2004).

En outre, l'epigallocatechin-3-gallate, une polyphénole que l'on retrouve dans le thé vert et qui possède des propriétés anti-oxydantes, stimule l'activité de l'ADAM10 et réduit la production d'Aβ (Oregon et al., 2006). C'est pour cela que ce composé a récemment entré en essai clinique pour la MA *(http://clinicaltrials.gov)*.

3. LES ESSAIS CLINIQUES AVEC L'ETAZOLATE (EHT0202)

Bien qu'il y ait peu de données expérimentales avec l'étazolate dans les modèles expérimentaux de maladies neurodégénératives et de lésions cérébrales aiguës, l'étazolate a fait son chemin en essai clinique de phase IIA pour le traitement de la maladie d'Alzheimer avec les premiers résultats encourageants (Vellas et al., 2011). Cette étude randomisée en double-aveugle, et contrôlée par un placebo, avait pour objectif principal l'évaluation de la sécurité d'emploi et de la tolérance d' l'étazolate, sous l'appellation « EHT0202 », mais également la détermination de l'efficacité du traitement chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Vellas et al., 2011).

Les premiers résultats présentent une bonne sécurité d'emploi aux deux doses testées (40 et 80 mg/kg durant 3 mois), associées à un traitement par un inhibiteur des cholinestérases (galantamine) pendant les 3 mois d'étude (Vellas et al., 2011). Des effets indésirables les plus fréquents étaient d'ordres psychiatriques et neurologiques, suggérant un tropisme du composé pour le SNC. L'occurrence d'effets secondaires était plus importante chez les patients ayant reçu la dose la plus forte, montrant un effet dose-dépendant. En outre, aucun effet indésirable spécifique au niveau gastro-intestinal, cardiovasculaire ou biologique n'a été démontré, suggérant l'absence d'interaction médicamenteuse entre l'EHT0202 et les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. De manière intéressante, le groupe placebo avait significativement plus d'infections telles que la bronchite et la gastroentérite comparé au groupe traitement, ce qui pourrait être associé à l'activité « inhibiteur des PDE4 » de l'EHT0202.

Des signes encourageants concernant l'amélioration des fonctions cognitives ont été observés chez les patients traités par EHT0202. Une tendance à une meilleure réponse au

traitement a été observée dans une population des patients ApoE4 positifs, avec un risque accru de développer la maladie d'Alzheimer, par rapport aux patients non-porteurs de l'allèle ApoE4 (Vellas et al., 2011). Ces résultats cliniques permettront le passage d'EHT0202 en phase IIB pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, afin de déterminer ses bénéfices au niveau de la cognition, ainsi que le dosage thérapeutique optimal sur une plus grande échelle de patients.

BUT DU TRAVAIL

Le TC induit une réponse neuro-inflammatoire intense qui est associée à la chute du neuroprotecteur endogène sAPPα, issu de l'action des enzymes α-sécrétases, et qui semble participer vivement à l'aggravation des lésions secondaires et à la survenue des dysfonctionnements moteurs, sensoriels, cognitifs, et voire psychologiques post-TC.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier l'intérêt thérapeutique des composés pharmacologiques qui restaurent le niveau post-TC de la sAPPα, sur les conséquences biochimiques, histologiques et fonctionnelles à long terme post-TC. Parmi les différents composés susceptibles d'atténuer la chute de la sAPPα, nous avons choisi la minocycline, un antibiotique aux propriétés anti-inflammatoires, et l'étazolate, un activateur des α–sécrétases. Au moment où ce travail de thèse a été initié, une seule publication avait mis en évidence l'effet neuroprotecteur de l'administration i.c.v. de la sAPPα sur les conséquences post-TBI (Thornton et al., 2007).

Au laboratoire nous avons montré qu'une stratégie pharmacologique, par la minocycline, qui inhibe l'activation microgliale dans la phase précoce de TC, est associée aux effets anti-inflammatoire, anti-œdémateux et neuroprotecteur dans un modèle de TC chez la souris (Homsi et al., 2009, 2010). Ainsi, dans un premier temps, nous avons étudié l'effet d'un traitement par la minocycline sur le niveau de la sAPPα, les conséquences histologiques des lésions tardives, la gliose réactive et les conséquences fonctionnelles olfactive et cognitive à long terme post-TC. Pour cela, il a fallu introduire et mettre au point de nouveaux tests fonctionnels permettant de déceler des déficits à long terme post-TC. Il s'agit d'un test d'aversion olfactive réalisé pour la première fois dans un modèle de TC et d'un test de reconnaissance de nouvel objet (NORT) pour étudier la fonction cognitive post-TC.

Dans un second temps, nous avons évalué les effets d'un traitement par l'étazolate sur les conséquences biochimiques, histologiques et fonctionnelles à court et à long terme post-TC. Tout d'abord, nous avons établi un protocole d'administration qui a permis la restauration du taux de la sAPPα. Par la suite, nous avons examiné l'effet de l'étazolate sur l'activation microgliale, le niveau d'IL-1β, l'œdème cérébral, ainsi que sur les lésions précoces et tardives. En ce qui concerne

les études fonctionnelles, nous avons évalué l'effet d'étazolate sur le score neurologique à court terme ainsi que sur l'hyperactivité locomotrice et le déficit cognitif à long terme. Ce travail a permis d'étudier pour la première fois l'intérêt thérapeutique d'un activateur des α–sécrétases, l'étazolate, dans le contexte d'une lésion cérébrale aiguë telle que le TC.

MATÉRIELS ET METHODES

1. ANIMAUX

Toutes les expériences ont été réalisées sur des souris mâles Swiss (Élevage Janvier, Le Genest Saint-Isle, France) âgées de 7 à 8 semaines, dont le poids était compris entre 28 et 30 grammes. Les animaux étaient mis dans des cages avec de l'eau et de la nourriture *ad libitum* dans un environnement à température contrôlée (22 ± 2°C) en alternance jour/nuit par cycle de 12 heures. Les expériences sur les animaux ont été approuvées par le comité d'éthique de l'Université Paris Descartes (P2.MJT.049.08), les réglementations françaises et la directive du Conseil de la Communauté Européenne du 24 novembre, 1986 (86/609/EEC) sur la protection des animaux utilisés en expérimentation.

2. MODÈLE DE TRAUMATISME CRÂNIEN PAR PERCUSSION MÉCANIQUE

Nous avons utilisé le modèle de TC par percussion mécanique à crâne fermé décrit initialement par Hall et collaborateurs (1985) puis modifié par notre laboratoire (Hellal et al., 2003, 2004). Selon le protocole, la souris est maintenue fermement en contention par le dos. Elle est brièvement anesthésiée en présence d'halothane à 2%. La tête est introduite sous un dispositif de percussion sur un moulage en résine. La tige de percussion est placée en position médiane vers le côté droit de la boîte crânienne de la souris entre les oreilles et les yeux. Un poids de 50 grammes est lâché le long de cette tige d'une hauteur de 36 cm. Une mortalité de 5-15% est observée dans les 5 premières minutes qui suivent l'impact, et il n'y a pas de mortalité tardive. Les animaux sont ensuite remis dans leurs cages et maintenus en normothermie avec un libre accès à l'eau et à la nourriture.

3. PROTOCOLES DE TRAITEMENT

Le protocole d'administration de la minocycline est celui qui a été déjà démontré anti-inflammatoire et anti-œdémateux dans notre modèle (Homsi et al., 2009; 2010). Les souris ont été réparties en trois groupes, un groupe des souris naïves (N) et deux groupes des souris traumatisées qui ont reçu soit la minocycline soit son solvant (PBS 0,01 M, i.p.). La minocycline (Sigma) a été dissoute extemporanément dans un tampon phosphate (PBS 0,01 M ; pH 7,4) et administrée 5 min après le TC à la dose de 90 mg/kg par voie intra-péritonéale (i.p.). Deux administrations supplémentaires (45 mg/kg, i.p.) ont été réalisées à 3 h et 9 h après le TC. Le groupe solvant (S) a reçu le tampon phosphate (PBS 0,01 M, i.p.) 5 min, 3h et 9h après le TC.

L'étazolate (TOCRIS Bioscience, Bristol, UK) a été dissous extemporanément dans un tampon phosphate (PBS 0,01 M ; pH 7,4) le jour de la manipulation. Pour nos études d'effet-dose, l'étazolate ou son solvant (PBS 0,01 M ; pH 7,4) ont été administrés 2 h après le TC à la dose de 1, 3 ou de 10 mg/kg par voie intra-péritonéale (i.p.). Pour l'étude de la fenêtre d'opportunité, l'étazolate ou son solvant ont été administrés à la dose de 10 mg/kg à 5 min ou 2 h post-TC.

4. ÉVALUATION DE L'ŒDÈME CÉRÉBRAL

L'œdème cérébral est évalué par la mesure de la teneur en eau obtenue par la différence entre le poids humide et le poids sec selon la technique précédemment décrite (Hellal et al., 2004).

Les animaux ont été décapités et leurs cerveaux ont été disséqués. Une carotte de tissu de 4 mm de diamètre a été prélevée au niveau de la zone de lésion à l'aide d'un emporte-pièce. La carotte de tissue a été immédiatement pesée dans une coupelle en aluminium. Afin d'obtenir le poids humide, l'échantillon de tissu a été mis à sécher dans une étuve maintenue à 100°C pendant 24 heures. À l'issue des 24 h, les échantillons ont été à nouveau pesés pour obtenir le poids sec.

Le pourcentage en eau contenue dans l'échantillon de cerveau a été calculé selon la formule ci-dessous:

$$\% \text{ en eau} = (\text{poids humide} - \text{poids sec}) \times 100 / \text{poids humide}$$

5. ÉVALUATIONS BIOCHIMIQUES

5.1. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales a été réalisé par la méthode de Bradford à l'aide du kit « Bio-Rad Protein assay » (Bio-Rad 500-0006, Marnes la Coquette, France). Cette méthode est appuyée sur le changement de l'absorbance maximale de 465 à 595 nm d'une solution acide de bleu brillant de Coomassie G250 lorsque celui-ci est fixé à une protéine. Une gamme d'étalonnage de 100 à 1200 µg/ml a été réalisée à partir d'albumine plasmatique bovine à 20% (Sigma A9085). Un millilitre de réactif Bio-Rad® dilué au 1/5ème a été ajouté à 20 µl de chaque point de gamme d'étalon et 2,5 ml de réactif Bio-Rad® dilué au 1/5ème a été ajouté à 5 µl de chaque échantillon. Après 5 minutes de réaction, l'intensité de la coloration produite a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 595 nm (Dynex technologies, MRX microplaques reader®). Les mesures ont été effectuées en duplicata et la concentration en protéines est exprimée en milligrammes par millilitre (mg/ml).

5.2. Dosage de la sAPPα par ELISA

Le dosage de la sAPPα a été effectué grâce à la méthode *ELISA,* en utilisant un kit commercialisé selon les instructions du fournisseur (94-0015, AbCys). Le kit comprend deux types d'anticorps : l'anticorps de capture reconnaissant le domaine N-terminal du βAPP, et l'anticorps de détection reconnaissant le domaine N-terminal du peptide Aβ présent uniquement dans la forme soluble sAPPα. Ainsi, le kit peut détecter les différentes isoformes du βAPP et la forme soluble sAPPα, mais il ne peut pas détecter la forme soluble sAPPß produite par ß-sécrétase **(Fig. 19)**.

Préparation des échantillons

Les échantillons ont été homogénéisés à 4°C dans un tampon approprié (w/v : 1 /6) en absence de détergent (50 mM Tris-HCl pH 7,6 ; 150 mM NaCl ; 2 mM EDTA ; 1 comprimé d'inhibiteurs de protéases *Complete mini EDTA-free* -Roche- pour 7 mL de tampon) afin de n'extraire que la forme soluble des protéines. L'homogénéisation a été faite à l'aide d'un *potter*. Les homogénats ont été ensuite centrifugés à 10000 g pendant 15 minutes (4°C) et les surnageants ont été récupérés, aliquotés et conservés à -40°C.

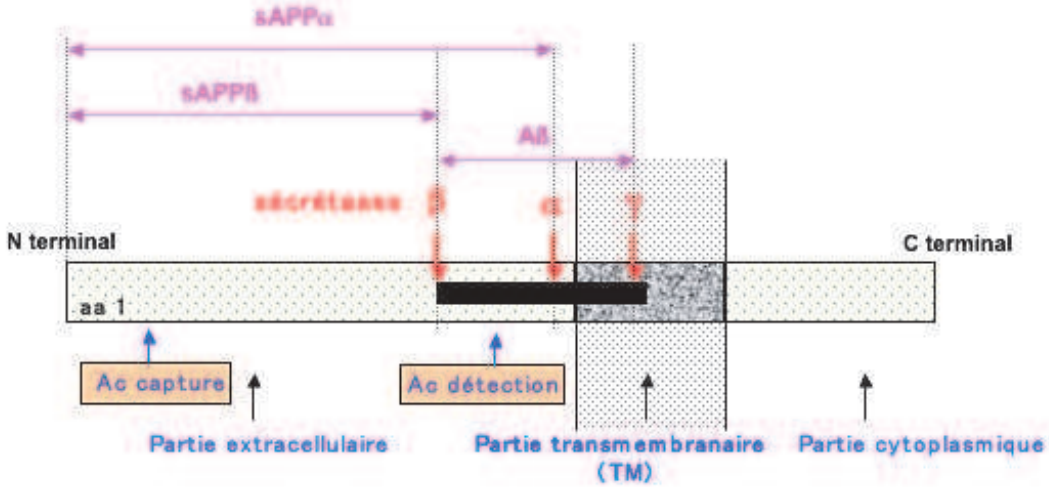


Figure 19 : Les sites de liaison des anticorps de capture et de détection dans le kit ELISA pour la détection de la sAPPα.

Mesure de la sAPPα

Le jour du dosage, tous les réactifs et les échantillons ont été ramenés à température ambiante. La gamme de sAPPα (entre 0,78 et 50 ng/mL) a été préparée par des dilutions successives à partir du standard du kit. Les surnageants (35 µL/puit) et la gamme d'étalon (100 µL) ont été déposés en duplicate dans les puits de la microplaque contenant l'anticorps de capture, et ont été laissés incuber à température ambiante pendant 2 heures.

Après lavage de la microplaque, l'anticorps de détection biotinylé a été ajouté et l'incubation a duré 1 h. Ensuite, l'enzyme Streptavidine-Peroxydase, qui se lie à l'anticorps de détection formant un « *sandwich* », a été ajoutée. La présence de la sAPPα a été détectée par l'ajout du chromogène, la tétraméthylbenzidine (TMB), qui donne une coloration bleue dont l'intensité est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm. Les concentrations ont ensuite été calculées à partir de la gamme d'étalonnage, rapportées à la concentration des protéines totales, et exprimées en ng de sAPPα par mg de protéine.

5.3. Dosage de l'IL-1ß par ELISA

Le dosage de l'IL-1ß a été réalisé à l'aide d'un kit de dosage ELISA Douset (DY 401, R&D systems). Cette méthode de dosage permet de mesurer l'IL-1ß par la formation des sandwichs contenant l'IL-1ß et deux anticorps spécifiques : anticorps de capture (anti-IL-1ß) et anticorps de détection (anti- IL-1ß) biotinylé. L'amplification se fait grâce au complexe streptavidin-HRP (peroxydase de Raifort). La révélation se fait par une réaction colorimétrique en présence d'un substrat (H_2O_2) et d'un chromogène (Tétraméthylbenzidine).

Préparation des échantillons

Les animaux ont été décapités et leurs cerveaux ont été rapidement prélevés sur la glace. L'échantillon du côté ipsilatéral de cerveau a été prélevé à l'aide d'un emporte-pièce. Les échantillons ont été homogénéisés à l'aide d'un Ultraturrax (Ultraturrax T8, IKA, Labortechnik) pendant 1 minute à 4°C dans un tampon d'homogénéisation 1:6 w/v ; Tris-HCl 50 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, Triton® X-100 1%, protease inhibitor cocktail (Complete mini, Roche) comme précédemment décrit (Bye et al., 2007). Les homogénats ont ensuite été centrifugés pendant 15 minutes à 12000 g à 4°C. Les surnageants ont été récupérés et congelés à -40°C jusqu'au jour du dosage.

Mesure de l'IL-1ß

Le jour du dosage, tous les réactifs et les échantillons ont été ramenés à température ambiante. Les puits de la microplaque (Nunc-immuno plate MaxiSorp, InterMed) ont été recouverts avec l'anticorps de capture (rat anti-IL-1ß de souris) et laissés incuber toute la nuit à température ambiante. La microplaque a été ensuite lavée (PBS, Tween à 0,05%, pH 7,2-7,4) et les sites non spécifiques ont été bloqués avec du tampon de blocage (PBS, BSA à 1%) à température ambiante. Une gamme d'étalonnage de 7,8 pg /ml à 1000 pg /ml a été préparée à partir d'un standard contenant de l'IL-1ß recombinante de souris. Après une autre étape de lavage de la microplaque, la gamme d'étalonnage (50 µl) ainsi que les échantillons (50 µl) ont été déposés en duplicata et incubés à température ambiante.

Ensuite, les puits ont été lavés et incubés avec l'anticorps de détection (chèvre anti-IL-1ß de souris) à température ambiante. L'amplification du signal a été effectuée grâce au complexe stréptavidin-HRP (peroxydase de Raifort) à l'abri de la lumière directe. La révélation a été faite par une réaction colorimétrique en présence d'un substrat (H_2O_2) et d'un chromogène (Tétraméthylbenzidine). Après l'arrêt de la réaction par une solution H_2SO_4 (2N), la densité optique a été immédiatement déterminée par la spectrophotométrie (Dynex technologies, MRX microplaques reader®) à une longueur d'onde de 450 nm. Les résultats sont exprimés en pg/mg de protéine totale.

6. ÉVALUATIONS HISTOLOGIQUES

6.1. Prélèvement et coupe des cerveaux

Pour les études à court terme (24h post-TC), les animaux ont été euthanasiés puis décapités, et leurs cerveaux ont été rapidement prélevés sur une plaque de verre réfrigéré et congelés dans l'isopentane à -40 °C. Par la suite, ils ont été conservés au congélateur à -40 °C.

Pour les études à long terme, les animaux ont été anesthésiés par le pentobarbital de sodium (60 mg/kg, i.p.). Une perfusion transcardiaque de solution de saline héparinée (30 ml/ souris) a été réalisée, suivie d'une solution de paraformaldehyde (PFA) à 4% (50 ml/ souris). Les animaux ont été ensuite décapités et leurs cerveaux ont été rapidement prélevés et laissés incuber dans la solution de PFA à 4 % pendant la nuit. Après incubation pendant deux jours de suite dans une solution de sucrose (10%), renouvelée chaque jour, leurs cerveaux ont été congelés dans l'isopentane à -40 °C et puis conservés au congélateur à -40 °C.

Des coupes de 20 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (Jung CM 3000, Lecia, Germany) à -20 °C. Les coupes ont été déposées de manière sériée sur des lames gélatinées et conservées à -20 °C jusqu'au jour de la manipulation, afin de réaliser la coloration au violet de crésyl et l'immunohistochimie (IHC).

6.2. Évaluation du volume de lésion focale et de l'expansion du ventricule ipsilatéral par la coloration au violet de Crésyl

Le violet de Crésyl est un colorant de nature basique qui présente une forte affinité pour les acides ribonucléiques et les corps de Nissl. La coloration au violet de Crésyl permet de distinguer les zones de nécrose (qui apparaissent blanches) des zones de tissu sain (colorées en violet). Dans un premier temps, les coupes ont été fixées à l'aide du liquide de Carmoy (chloroforme 30%, acide acétique 10%, éthanol absolu 60%) pendant 5 minutes,

puis colorées avec une solution de violet de Crésyl (violet de Crésyl 0,4%, acétate de sodium 0,2 M à 45%, acide acétique 0,2 M à 55%, pH 3,5) pendant 3 minutes, suivi d'un passage à l'eau distillé. Les coupes ont été ensuite déshydratées dans des bains d'alcool croissants (70°, 95° et 100°) puis de toluène, et elles sont montées entre lames et lamelles à l'aide de baume synthétique Eukitt® (Lecia).

La surface de la lésion de chaque niveau de coupe a été mesurée à l'aide d'un microscope (Axioskop, Zeiss; Allemagne) et du logiciel Image J (NIH, Bethesda, USA). Les surfaces des hémisphères droit et gauche ont été mesurées afin de corriger l'œdème cérébral pour chacune de ces coupes.

Pour l'évaluation de la lésion focale à 24h nous avons utilisé 12 coupes (ligne interaurale A6,26 à A2,96 mm) et pour la mesure de l'expansion ventriculaire nous avons utilisé quatre coupes antérieures à la ligne interaurale de A4,39 à A3,80 mm. Chaque surface de lésion mesurée a été ensuite corrigée pour tenir compte de l'œdème, en la multipliant par le rapport de la surface de l'hémisphère controlatéral et celle de l'hémisphère ipsilatéral. Le volume de la lésion, exprimé en mm^3, a été calculé en multipliant ces surfaces corrigées par la distance séparant chacun des niveaux de coupes (0,3 mm).

Pour nos études histologiques à long terme (12 semaines post-TC), quatre coupes ont été utilisés pour chaque cerveau, situées entre A4,78 mm et A3,88 mm antérieur à la ligne interaurale, et le ratio des volumes de chaque structure (ipsilatéral/controlatéral) a été calculé.

6.3. Évaluation de la surface des bulbes olfactifs

Afin de mesurer la perte tissulaire au niveau des bulbes olfactifs, les animaux sont perfusés au PFA 4% (cf Matériels et Méthodes, § 6.1), les cerveaux sont ensuite incubés dans du PFA 4% pendant une nuit entière. Le lendemain, à l'aide d'un système d'analyseur d'images (Motic Imageo Plus 2.0.10, Motic China Group Co, Ltd), la vue supérieure de chaque cerveau a été photographiée sur un papier millimétré. La surface des bulbes olfactifs, côté ipsilatéral et controlatéral, a été mesuré à l'aide du logiciel *ImageJ software* (NIH, Bethesda, USA).

6.4. Évaluation de l'activation microgliale et astrocytaire par la technique de l'immunohistochimie (IHC)

Principe

L'immunomarquage, réalisé sur des coupes histologiques, utilise la fixation d'un premier anticorps dirigé contre l'antigène que l'on cherche à mettre en évidence. Cette étape est suivie par la fixation d'un deuxième anticorps couplé à la biotine et dirigé contre le

premier anticorps. La troisième étape consiste à amplifier la réaction en fixant plusieurs complexes streptavidine-peroxydase sur la biotine du second anticorps. La révélation se fait grâce à l'oxydation du tétrachlorhydrate de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) par l'oxygène issu de la dégradation par la peroxydase de son substrat, le peroxyde d'hydrogène, entraînant l'apparition d'une coloration brune.

6.4.1. Immunomarquage de CD11b (activation microgliale)

Cette technique permet l'évaluation de l'expression du CD11b (un récepteur de surface des cellules microgliales et des macrophages; une intégrine-α M qui fait partie des récepteurs de complément 3, ou CR3).

Le jour de l'immunomarquage, les lames ont été sorties du congélateur et ont été séchées à l'air libre pendant 15 minutes. Pour réhydrater les tissus, quelques gouttes de PBS 0,01M (pH 7,4) ont été déposées sur les coupes. Puis, celles-ci ont été incubées dans une solution de PBS contenant 0,3% de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (H-6520, Sigma) et 10% d'éthanol, à température ambiante pendant 10 minutes, pour éliminer les réactions non spécifiques dues aux peroxydases endogènes. Cette étape a été suivie de 3 lavages avec du PBS, de 10 minutes chacun sous agitation. Ensuite, afin de bloquer les sites antigéniques non spécifiques, les coupes ont été incubées avec une solution de blocage (PBS; sérum de chèvre 1%, G9023, Sigma) pendant 30 minutes dans des chambres humides. Les coupes ont été mises en présence de la solution de blocage contenant l'anticorps primaire (anticorps monoclonal de rat anti-CD11b de souris; MCA711; Serotec, Royaume-Uni; dilution 1/800ème) pendant 2 heures à température ambiante dans des chambres humides. Pour vérifier la spécificité de l'immunomarquage, quelques lames ont été incubées en l'absence d'anticorps primaire. Les lames ont été ensuite lavées 3 fois dans du PBS-Tween 0,1% (PBS-T) sous agitation, à température ambiante. Elles ont été ensuite incubées dans la solution de blocage contenant l'anticorps secondaire (anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de rat; STAR80B; Serotec, Royaume-Uni; dilution 1/400ème) pour 1 heure dans des chambres humides. Les lames ont été ensuite lavées 3 fois dans du PBS-T, avant d'être incubées en présence du complexe streptavidine-peroxydase (Vectastain ABC kit, Elite PK6100 standard, Abcys, France) pendant 30 minutes en chambre humide, puis à nouveau lavées par immersion dans du PBS-T.

Afin de procéder à la révélation du marquage par la diaminobenzidine (DAB) une pastille de DAB (DAB Tablet set, D5905 ; Sigma-Aldrich) a été dissoute extemporanément dans 15 ml de TBS avec de peroxyde d'hydrogène à 0,3%. Les coupes ont été ensuite mises en incubation avec cette solution pendant environ 2-3 minutes à l'abri de la lumière. Par la suite, les lames ont été lavées par immersion dans l'eau distillée (2 fois pour

5 minutes), déshydratées par des passages successifs dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (70°-95°-100°), puis plongées dans un bain de toluène. Enfin, les coupes ont été montées entre lames et lamelles à l'aide de la baume synthétique Eukitt® (Leica).

6.4.2. Immunomarquage de GFAP (astrogliose)

Cette technique permet d'évaluer l'expression de la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), qui est un filament intermédiaire présent dans certaines cellules gliales du système nerveux central, les astrocytes.

Les mêmes étapes utilisées pour l'immunomarquage du CD11b (cf. Matériels et Méthodes, § 6.4.1) ont été appliquées pour la GFAP, mais en utilisant une solution de blocage différente (PBS pH 7,4 ; sérum d'âne 1%, D9663 ; Sigma), un anticorps primaire polyclonal de lapin anti-GFAP bovine (AB5804; Chemicon; dilution 1/1000ème) et un anticorps secondaire de l'âne anti-immunoglobuline de lapin (RNP1004; Amersham biosciences; dilution 1/400ème).

6.4.3. La méthode de quantification

La quantification de l'immunomarquage a été effectuée à l'aide d'un microscope optique (Axioskop, Zeiss, Germany).

Pour l'étude histologique de lésions précoces, à 24h, les cellules immunomarquées pour le CD11b ont été quantifiées en utilisant trois niveaux de coupes, de A5,78 à A5,12 mm antérieur à la ligne interaurale. Une surface de 1,2 mm^2 dans le striatum a été utilisée pour le comptage de cellules et les résultats ont été exprimés en nombre total des cellules immunomarquées par cerveau sur trois niveaux, obtenus en additionnant le nombre de cellules présentes dans cette surface de chaque coupe.

Pour l'étude histologique à long terme, les cellules immunomarquées ont été quantifiées dans le corps calleux ipsilatéral pour le CD11b, et dans le striatum ipsilatéral pour le GFAP. La quantification a été réalisée sur 4 coupes de cerveau pour chaque animal (de A4,78 à A3,88 mm antérieur à la ligne interaurale) et les résultats ont été exprimés en nombre total de cellules immunomarquées.

7. ÉVALUATION DU SCORE NEUROLOGIQUE PAR LE SCORE IRWIN-SORTIE DU CERCLE

Ce test qui a été adapté du protocole de Flierl et al. (2009) et a été introduit au laboratoire par le doctorant Haymen Girgis et Mathieu Soustrat. C'est un score sur 8 points qui reflète l'état général de la souris post-TC en évaluant sa capacité de sortir d'un cercle en

moins de 2 minutes, son état de désinhibition ainsi que quelques caractéristiques phénotypiques.

Pour le test de la Sortie du cercle, la souris est déposée au milieu d'un dispositif sous forme de platforme circulaire (30 cm de diamètre, 16 cm d'hauteur) contenant une petite sortie (2 x 2,5 cm). On note la façon ainsi que le temps pris par la souris pour sortir du cercle. Selon le comportement normal, la souris doit sortir du cercle dans une période maximale de 2 minutes, après quelques tentatives reflétant son état de méfiance et d'appréhension envers l'inconnu. Dans ce cas, elle aura une cotation de 3 points (**Tableau 13**).

Description	Jugement	Score / 3 points
Initiative et capacité de sortir d'un cercle de 30 cm de diamètre dans 2 minutes	succès précédé par plusieurs essais	3
	échec malgré plusieurs essais de sortie	2
	succès sans essai	1
	échec sans essai	0

Tableau 13: Cotation de la sortie du cercle sur 3 points.

Le score Irwin (sur 5 points) est une grille d'évaluation comprenant plusieurs paramètres indépendants y compris l'état de vigilance ou du comportement normal (**Tableau 14**). A l'issu de ces différentes cotations, la somme totale des points représente le score neurologique. Ce score doit donc être entre 0 et 8. Une souris naïve doit normalement avoir un score de 8 points, et plus le score est petit plus le déficit est important.

Paramètre testé	Description	Jugement	Score
État d'alerte et de vigilance	Tendance à fuir la main venant d'attraper la souris dans la cage	absent / présent	0/1
Posture dans la cage	Aspect général de l'animal au repos (dos cassé, prostration,…)	anormal / normal	0/1
Curiosité intrinsèque et exploration spontanée	Initiative et capacité motrice d'exploration (renifler, flairer, se redresser,… etc.), reflétant la curiosité ainsi que l'intérêt de l'animal pour son entourage tout en montrant une démarche normale et droite	absent / présent	0/1
Stéréotypie	Signe d'un mouvement anormalement répétitif	présent / absent	0/1
Ptôsis palpébral	Chute anormale de la paupière supérieure d'un ou des deux côtés	présent / absent	0/1

Tableau 14: cotation des critères choisis dans la grille d'évaluation d'Irwin sur 5 points.

8. ÉVALUATION DE LA FONCTION OLFACTIVE POST-TC

Les atteintes du système olfactif sont peu fréquentes dans les TC mineurs, mais leur fréquence augmente considérablement dans les TC sévères (Biacabe et al., 2000). Les mécanismes qui peuvent conduire à des lésions du système olfactif sont multiples : les lésions des filets nerveux olfactifs, les lésions naso-sinusiennes ou les lésions des centres cérébraux olfactifs (Fujii et al., 2002). Puisque notre modèle de TC entraîne une lésion frontale et une lésion de contre-coup qui pourraient être à l'origine d'une lésion éventuelle au niveau des bulbes olfactifs, nous avons décidé d'étudier le fonctionnement olfactif dans notre modèle de TC chez la souris. Pour cela, avec la participation de l'étudiante ERASMUS Silvia Calabria, nous avons introduit, pour la première fois, un test permettant l'évaluation de la fonction olfactive chez la souris traumatisée. Avant d'établir ce protocole, nous avons d'abord effectué un test de préférence olfactive.

8.1. Test de préférence olfactive

Selon ce protocole, adapté de Witt et collaborateurs (Witt et al., 2009), nous avons utilisé une cage propre comme arène du test (hauteur/largeur/longueur: 14 cm x 19 cm x 35 cm), dont le fond et le côté face à la caméra ont été couverts avec une planche noire afin d'améliorer la qualité des vidéos enregistrés. Le haut de la cage a été couvert par une surface filtrante permettant l'aération dans la cage. Une caméra a été située devant le côté transparent de la cage afin de permettre l'enregistrement du comportement des souris (**Fig. 20**). Tout le matériel a été préparé à l'avance:

- Une solution de vanille 10% (arôme naturel de vanille, Vahiné®)
- Une solution de beurre de cacahuètes 10% (beurre de cacahuètes cremeux, Skippy®)
- Une solution d'acide acétique 2,5% (acide acétique glacial, Rotipuran®, Roth)
- De l'eau bidistillée
- Des papiers-filtres d'une dimension 5 cm x 5 cm (3 papiers par souris)

Le beurre de cacahuètes a été dilué dans de l'huile de mais, alors que la vanille et l'acide acétique on été dilués dans de l'eau bidistillée.

Dans un premier temps, la souris a été introduite dans la cage-arène où elle a été laissée s'habituer pendant 10 minutes (**Fig. 20**). Trois minutes avant la fin de l'habituation, un papier-filtre sec a été déposé dans la cage pour 3 minutes. Ensuite, le papier sec a été retiré et, 1 minute plus tard, un papier-filtre imprégné de l'eau (600 µL) a été introduit dans la cage. Le comportement de la souris a été enregistré pendant 3 minutes. La même procédure a été ensuite appliquée pour la solution de vanille, de beurre de cacahuètes et de l'acide

acétique. Avant d'introduire une autre souris dans la cage-arène, celle-ci a été soigneusement nettoyée avec de l'eau.

À la fin du test, les enregistrements ont été analysés à l'aveugle afin de calculer deux paramètres pour chaque essai-odeur:

1) Le temps total que la souris passe en reniflant le papier-filtre. Nous n'avons pas pris en compte le temps pendant lequel l'animal reste sur le papier sans le renifler. L'investigation est évaluée lorsque la souris considère le papier en le reniflant à une distance < 1cm. Pour compter le temps de reniflement avec précision, nous avons utilisé un chronomètre professionnel (*Oregon scientific*).

2) Le nombre de reniflements sur le papier-filtre.

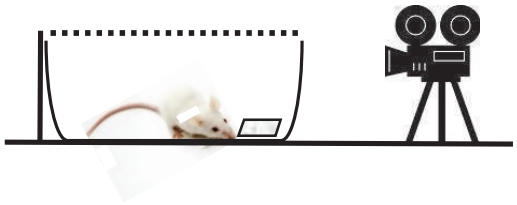


Figure 20 : Le dispositif du test olfactif.

8.2. Test d'aversion olfactive

Pour réaliser ce test, nous avons suivi exactement le même protocole utilisé pour le test de préférence olfactive, sauf que deux composés ont été utilisés : l'eau, qui a été utilisée comme contrôle et l'acide acétique, qui a été utilisé comme odeur désagréable. À la fin du test (3 min / papier), les enregistrements ont été analysés à l'aveugle et deux paramètres ont été calculés pour chaque essai-odeur:

1) Le temps total que la souris passe en reniflant le papier-filtre

2) Le nombre de reniflements sur le papier-filtre.

9. ÉVALUATION DE LA FONCTION LOCOMOTRICE PAR L'ACTIMETRIE

L'activité locomotrice spontanée horizontale (va et vient, avant et arrière) et verticale (redressements) de la souris ont été évaluées à l'aide d'un actimètre à l'abri du bruit, sous une intensité de lumière de 5 lux. L'actimètre utilisé est un rack (1 m 80 x 1 m x 0,6 m) relié à un ordinateur et composé de huit cellules transparentes (Imetronic, Bordeaux, France). Chaque cellule (H 16.5 x L 11 x L 20.5 cm) est équipée d'un plancher coulissant, d'une cage amovible et de capteurs infrarouges pour détecter les mouvements horizontaux et verticaux de l'animal pendant un temps précis. Dans nos expériences, ces activités ont été mesurées par le nombre de déplacements pendant 60 minutes et les mesures sont réalisées par tranche de 10 minutes.

10. ÉVALUATION DE LA MEMOIRE PAR LE TEST DE RECONNAISSANCE DE NOUVEL OBJET (NORT)

Avec l'étudiante ERASMUS Gemma Llufriu-Dabén, nous avons mis en place pour la première fois au sein du laboratoire, un protocole pertinent pour évaluer la mémoire de reconnaissance chez les souris traumatisées, adapté à partir du protocole décrit par Ennanceur et Delacour (1988) et Bevins et collaborateurs (2006). Ce test s'appuie sur le fait que la souris est attirée par la nouveauté, de sorte que face à deux objets, elle passera plus de temps à explorer un nouvel objet plutôt qu'un familier.

Ce protocole contient une longue phase d'habituation des animaux aux conditions du test (manipulateurs, transport, enceinte et pièce du comportement) afin de diminuer le stress **(Fig. 21)**. Dans un premier temps, les animaux ont été habitués aux manipulateurs (*handling*) et au transport pendant 5 jours consécutifs. Par la suite, les souris ont été habituées à l'enceinte, par lot de 6 puis individuellement, pendant 5 jours. Cette étape est indispensable pour la réduction du stress et le bon déroulement de l'expérience NORT, puisqu'elle permet aux animaux d'imprégner l'enceinte de leur odeur avant le test.

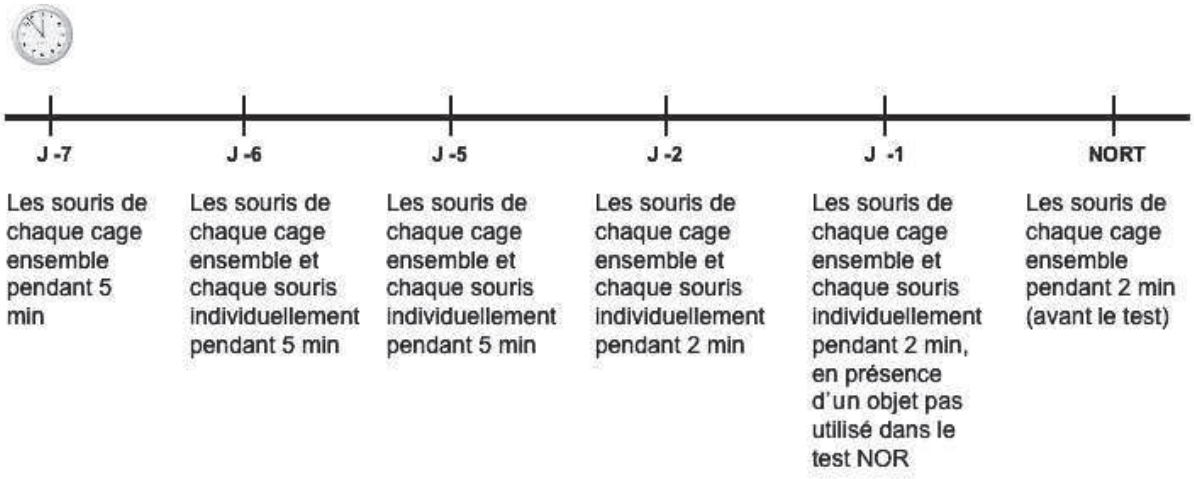


Figure 21 : Le protocole des habituations dans l'enceinte du NORT.

Le test a été réalisé dans une pièce isolée du bruit où se trouve l'enceinte en PVC noir (30 x 30 x 30 cm, 1668963 BHV®), avec un éclairage atténué à 36 lux (lampe halogène, avec variateur) pour favoriser l'exploration**.** Les objets plastiques utilisés pour le test (Lego DUPLO®) ont été mis à une distance de 5 cm de chaque paroi au coin gauche et droit de l'enceinte, et leur taille était assez importante pour attirer l'attention des animaux (hauteur de 8-9 cm et base cubique de 3 cm). Ils ont été fixés au fond de l'enceinte avec de la colle (Roll & Glue, ERELS®). Les objets choisis devaient remplir une attractivité équivalente (temps d'exploration de 30 à 60s minimum) sans produire une forte variabilité. C'est pour cela qu'avant le NORT, plusieurs tests de préférence ont été réalisés afin de choisir les couples d'objets les plus pertinents. Puisque l'acuité olfactive pourrait biaiser la performance

de la mémoire, on a utilisé plusieurs copies du même objet et, également, les objets ont été nettoyés avec une solution savonneuse (*Stradol* 0,5%) après chaque essai.

10.1. Tests de Préférence

Les animaux utilisés pour réaliser les tests de préférence ont été des souris naïves, habituées aux conditions de l'expérience selon notre protocole d'habituation, de manipulation et de transport déjà présentés ci-dessus. Avant de démarrer le test, tous les animaux ont été stabulés pendant 30 minutes, sans restriction de l'eau et de nourriture. Pendant le test, la souris était libre d'explorer deux objets différents pendant 5 minutes, l'un fixé au coin gauche et l'autre au coin droit de l'enceinte. Afin de conclure qu'il n'y avait pas de préférence pour l'un de deux objets, il faut que les temps d'investigation des ces objets ne soient pas statistiquement différents.

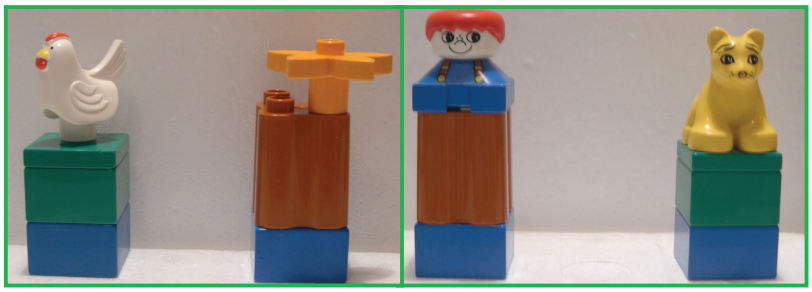


Figure 22 : Les deux couples d'objets utilisés pour le NORT.

10.2. Test NORT (*Novel Object Recognition Test*)

Chaque souris a été placée dans l'enceinte du côté opposé à l'objet et la tête vers la paroi **(Fig. 23)**. La phase d'acquisition de 5 min s'est réalisée en présence de deux objets identiques. Après une phase de rétention de 1h où la souris retourne dans sa cage, il y a une phase de rappel (5 min). La souris est remise dans la même enceinte où les objets ont été au préalable remplacés par un autre objet identique et un objet nouveau.

Les phases d'acquisition et de rappel ont été enregistrées à l'aide d'une caméra placée au-dessus de l'enceinte (Logitech Quickcam, Vision Pro for Mac). Les vidéos ont été ensuite analysées en aveugle, et le temps d'exploration a été mesuré pour chaque objet à l'aide du logiciel CHRONO. Nous avons considéré comme exploration le contact direct nez/bouche-objet à moins d'un cm de distance. À la fin, nous avons calculé l'index de reconnaissance en pourcentage (temps passé sur objet nouveau*100 / temps passé sur objet nouveau+familier).

On a également mesuré l'index de temps d'investigation (temps passé sur objet gauche*100 / temps passé sur objet gauche+droit) afin d'exclure une éventuelle préférence gauche-droite.

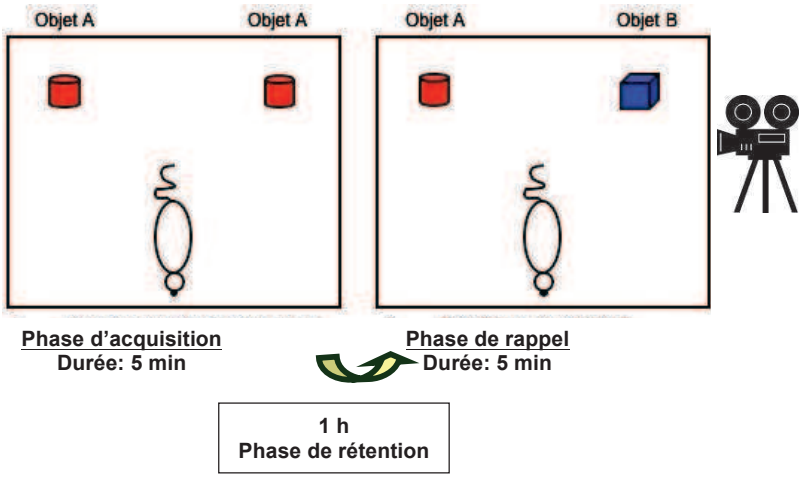


Figure 23 : Les différentes étapes du Test de NORT.

11. ÉVALUATION DE L'ANXIETÉ

11.1. Test de la «*Elevated Plus Maze* (EPM)»

À 3,5 semaines post-TC, avec la participation de l'étudiante *ERASMUS* Francesca Fanucchi, nous avons évalué le niveau d'anxiété des souris par le test de *Elevated Plus Maze* (EPM). Ce test est fréquemment utilisé pour l'évaluation du comportement de stress chez les rongeurs (Walf & Fryce, 2007). L'EPM est basé sur le principe de la préférence naturelle des rongeurs pour les espaces fermés. Moins l'animal passe du temps dans l'espace ouvert, plus son niveau de stress est élevé.

L'appareil a été composé de deux bras ouverts (14 x 6 cm), deux bras fermés (15 x 6 cm) et une plateforme centrale, et le tout situé sur une hauteur de 58 cm **(Fig. 24)**. Le test dure 5 min par souris, et au début du test, l'animal est placé dans la plateforme centrale face au mur du bras fermé. Tous les tests sont enregistrés par une caméra (la même décrite pour le test NORT) et ensuite les vidéos sont analysées à l'aveugle avec l'aide du logiciel Chrono.

Les paramètres mesurés ont été le nombre d'entrées dans les bras ouverts, ainsi que le temps d'investigation dans les bras ouverts et fermés. Un autre paramètre complémentaire mesuré est le nombre de *head-dippings* sur les bras ouverts. On estime que la souris réalise un *head-dipping* lorsqu'elle introduit ou penche sa tête sous le plan horizontal de l'appareil.

11.2. Test de la *«Elevated Zero Maze* (0-maze)»

À 7 semaines post-TC, le niveau de stress de nos souris a été évalué par le 0-maze. L'appareil est une variante de la EPM, où la plateforme centrale a été supprimée afin d'éliminer les ambiguïtés créées pendant l'analyse des résultats et pour permettre à l'animal d'explorer le dispositif de façon circulaire. C'est pour cela que l'0-maze est considéré comme un test moins anxiogène que la EPM (Shepherd et al., 1994).

L'appareil consiste en plateforme circulaire (8 cm en largeur x 46 cm en diamètre) qui est placée sur une hauteur de 58 cm et qui est divisée en quatre quadrants, deux fermés par des murs de 17 cm de hauteur et deux ouverts **(Fig. 24)**. Le principe du test est exactement le même que celui de la EPM. Après analyse des vidéos à l'aveugle, les paramètres mesurés ont été le nombre d'entrées dans les bras ouverts, le temps d'investigation dans les bras ouverts et fermés, le nombre de *head-dippings* ainsi que le nombre de *U-turns*. On estime que la souris réalise un *U-turn* quand elle change de direction sur les bras ouverts.

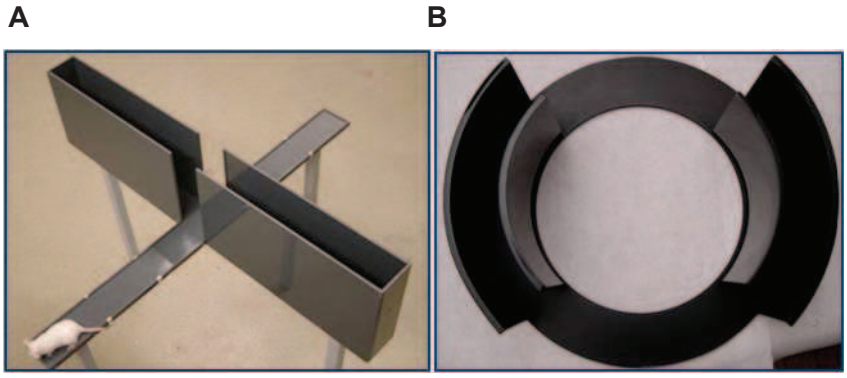


Figure 24 : les appareils d'*Elevated Plus Maze* (A) et d'*Elevated Zero Maze* (B).

12. ANALYSE STATISTIQUE DES RÉSULTATS

L'analyse statistique des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel de statistiques Statview 5.0 (Abacus Concept Inc., France). Les données sont exprimées en valeur moyenne ± écart standard à la moyenne (e.s.m.). Une différence a été considérée significative pour une valeur de $P < 0,05$.

Les tests statistiques utilisés sont les suivants:

Pour une variable continue

Comparaison de 2 groupes: test student (test t).

Comparaison de 3 groupes et plus: analyse de variance (ANOVA) à un facteur selon l'étude réalisée suivie d'un test Bonferroni.

Comparaison de mesures répétées: ANOVA pour mesure répétée suivie d'une ANOVA pour mesure simple. Les différences inter-groupes ont été analysées en utilisant un test ANOVA suivie d'un test Bonferroni à chaque temps.

Pour une variable discontinue

Comparaison de 2 groupes: test U de Mann-Whitney.

Comparaison de 3 groupes et plus: test de Kruskal-Wallis suivi d'un test U de Mann-Whitney.

Enfin, afin d'examiner s'il existe une corrélation entre les résultats d'analyse de la surface de BO et les résultats du test olfactive, nous avons réalisé le test de corrélation de Pearson.

RESULTATS

PREMIERE PARTIE

ETUDE DE L'EFFET DE LA MINOCYCLINE SUR LE NIVEAU POST-TC DE LA SAPPα ET SUR LES CONSEQUENCES HISTOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES TARDIVES DU TC

Dans cette première partie du travail, nous avons utilisé un protocole de traitement aigu par la minocycline, déjà décrit comme anti-inflammatoire et anti-œdémateux dans notre modèle de TC par percussion mécanique chez la souris (Homsi et al., 2009), afin d'évaluer son effet sur les conséquences histologiques et fonctionnelles à long terme post-TC.

Pour cela, nous avons tout d'abord évalué l'effet de la minocycline sur le taux de la sAPPα à court terme post-TC, ainsi que sur les lésions tardives et la gliose réactive à long terme post-TC (**Article 1**). Par la suite, il a été indispensable d'introduire au laboratoire des tests comportementaux pour mettre en évidence des déficits tardifs post-TC (**Articles 2 et 3**). Nous avons donc développé le test de préférence olfactive ainsi que le test d'aversion à l'acide acétique, mis au point pour la première fois dans un modèle expérimental de TC. Nous avons également mis en place le test de reconnaissance de nouvel objet (NORT), et différents tests d'anxiété, tels que le test *Elevated Zero-Maze* (0-Maze) et *Elevated Plus Maze* (EPM). Ainsi, nous avons pu examiner l'effet de la minocycline sur des déficits post-traumatiques persistants, en particulier les déficits olfactif et cognitif, ainsi que sur la lésion des bulbes olfactifs (**Articles 2 et 3**).

1. La minocycline en traitement aigu rétablit le niveau post-traumatique de la sAPPα et diminue les lésions cérébrales et la gliose réactive à long terme post-TC

Article 1 : **Siopi E**, Cho AH, Homsi S, Croci N, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M (2011). Minocycline restores sAPPα levels and reduces the late histopathological consequences of traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma,* 28: 2135-2143.

2. La minocycline en traitement aigu améliore la fonction olfactive et diminue la lésion des bulbes olfactifs post-TC

2.1. Test de préférence olfactive

A 10 jours post-TC nous avons réalisé le test de préférence olfactive en utilisant l'eau comme contrôle et trois odeurs différentes, le beurre de cacahuètes (10%), la vanille (10%) et l'acide acétique (2,5%) **(Fig. 25)**. Les résultats ont confirmé que les souris naïves et traumatisées ont un comportement similaire vis-à-vis de l'eau en terme de temps d'investigation (15,9 ± 4,7 *vs* 16,0 ± 4,4 s). Cependant, en présence d'acide acétique, les souris traumatisées présentent un temps d'investigation supérieur à celui des souris naïves (TC *vs* N : 15,6 ± 6 vs 3 ± 0,7 s ; P<0.05), démontrant ainsi une diminution de l'aversion à cette odeur désagréable. En ce qui concerne le beurre de cacahuètes et la vanille, on observe une variabilité et une différence non significative entre la réponse de souris naïves et traumatisées (TC *vs* N : 42,9 ± 18,5 *vs* 10,2 ± 1,9 s et 4,4 ± 1,2 *vs* 16,2 ± 9,3 s respectivement).

Les résultats de cette expérience ont servi à choisir l'acide acétique comme odeur désagréable pour notre test d'aversion olfactive (cf. résultats, première partie, 2.2).

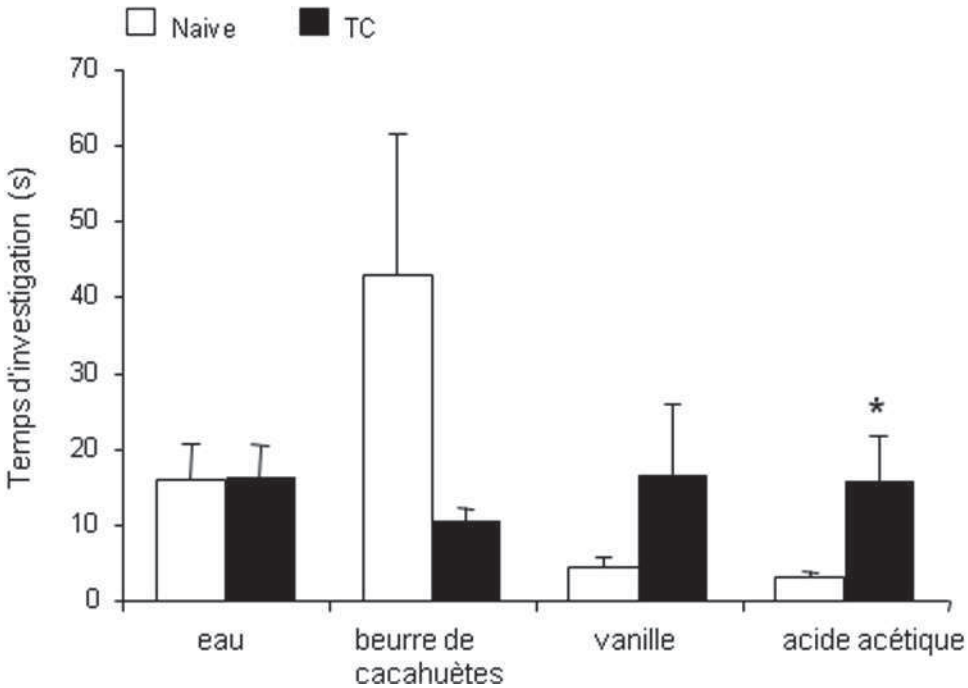


Figure 25 : Le test de préférence olfactive évalué chez des souris naïves (N) et traumatisées à 10 jours post-TC. Les résultats sont exprimés en moyenne ± e.s.m. (n=10 par groupe ; * P<0,05 *vs* N).

2.2. Article 2 :

Siopi E, Calabria S, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M (2012). Minocycline improves olfactory bulb volume and olfactory behavior after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma,* 29: 354-361.

3. La minocycline en traitement aigu améliore la fonction cognitive à long terme post-TC

3.1. Mise au point du test de reconnaissance de nouvel objet (NORT) chez la souris : tests de préférence pour le choix des objets

Plusieurs tests de préférence ont été réalisés afin d'identifier des couples d'objets à utiliser dans le test NORT. Parmi ceux-ci, deux couples d'objets ont été sélectionnés **(Fig. 26B, D).** Le temps d'investigation des objets de chaque couple ne doit pas être statistiquement différent. Ainsi, pour le couple « poule-fleur » les temps d'investigation sont 19,77 ± 2,34 *vs* 20,79 ± 1,84 s **(Fig. 26A)** et pour le couple « tigre-homme » les temps d'investigation sont 32,5 ± 3,04 *vs* 27,77 ± 2,06 s respectivement **(Fig. 26C).**

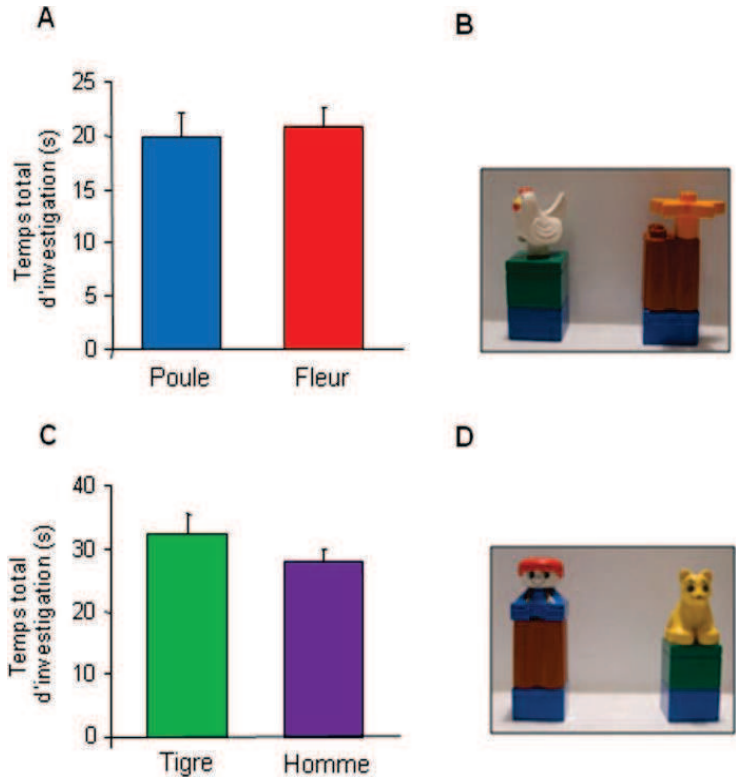


Figure 26 : Les tests de préférence pour le choix des objets NORT, évalué chez des souris naïves (durée du test : 5 min). Les résultats sont exprimés en moyenne ± e.s.m. (n=12 par groupe).

3.2. Article 3 :

Siopi E, Llufriu-Dabén G, Fanucci F, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M (2012). Evaluation of late cognitive impairment and anxiety states following traumatic brain injury in mice: The effect of minocycline. *Neurosci Lett,* 511: 110-115.

4. Discussion

Les résultats de cette première partie nous ont permis de mettre en évidence des conséquences histologiques et fonctionnelles tardives dans notre modèle de TC par percussion mécanique chez la souris. Nous avons également confirmé la chute de la protéine neuroprotectrice sAPPα pendant la phase précoce, à 24 h post-TC, en accord avec une étude précédente du laboratoire (Lesné et al., 2005). Ainsi, nous avons pu montrer l'intérêt thérapeutique à long terme d'un traitement aigu par la minocycline, ayant la capacité de rétablir le taux post-TC du neuroprotecteur endogène sAPPα.

Notre première étude nous a permis de mettre en évidence une atrophie du corps calleux et du striatum ainsi qu'une ventriculomégalie à 12 semaines post-TC. Il est important de souligner que ce sont les mêmes souris qui ont d'abord servi à une étude de l'activité locomotrice, de 48 h jusqu'à 12 semaines post-TC (Homsi et al., 2010), puis aux études histologiques. Les résultats de cette étude comportementale avaient montré que le TC induit une hyperactivité locomotrice persistante dans nos conditions (Homsi et al., 2010). En effet, l'augmentation de l'activité locomotrice a été déjà associée à la présence des lésions des différentes structures du cerveau, dont le striatum, le corps calleux et les bulbes olfactifs chez les rongeurs (Kostrzewa et al., 1994 ; Magara et al., 2000 ; Viggiano, 2008). L'atrophie de ces structures dans notre modèle pourrait donc être à l'origine de l'hyperactivité locomotrice observée (Homsi et al., 2010).

Des études précédentes, réalisées sur des modèles murins de TC, ont démontré la survenue des atrophies de la substance blanche bien après l'apparition des LADs (Smith et al., 1997 ; Bramlett et al., 2002). La formation des lésions focales et diffuses (LADs) dans notre modèle de TC (Homsi et al., 2010), accompagnées d'une neuro-inflammation intense (Homsi et al., 2009, 2010), pourrait être à l'origine de cette éventuelle atrophie cérébrale. En effet, l'aggravation des LADs dans les jours et les mois qui suivent le trauma, entraîne une dégénérescence secondaire des axones (dégénérescence Wallérienne) qui peut conduire, plus tardivement, à une atrophie de la substance blanche, avec notamment une atrophie du corps calleux et du striatum (Levin et al., 1990 ; Mamere et al., 2009). La neuro-inflammation, caractérisée par l'activation microgliale, est considérée comme un acteur principal dans l'aggravation des lésions cérébrales post-TC (Cullheim et al., 2007 ; Venkatesan et al., 2010) et constitue une cible pharmacologique ayant une bonne

fenêtre d'opportunité thérapeutique (Ziebell et Morganti-Kossmann, 2010 ; Hailer et al., 2008). Or, nos résultats montrent la présence d'une gliose réactive, reflétée par une forte activation des microglies/macrophages et des astrocytes dans la zone de lésion, à 12 semaines post-TC. La gliose réactive pourrait être un indicateur de l'intensité de la réponse neuro-inflammatoire pendant la phase précoce post-TC. Elle est typiquement suivie d'une cicatrice gliale, formée par les astrocytes, qui constitue une barrière physique empêchant la remyélinisation des axones (Carmen et al., 2007).

Nous avons également montré que le contrôle de la réponse neuro-inflammatoire grâce à un traitement aigu par la minocycline est associé à une augmentation du taux de la sAPPα à 24 h post-TC et à une réduction de l'atrophie du striatum et du corps calleux, de la ventriculomégalie et de la gliose réactive à 12 semaines post-TC. Cela suggère que l'inhibition précoce de la neuro-inflammation post-TC par la minocycline pourrait être en mesure d'atténuer la chute du neuroprotecteur sAPPα, de freiner des processus lésionnels déclenchés par le TC comme par exemple l'apoptose (Stirling et al., 2005) et d'éviter, dans la phase tardive, les conséquences histopathologiques. Des études précédentes, réalisées sur différents modèles des lésions cérébrales aiguës et des maladies neurodégénératives, ont démontré une association entre l'effet anti-inflammatoire de la minocycline et la protection du tissu cérébral (Sanchez-Mejia et al., 2001 ; Stirling et al., 2005 ; Bye et al., 2007 ; Choi et al., 2007 ; Carty et al., 2008 ; Lechpammer et al., 2008 ; Cai et al., 2010). Les travaux antérieurs réalisés au laboratoire par le doctorant Shadi Homsi ont permis de montrer que la minocycline en traitement aigu conduit à une neuroprotection associée à une inhibition de l'activation microgliale dans la phase précoce et une amélioration fonctionnelle à long terme, à savoir une diminution de l'hyperactivité locomotrice (Homsi et al., 2010).

C'est à la suite de ces analyses que nous avons montré, et c'est pour la première fois, que notre modèle de TC chez la souris induit également une lésion au niveau des bulbes olfactifs (BO) à 12 semaines post-TC, qui est fortement corrélée à un déficit olfactif persistant, à savoir une diminution de l'aversion à l'acide acétique. Cette étude nous a permis de proposer un nouveau test sensoriel, le test d'aversion à l'acide acétique, pour évaluer la fonction olfactive à court et à long terme après un TC. Il est important de souligner qu'à ce jour il n'existe aucun autre test qui permet l'étude de déficits olfactifs dans des modèles expérimentaux de TC.

Les conclusions principales de cette étude histologique sont cohérentes avec

de nombreuses données cliniques suggérant que les lésions des BO, et les dysfonctionnements olfactifs adjacents, sont fréquents à la suite de traumatismes crâniens frontaux et occipitaux de différents degrés de sévérité (Callahan et al., 2002; Fuji et al., 2002; Haxel et al., 2008; Wu et al., 2009a; Fortin et al., 2010). Cette prévalence élevée semble justifiée, puisque la localisation des BO et du cortex olfactif dans la partie rostrale du cerveau rend ces derniers particulièrement vulnérables en cas d'impacts frontaux (Doty et al., 2001). Il peut alors être suggéré que le site et la force de l'impact mécanique expliquent l'apparition des lésions au niveau des bulbes olfactifs dans nos conditions expérimentales. De nombreuses études expérimentales ont, de manière intéressante, démontré que les lésions des BO engendrent de l'hyperactivité chez la souris et le rat (Zueger et al., 2005; Mucignat-Caretta et al., 2006; Viggiano et al., 2008; Kang et al., 2010). En outre, l'intensité de la réponse neuro-inflammatoire post-TC semble jouer aussi un rôle important. En effet, il a été décrit que le traumatisme de nerfs olfactifs conduit à une réaction inflammatoire intense qui compromet la récupération olfactive (Kobayashi et al., 2009). Un grand nombre d'études a également montré que la neuro-inflammation est défavorable pour la neurogenèse et que les microglies entraînent la mort de nouveaux neurones (Ekdahl et al., 2003 ; 2009 ; Lazarini et al., 2012).

Nos résultats ont montré que la minocycline entraîne une neuroprotection durable, traduite par une diminution du déficit olfactif à court et à long terme, et par une réduction des lésions des BO à 13 semaines post-TC. Ces données suggèrent que l'inhibition de la neuro-inflammation pourrait être associée à la protection du tissu olfactif et de la fonction olfactive. Des études expérimentales ont montré les effets bénéfiques des stéroïdes suite au traumatisme des nerfs olfactifs et des BO (Kobayashi et al., 2009). En clinique, la prise des stéroïdes a été associée à une amélioration de la fonction olfactive chez les patients anosmiques (Fuji et al., 2002 ; Jiang et al., 2010). On peut donc suggérer que les propriétés anti-inflammatoires des traitements stéroïdiens pourraient avoir un rôle thérapeutique dans le traitement des troubles olfactifs post-TC. Néanmoins, leur efficacité partielle, ainsi que leurs effets indésirables non-négligeables compromettent leur utilisation et soulignent le besoin en thérapies alternatives (Holbrook et Leopold, 2006).

Enfin, la dernière étape de cette étude a consisté en l'examen de l'état cognitif de nos animaux et de leur niveau d'anxiété à long terme post-TC. Il est important de noter que c'est pour la première fois que de tels examens à long terme ont été réalisés dans un modèle de TC. Il ressort de nos résultats que le TC induit un déficit de la mémoire de reconnaissance qui est significatif jusqu'au moins

13 semaines post-TC. Un ensemble toujours croissant de constatations expérimentales montre la prévalence des déficits cognitifs, suite à un TC, modéré ou sévère, affectant les systèmes frontal et subcortical chez l'humain (Emilien et al., 1996; Stuss and Levine, 2002) et chez les rongeurs (Yaka et al., 2007; Fleminger et al., 2008 ; Baratz et al., 2011; Han et al., 2011). En outre, la dégénérescence des structures de la substance blanche, telles que le corps calleux, a été aussi associée à la survenue des déficits de mémoire (Kraus et al., 2007 ; Chauhan et al., 2010 ; Kondo et al., 2010 ; Kinnunen et al., 2011).

Nos résultats n'ont pas montré de changement au niveau de l'anxiété à 3,5 et 7 semaines post-TC. Cependant, nous avons observé que le TC induit une légère désinhibition, associée à une tendance de prise de risque dans un milieu anxiogène. Plus précisément, nous avons montré que, comparativement aux souris naïves, les souris traumatisées effectuent plus de *head-dippings* (le fait de pencher la tête vers le sol) dans les bras ouverts du dispositif EPM et plus de *U-turns* (changement de direction) sur les bras ouverts du dispositif 0-maze. En effet, il a été récemment décrit que le TC sévère conduit à une hyperactivité locomotrice et à un déficit cognitif sans aucune modification de l'état anxieux des souris (Schwarzbold et al., 2010). Il est intéressant de noter que l'état anxieux a été mis en évidence dans des modèles de TC léger où il n'y a pas de déficit cognitif. Ainsi, ces données suggèrent que le site ainsi que la sévérité du TC modifient différemment les comportements moteur, anxieux et cognitif.

De manière intéressante, nos données ont montré que le traitement par la minocycline entraîne une amélioration cognitive post-TC de manière significative et durable. En effet, la seule étude expérimentale qui a évalué l'effet de la minocycline sur la mémoire post-TC a été réalisée sur un model de TC par impact cortical contrôlé chez le rat, et elle n'a pas montré d'effet thérapeutique (Kelso et al., 2011). Ces divergences pourraient être expliquées par les différences de protocoles pharmacologiques utilisés. Plus précisément, cette équipe a utilisé une dose de minocycline moins forte, administrée plus tardivement post-TC. En outre, Abdel Baki et ses collaborateurs (2010) ont récemment montré que la co-administration de la minocycline, en dose moins forte que la notre, et de la N-acétylcystéine entraîne une amélioration cognitive chez le rat post-TC, sans que cet effet soit reproduit par la minocycline seule.

La multiplicité des propriétés attribuées à la minocycline (revue de Plane et al., 2010) laisse penser que plusieurs mécanismes, interdépendants ou non, seraient

à l'origine de ses effets neuroprotecteurs. Bien que ces mécanismes ne soient pas élucidés dans ce travail de thèse, certaines hypothèses pourraient être proposées.

Tout d'abord, l'inhibition de l'activation microgliale et de la suppression de la réponse immunitaire dans le TC et le traumatisme médullaire a été déjà proposée comme stratégie neuroprotectrice prometteuse (Carlson et al., 1998 ; Kamiska et al., 2004 ; Sosa et al., 2005 ; Ibarra et Diaz-Ruiz, 2006, Bye et al., 2007 ; Hailer et al., 2008 ; Lloyd et al., 2008 ; Homsi et al., 2010). Il est bien connu que la minocycline est un inhibiteur de l'activation microgliale qui diminue la libération excessive des médiateurs inflammatoires, tels que l'IL-1β et la MMP-9 (Sanchez et al., 2001 ; Bye et al., 2007 ; Homsi et al., 2009). Notre équipe a récemment montré que cet effet anti-inflammatoire est également associé à une diminution de l'œdème cérébral et du volume de lésion à 24 h post-TC (Homsi et al., 2009, 2010).

Nos résultats ont montré que les effets anti-inflammatoires de la minocycline sont accompagnés par l'augmentation du taux du neuroprotecteur endogène sAPPα, dont le niveau chute après le TC. Effectivement, une étude précédente, réalisée par Lesné et collaborateurs (2005), a montré que pendant la phase neuro-inflammatoire post-TC, la perturbation de la protéolyse du βAPP est en défaveur de la production de la sAPPα et en faveur de la production du peptide neurotoxique Aβ. La restauration du taux de la sAPPα pourrait être un effet direct de la minocycline, *via* l'activation des α-sécrétases, ou indirect, *via* l'inhibition de la neuro-inflammation. De nombreuses études ont montré que la sAPPα exerce des effets bénéfiques par son effet neuroprotecteur (Kögel et al., 2011), la modulation de l'excitabilité neuronale (Mattson et al., 1993 ; Mattson and Furukawa, 1998), la plasticité neuronale (Turner et al., 2003 ; Ring et al., 2007), la croissance et la ramification des axones (Ikin et al., 2007), la croissance des dendrites (Mattson, 1997) et la synaptogenèse (Moya et al., 1994). En ce qui concerne le TC, il a été montré que l'administration (i.c.v.) de la sAPPα post-TC, diminue les lésions focales, les LADs et les déficits moteur et cognitif (Thornton et al., 2006 ; Corrigan et al., 2011 ; 2012). Ainsi, un des mécanismes neuroprotecteurs de la minocycline dans le TC pourrait être associé à la sAPPα.

L'activité anti-inflammatoire de la minocycline a été également associée à sa capacité de chélater des ions bivalents, tels que le Ca^{2+} (Antonenko et al., 2010). Le TC induit une accumulation intracellulaire excessive des ions de Ca^{2+}, ce qui conduit à une augmentation de la perméabilité mitochondriale et à une activation des protéases Ca^{2+}-dépendantes, telles que les calpaïnes. Ces conséquences favorisent

la mort neuronale et l'aggravation des lésions secondaires (Czeiter et al., 2009). La chélation de Ca^{2+} excédentaire par la minocycline pourrait donc être à l'origine de ses effets neuroprotecteurs. Par ailleurs, la sAPPα peut également normaliser la concentration intracellulaire en Ca^{2+} et protéger les neurones contre l'excitotoxicité. De plus, il a été montré que la sAPPα inhibe les récepteurs NMDA et diminue ainsi la concentration intracellulaire en Ca^{2+} et les dommages neuronaux liés à l'excitotoxicité (Furukawa et al., 1996 ; Furukawa et Mattson, 1998).

Par ailleurs, l'effet anti-inflammatoire de la minocycline pourrait être aussi dû à l'inhibition de la PARP (Graziani et al., 2005 ; Alano et al., 2006). En effet, cette dernière est fortement corrélée à l'activité neuroprotectrice de la minocycline dans des cultures de neurones (Alano et al., 2006). En outre, l'inhibition de la PARP conduit aux effets neuroprotecteurs suite à un TC (Besson et al., 2003, 2005 ; Kövesdi et al., 2010 ; Lescot 2010).

Enfin, l'effet neuroprotecteur de la minocycline semble être aussi associé à l'inhibition de la p38 *mitogen-activated protein kinase*, qui conduit à l'inhibition de l'activation microgliale et à la diminution de la mort neuronale (Guo et al., 2007). Il est important de noter que la sAPPα exerce aussi une activité anti-apoptotique, principalement *via* sa participation dans diverses voies de signalisation cellulaire, notamment celles du NF-kB (Guo et al., 1998 ; Cheng et al., 2002) et de la ERK-MAP kinase (Greenberg et al., 1995 ; Venezia et al., 2006). La signalisation anti-apoptotique engendrée par la sAPPα pourrait également impliquer la voie p38-MAP kinase (Burton et al., 2002).

Pour conclure, notre travail confirme la chute du neuroprotecteur sAPPα dans la phase précoce post-TC et met en évidence des lésions tardives, accompagnés des déficits fonctionnels à court et à long terme dans notre modèle de TC à crâne fermé. La minocycline en traitement aigu est en mesure non seulement de rétablir le taux de la sAPPα, mais également d'exercer des effets neuroprotecteurs à long terme en atténuant le déficit olfactif et cognitif et en corrigeant les atteintes histologiques induites par le TC. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, l'inhibition de la phase précoce de la neuro-inflammation induit une récupération à long terme, à la fois fonctionnelle et histologique. La restauration du niveau de la sAPPα pourrait expliquer cet effet neuroprotecteur, cependant des études supplémentaires sont nécessaires afin d'élucider le(s) mécanisme(s) d'action de la

minocycline dans notre modèle de TC.

A cet égard, il est important de rappeler que la minocycline est entrée en essai clinique chez les traumatisés crâniens aux Etats-Unis (www.clinicaltrials.com), avec un espoir d'observer des effets thérapeutiques chez les patients.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE L'EFFET D'UN ACTIVATEUR DES α-SÉCRÉTASES, L'ÉTAZOLATE, SUR LES CONSEQUENCES BIOCHIMIQUES, HISTOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES DU TC, A COURT ET À LONG TERME

Nous avons montré dans la première partie l'effet neuroprotecteur durable d'un traitement aigu par la minocycline dans un modèle murin du TC à crâne fermé (cf. résultats, première partie). Afin d'étayer notre hypothèse de travail, la présente étude fournit des données supplémentaires quant à l'intérêt thérapeutique dans le TC des composés qui restaurent le taux de sAPPα.

Dans cette partie du travail, nous avons évalué les effets de l'étazolate, une pyrazolopyridine qui a été récemment décrite comme 'activateur des α-sécrétases', sur les conséquences biochimiques, histologiques et fonctionnelles, à court et à long terme post-TC. Dans un premier temps, nous avons établi un protocole d'administration qui permet la restauration du taux de la sAPPα, suite à une étude de fenêtre d'opportunité thérapeutique. Ensuite, nous avons réalisé une étude d'effet-dose avec l'étazolate, sur le score neurologique, l'activation microgliale, le niveau d'IL-1β, l'œdème cérébral, ainsi que sur les lésions précoces et tardives. Nous avons également évalué l'effet d'étazolate sur l'hyperactivité locomotrice et le déficit cognitif à long terme.

Ce travail constitue la première tentative d'évaluation de l'intérêt thérapeutique d'un activateur des α-sécrétases dans un modèle de lésion cérébrale aiguë.

1. Un activateur des α-sécrétases, l'étazolate, réduit la neuro-inflammation et entraîne une neuroprotection à court et à long terme post-TC chez la souris

1.1. Évolution post-TC du taux de l'IL-1β

Le TC entraîne une augmentation significative du taux d'IL-1β dans le cerveau à partir de 3h (7,1 ± 2,1 *vs* 2,5 ± 0,3 pg/mg de protéine; P<0,05 *vs* N) qui devient maximal à 6 h (17,1 ± 2,1 *vs* 2,5 ± 0,3 pg/mg de protéine; P<0,001 *vs* N) et atteint le niveau basal à 24h post-TC **(Fig. 27)**. L'ensemble de ces résultats confirment nos données antérieures (Homsi et al., 2009), montrant une augmentation précoce et transitoire d'IL-1β dans nos conditions expérimentales. Le temps de 6h post-TC a été ensuite choisi pour l'étude de l'effet de l'étazolate sur le taux de l'IL-1β.

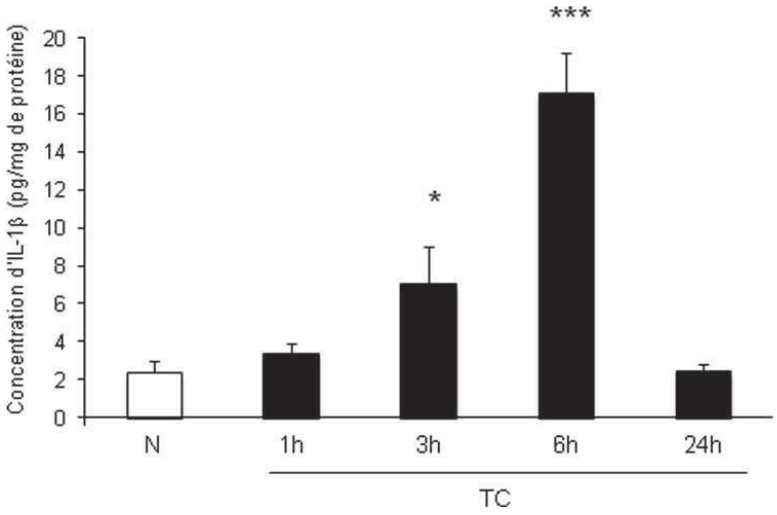


Figure 27 : Evolution du taux cérébral de l'IL-1β chez des souris naïves (N) et traumatisées à 1h, 3h, 6h et 24h post-TC. Les résultats sont exprimés en moyenne ± e.s.m. (n=8 par groupe). * P<0,05 ; *** P<0,001 *vs* N.

1.2. Évolution post-TC de l'œdème cérébral

Comme on peut le voir dans la **Fig. 28**, le TC entraîne une augmentation significative du pourcentage de contenu cérébral en eau, ce qui témoigne la présence d'un œdème cérébral qui devient significatif à 24 h (81,3 ± 0,5 *vs* 79,3 ± 0,4 % ; P<0,001 *vs* N) et qui persiste jusqu'au moins 48 h post-TC (81,1 ± 0,5 *vs* 79,3 ± 0,4 % ; P<0,01 *vs* N). Ces résultats confirment des données antérieures obtenues au sein de notre laboratoire (Homsi et al., 2009). Le temps de 24h post-TBI a été ensuite choisi pour l'étude de l'effet de l'étazolate sur l'œdème cérébral.

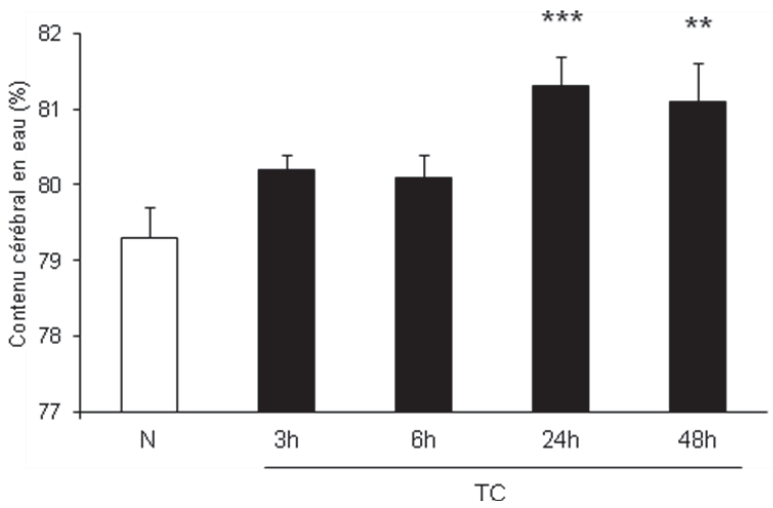


Figure 28 : Evolution de l'œdème cérébral chez des souris naïves (N) et des souris traumatisées à 3h, 6h, 24h et 48h post-TC. Les résultats sont exprimés en moyenne ± e.s.m. (n=10 par groupe). ** P<0,01 ; *** P<0,001 *vs* N.

1.3. Article 4:

Siopi E, Llufriu-Dabén G, Cho AH, Vidal-Lletjós S, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. (2012). Etazolate, a phosphodiesterase-4 inhibitor and α-secretase activator, reduces neuroinflammation and offers persistent neuroprotection following traumatic brain injury in mice. *(soumis)*

1.4. Effet de l'étazolate sur la température rectale post-TC

Nous avons évalué l'effet de 3 doses d'étazolate (E1 : 1 mg/kg, E3 : 3 mg/kg, E10 : 10 mg/kg) sur la température rectale à 2, 6 et 24h post-TC **(Fig. 29)**. Les résultats ont montré que le TC induit une légère baisse de la température rectale à 2h (36,9 ± 0,2 *vs* 38 ± 0,3 ˚C ; P<0,01 *vs* N), 6h (37,4 ± 0,2 *vs* 38,2 ± 0,1 ˚C ; P<0,01 *vs* N) et à 24h post-TC (37,7 ± 0,2 *vs* 38,7 ± 0,1 ; P<0,001), sans que cette baisse soit interprétée comme une hypothermie. Le traitement avec l'étazolate ne modifie pas la température rectale aux différents temps étudiés.

1.5. Effet propre de l'étazolate sur l'activité locomotrice spontanée et le score neurologique chez les souris naïves

L'effet propre de l'étazolate a été évalué sur l'activité locomotrice à 30 min, 24h, 48h et 6 jours après l'injection chez les souris naïves **(Fig. 30)**. En outre, nous avons évalué l'effet de deux doses (E3 et E10) utilisées pour les études à long terme sur le score neurologique à 4h et 24h post-injection **(Fig. 31).** Seule l'administration de 10 mg/kg d'étazolate a entraîné une diminution significative de l'activité à 30 min post-injection **(Fig. 30**). Plus précisément, il y a une différence significative de l'activité horizontale entre le groupe ayant reçu l'étazolate à 10 mg/kg et les souris ayant reçu le solvant (E10 *vs* S : 471 ± 60 vs 834 ± 89 ; P<0,01). L'étazolate à 10 mg/kg induit aussi une baisse significative de l'activité verticale (E10 *vs* S : 101 ± 19 *vs* 273 ± 30 ; P<0,05). À partir de 24h et jusqu'à 6 j post-TC, aucune différence n'a été constatée sur l'activité locomotrice entre les différents groupes. En ce qui concerne le score neurologique, les résultats ont montré que l'étazolate aux doses utilisées (E3, E10) n'exerce pas d'effet propre à 4 et 24 h post-injection chez les souris naïves **(Fig. 31)**.

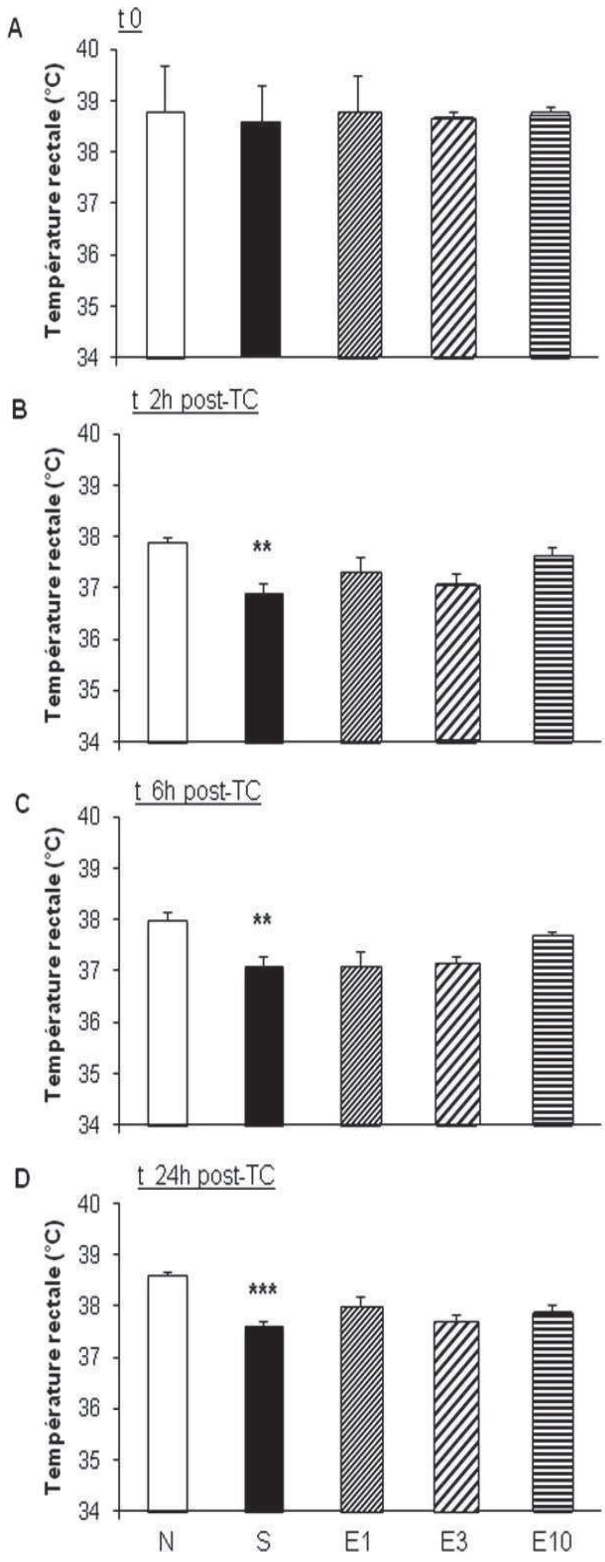


Figure 29 : L'effet de l'étazolate sur la température rectale à t0 (A), 2h (B), 6h (C) et 24 h (D) post-TC, évalué chez des souris traumatisées ayant reçu le solvant (S), ou l'étazolate à la dose de 1 (E1), 3 (E3) ou 10 mg/kg (E10) à 2h post-TC. Les résultats sont exprimés en moyenne ± e.s.m. (n=12 par groupe). ** P<0,01 ; *** P<0,001 *vs* souris naïves (N).

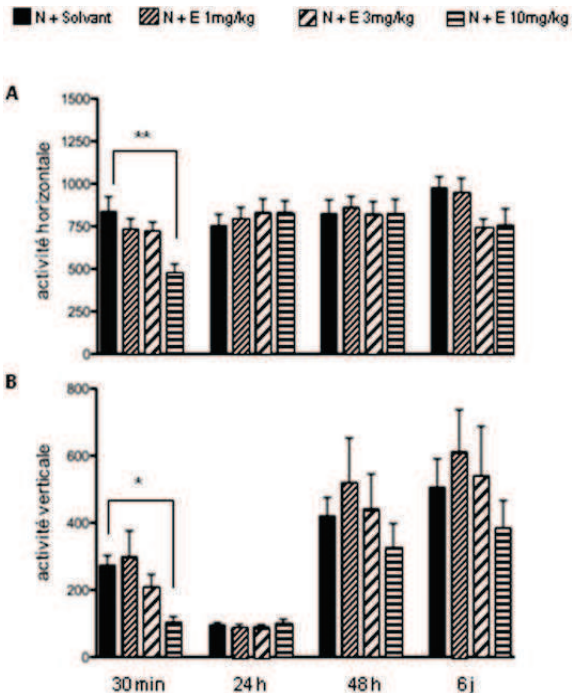


Figure 30 : Effet propre d'étazolate sur l'activité locomotrice horizontale (A) et verticale (B), évalué à 30 min, 24h, 48h et 6j après l'injection chez des souris naïves (N). Quatre groupes de souris ont été utilisés, des souris naïves ayant reçu soit le solvant (S), soit l'étazolate à la dose de 1 (E1), 3 (E3) ou 10 mg/kg (E10). Les résultats sont exprimés en nombre d'interruptions de rayons infrarouge/60 min (moyenne ± e.s.m. ; n=12 par groupe). * P<0,05 ; ** P<0,01 *vs* solvant.

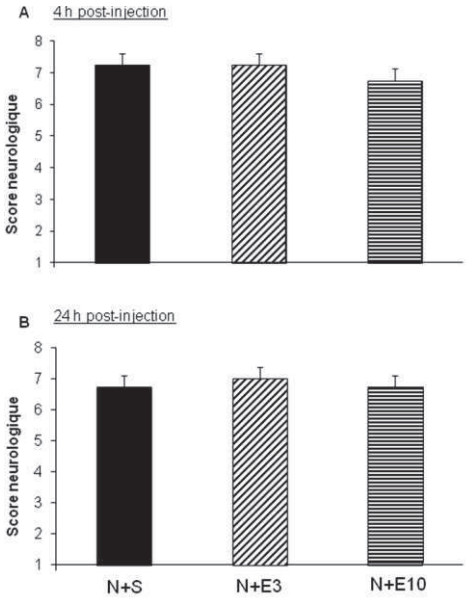


Figure 31 : L'effet propre de l'étazolate sur le score neurologique évalué à 4h (A) et 24h (B) après l'injection chez des souris naïves. Trois groupes de souris ont été utilisés, des souris naïves ayant reçu soit le solvant (N+S), soit l'étazolate à la dose de 3 (N+E3) ou 10 mg/kg (N+E10). Les résultats sont exprimés en moyenne ± e.s.m. (n=8 par groupe).

2. Discussion

Les résultants de cette deuxième partie du travail mettent en lumière les effets thérapeutiques, à court et à long terme post-TC, d'un traitement par l'étazolate, ayant la capacité de s'opposer à la chute post-traumatique de la sAPPα. Nos données ont montré que l'étazolate diminue l'activation microgliale, l'augmentation du niveau d'IL-1β, l'œdème cérébral, la lésion focale et le déficit neurologique, avec une fenêtre d'opportunité thérapeutique d'au moins de 2 h. De manière intéressante, ce même traitement est capable d'atténuer les lésions tardives et de réduire l'hyperactivité locomotrice et le déficit cognitif à long terme post-TC.

L'étazolate a été sélectionné sur la base d'une étude réalisée par Marcade et collaborateurs (2008), qui avait montré que celui-ci stimule l'activité des α-sécrétases en libérant la sAPPα *in vitro* et *in vivo*, et protège ainsi les neurones en culture de la neurotoxicité induite par le peptide Aβ. Nous avons réalisé une étude de fenêtre d'opportunité thérapeutique, en utilisant la dose de 10 mg/kg d'étazolate, qui a été décrite comme la dose qui entraîne une production maximale de sAPPα (Marcade et al., 2008). Les résultats de cette étude ont montré que l'étazolate s'oppose significativement à la chute de sAPPα, à l'augmentation du niveau d'IL-1β et à l'œdème cérébral quand il est administré jusqu'au moins 2 h post-TC. Récemment dans ce même modèle, nous avons montré que la réduction de l'œdème cérébral et des marqueurs de l'inflammation tels que l'IL-1ß était associée à un effet neuroprotecteur (Homsi et al., 2009, 2010) et permet la restauration du niveau de sAPPα après le TC (cf. Première Partie des résultats ; Siopi et al., 2011).

Dans un deuxième temps, lors de notre étude d'effet-dose (1, 3, 10 mg/kg, en simple administration à 2h post-TC), un déficit neurologique précoce a été mise en évidence à 6 et 24h après le TC, se manifestant par la stéréotypie, la désinhibition et l'incapacité de l'animal à sortir d'un cercle en un temps déterminé. De manière intéressante, dans la première partie de nos résultats, nous avons montré que notre modèle expérimental provoque une légère désinhibition, qui est reflétée par une augmentation de la prise de risque dans un contexte anxiogène, et qui est détectable jusqu'à 7 semaines post-TC (Article 3, Siopi et al., 2012b). L'étazolate a atténué avec succès ce déficit précoce de manière dose-dépendante, à 6 et 24h. En ce qui concerne l'effet de l'étazolate sur les conséquences biochimique et œdémateuse, la dose la plus forte (10 mg/kg) a été la plus efficace, avec des effets anti-inflammatoires et anti-œdémateux. En effet, les doses de 1 et 3 mg/kg n'ont montré

aucun effet significatif contre l'augmentation d'IL-1β, ni contre l'œdème cérébral, malgré une certaine tendance à la baisse constatée.

De plus, nos résultats ont révélé la présence d'une lésion focale de contre-coup et d'un élargissement du ventricule ipsilateral à 24h, accompagnés d'une activation microgliale intense autour de la lésion. Comme il a été déjà mentionné dans la première partie des résultats, la neuro-inflammation a été décrite comme un événement physiopathologique qui participe à l'aggravation des lésions secondaires et à la survenue des déficits fonctionnels post-TC (Lloyd et al., 2008; Clausen et al., 2011). L'activation persistante et excessive de cellules microgliales et macrophagiques peut favoriser la mort neuronale et, donc l'atrophie cérébrale (Gentleman et al., 2004; Perry, 2010). En outre, l'augmentation d'IL-1β post-TC est associée au dysfonctionnement de la BHE et à la formation d'un œdème cérébral (Holmin and Mathiesen, 2000; Vecil et al., 2000; Clausen et al., 2011). La variabilité dans la mesure de la taille de la lésion n'a pas permis d'obtenir d'effet thérapeutique statistiquement significatif contre le volume de lésion, malgré une tendance à la baisse. A l'inverse, la dose la plus élevée d'étazolate a diminué de manière importante l'élargissement ventriculaire et l'activation microgliale.

A plus long terme, nous avons reproduit le déficit de la mémoire de reconnaissance à 5 semaines post-TC, accompagné par une hyperactivité locomotrice, dès 48h et jusqu'à 12 semaines post-TC. Enfin, nos études histologiques à long terme ont confirmé la présence d'une lésion au niveau des bulbes olfactifs (BO) à 13 semaines post-TC. Les données de cette étude sont cohérentes avec celles de la première partie de nos résultats (Siopi et al. 2012a, b), ainsi qu'avec une étude précédente de notre équipe sur l'activité locomotrice post-TC (Homsi et al., 2010). De nombreuses études expérimentales ont démontré que les lésions des BO engendrent de l'hyperactivité locomotrice chez la souris et le rat (Zueger et al., 2005; Mucignat-Caretta et al., 2006; Viggiano et al., 2008; Kang et al., 2010). Nos résultats ont aussi montré que l'étazolate, à la dose de 3 et 10 mg/kg, atténue significativement l'hyperactivité locomotrice, le déficit cognitif et les lésions des BO. L'effet pro-cognitif de l'étazolate a été déjà mis en évidence chez les rats âgés (Drott et al., 2010).

Enfin, notre étude sur l'effet propre de l'étazolate a révélée que ce dernier diminue l'activité locomotrice à 30 min post-injection et que cet effet est absent à partir de 24h post-injection. Cette baisse d'activité remarquée précocement avec la dose la plus forte pourrait être due à un effet anxiolytique, issu du renforcement de la

voie GABAérgique (Beer et al., 1972 ; 1978). En outre, l'étazolate n'induit pas de modifications au niveau du score neurologique à 4h et 24h post-injection. Ces données montrent que l'effet du traitement dans nos études comportementales n'a pas été biaisé par un effet propre du composé.

Plusieurs mécanismes distincts sont susceptibles d'être à l'origine de l'effet neuroprotecteur de l'étazolate. Tout d'abord, la restauration du taux de la sAPPα pourrait participer à cette activité neuroprotective. En effet, il a été déjà montré que la neutralisation de la sAPPα, par l'Ac 22C11, s'oppose à l'effet neuroprotecteur de l'étazolate en culture, impliquant un rôle essentiel de la sAPPα dans la neuroprotection induite par l'étazolate (Marcade et al., 2008). En plus d'être neuroprotecteur (Thompson et al., 2006 ; Corrigan et al., 2011 ; 2012), la sAPPα est capable d'exercer des effets anti-apoptotiques contre les lésions excitotoxiques (Mattson et al., 1993; Postina et al., 2004). Par ailleurs, de nombreux composés qui exercent des effets neuroprotecteurs dans le TC, tels que les médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens, les inhibiteurs des cholinestérases et les agonistes muscariniques, les hypolipidémiants ou encore les hormones stéroïdiennes (Pike and Hamm, 1997; Tenovuo, 2005; Kasturi and Stein, 2009; Li et al., 2009; Mahmood et al., 2009) ont en commun de favoriser la production de la sAPPα (Jaffe et al., 1994; Nitsch et al., 1992; Kojro et al., 2001; Avramovich et al., 2002).

De plus, l'étazolate exerce une activité inhibitrice de phosphodiesterase-4 (Wang et al., 1997). Il a été décrit que le rolipram, inhibiteur de PDE4, diminue le déficit cognitif post-TC *via* une augmentation du taux de l'AMPc (Gong et al., 2004; Shrestha et al., 2006). Le rolipram réduit également la neuro-inflammation en favorisant la régénération axonale et la récupération fonctionnelle, suite au traumatisme médullaire (Pearse et al., 2004; Nikulina et al., 2004; Atkins et al., 2007; Hannila et al., 2008; Whitaker et al., 2008). De manière intéressante, nous ne pouvons pas exclure une convergence des voies des α-sécrétases et de l'AMPc, puisqu'il a été décrit que la PKA, qui est connue comme la protéine kinase AMPc-dépendante, favorise l'activité des ADAMs (Marambaud et al., 1996 ; Maillet et al., 2003). Les effets anti-inflammatoire et neuroprotecteur de l'étazolate pourraient donc être interdépendants, issus de la diminution de la mort neuronale par l'activation des α–sécrétases et par l'inhibition des PDE4.

En outre, il a été montré que l'étazolate est un modulateur des Rc $GABA_A$ qui potentialise l'action des benzodiazépines (Supavilai et al., 1979). L'effet neuroprotecteur de l'étazolate pourrait donc être également médié par la

modulation des $RcGABA_A$. En effet, dans la même étude par Marcade et collaborateurs (2008), la neuroprotection contre la neurotoxicité de l'Aβ a été prévenue par l'ajout des antagonistes des $RcGABA_A$, démontrant l'implication des $RcGABA_A$ dans l'effet neuroprotecteur de l'étazolate. Etant donnée que la neurotoxicité du peptide Aβ est induite, entre autres, par l'augmentation de l'excitabilité neuronale (Lee et al., 2005), l'effet neuroprotecteur de l'étazolate pourrait alors être associé à une normalisation du flux de Cl^- *via* la stimulation des $RcGABA_A$. Des études supplémentaires sont nécessaires afin d'examiner s'il y a un mécanisme associant la stimulation des $RcGABA_A$ et la production de la sAPPα.

En conclusion, cette étude est la première de mettre en évidence les effets thérapeutiques d'un activateur des α-sécrétases, l'étazolate, dans un modèle de lésion cérébrale aiguë. Nos données ont révélé les propriétés anti-inflammatoire et anti-œdémateuse de l'étazolate, en administration unique, accompagnées d'un effet neuroprotecteur durable et une fenêtre d'opportunité thérapeutique d'au moins de 2h. De manière intéressante, nous avons retrouvé l'efficacité durable obtenue avec le traitement par la minocycline (Cf. Résultats, première partie).

Bien qu'il y ait très peu de données expérimentales avec l'étazolate dans les modèles expérimentaux de maladies neurodégénératives et de lésions cérébrales aiguës, ce composé (EHT-0202) a fait son chemin en essai clinique de phase IIA pour le traitement de la maladie d'Alzheimer avec les premiers résultats encourageants (Vellas et al., 2011), ce qui donne un espoir pour le traitement des patients traumatisés crâniens.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce travail a été d'évaluer le potentiel thérapeutique des stratégies qui rétablissent la protéolyse physiologique du βAPP par les α-sécrétases, sur les conséquences précoces et tardives d'un TC par percussion mécanique chez la souris. Afin d'étudier une telle stratégie, nous avons choisi la minocycline et l'étazolate, deux composés pharmacologiques susceptibles d'augmenter le taux de la sAPPα, issue du clivage non-amyloïdogénique des α-sécrétases.

Pour mener une telle étude, nous avons tout d'abord reproduit des conséquences précoces qui caractérisent notre modèle de TC, telles que la baisse du taux de sAPPα, l'augmentation du niveau d'IL-1β, l'œdème cérébral et la lésion focale. Nous avons ainsi montré que ces conséquences sont associées à un déficit neurologique précoce. Nous avons également caractérisé notre modèle de TC sur le plan histologique et fonctionnel à long terme post-TC. Ainsi, nos études histologiques à 12 semaines post-TC ont mis en évidence des lésions au niveau du corps calleux, du striatum, des ventricules et des bulbes olfactifs, accompagnés d'une gliose réactive. Nous avons également développé et appliqué différents tests comportementaux dans le but de mettre en évidence des troubles sensoriels et cognitifs à long terme post-TC. Ces tests nous ont permis de révéler un trouble d'odorat persistant qui se trouve fortement corrélé avec les lésions des bulbes olfactifs, ainsi qu'un trouble cognitif durable, à savoir un déficit de mémoire de reconnaissance, accompagné d'une légère désinhibition. Nous avons également reproduit l'hyperactivité locomotrice, un déficit persistant qui a été déjà décrit dans nos conditions expérimentales. Ainsi, notre modèle de TC est adapté pour étudier les conséquences fonctionnelles et histologiques tardives qui préoccupent essentiellement les cliniciens.

Dans un deuxième temps, les résultats de nos études pharmacologiques vont, de manière intéressante, dans le sens de notre hypothèse et montrent que les conséquences précoces et tardives de notre modèle de TC par percussion mécanique sont réduites à la fois par la minocycline et par l'étazolate, deux composés qui restaurent le taux du neuroprotecteur sAPPα suite à un TC. L'originalité de ce travail concerne l'effet neuroprotecteur durable d'un traitement anti-inflammatoire et anti-œdémateux de la minocycline, ainsi que l'effet neuroprotecteur et anti-inflammatoire de l'étazolate, mis en évidence pour la première fois dans un modèle de lésion aiguë. Ces résultats sont d'autant plus

intéressants que la fenêtre d'opportunité thérapeutique de l'étazolate est au moins de 2h, et que la même fenêtre est obtenue avec l'effet anti-œdémateux de la minocycline (les résultats non publiés; Homsi, 2009)

Les résultats de cette thèse permettent de considérer la restauration du niveau de la sAPPα comme un des mécanismes à l'origine des effets neuroprotecteurs obtenus avec les composés étudiés. Néanmoins, afin d'étayer cette hypothèse, il conviendrait de poursuivre notre étude par des analyses supplémentaires. Il serait essentiel de compléter ce travail par l'étude d'effet-dose de l'étazolate sur le niveau post-TC de la sAPPα, étude qui n'a pu être réalisée au cours de cette thèse, suite à des problèmes techniques. Par ailleurs, il sera crucial de tester le même protocole de traitement par l'étazolate dans d'autres modèles de TC et chez d'autres espèces afin de confirmer les bénéfices thérapeutiques du composé dans le TC expérimental au sens large.

En outre, il serait intéressant d'étudier si l'effet de la minocycline sur le niveau post-TC de la sAPPα est un effet direct, issu d'une activation des α-sécrétases, ou bien un effet indirect, issu de l'inhibition des différents processus neuro-inflammatoires qui semblent perturber la protéolyse physiologique du βAPP. L'effet 'chélateur des ions bivalents' de la minocycline nous incite à suggérer que cette dernière agirait plutôt comme inhibiteur des métalloprotéases zinc-dépendantes, telles que les α-sécrétases. Ainsi, l'effet observé par la minocycline dans notre étude proviendrait plutôt d'un effet indirect sur les α-sécrétases, conduisant à la restauration du taux de la sAPPα après le TC. Néanmoins, afin d'élucider cette question, il faudrait réaliser des études *in vitro* et examiner l'effet propre de la minocycline sur l'activité des ADAMs, particulièrement de l'ADAM 10, l'enzyme qui participe majoritairement au clivage non-amyloïdogénique du βAPP dans le cerveau.

Par ailleurs, étant donné que la minocycline et l'étazolate sont des molécules aux effets pléïotropes, nous pouvons nous interroger sur leur(s) mécanisme(s) d'action neuroprotecteur(s) outre que leur action sur la sAPPα. Plusieurs cibles moléculaires ont été proposées pour expliquer les effets thérapeutiques de la minocycline. Parmi ces cibles, la PARP a attiré notre attention, puisqu'il a été montré que la minocycline est un inhibiteur puissant de la PARP (Alano et al., 2006). Or, les travaux antérieurs du laboratoire ont largement mis en évidence les effets anti-inflammatoires, anti-œdémateux et neuroprotecteurs des inhibiteurs de PARP dans des modèles de TC (Besson et al., 2003, 2005, 2009; Lescot et al., 2010b). Parallèlement, une étude récente a montré que l'inhibition de la PARP conduit à une

réduction de l'accumulation axonale de ß-APP dans la phase aiguë du TC (Kovesdi et al., 2010). En outre, l'activation de la PARP a été associée à une perturbation de la protéolyse du βAPP en faveur de la voie amyloïdogénique (Love et al., 1999). Enfin, l'activation de la PARP au sein des microglies contribue à leur migration, à la neuro-inflammation, à la démyélinisation et au dommage neuronal (Diestel et al., 2003). Compte tenu de ces données, nous pouvons formuler l'hypothèse selon laquelle la PARP pourrait être un lien entre l'activation microgliale, la chute de sAPPα et les lésions cérébrales post-TC, et que l'inhibition de la PARP par la minocycline conduirait ainsi aux effets thérapeutiques observés au cours de cette présente thèse. Il reste néanmoins à établir si la PARP est activée dans notre modèle et si elle est inhibée lors du traitement aigu par la minocycline dans nos conditions expérimentales.

De plus, d'après nos résultats issus de notre collaboration avec l'équipe du Pr. Paz Viveros (Université Complutense, Madrid) et du Dr. Dave Finn (*National University of Ireland*, Galway), les récepteurs aux cannabinoïdes, CB1 et CB2 pourraient aussi participer à l'action thérapeutique de la minocycline. En effet, il est bien connu que le système endocannabinoïde (ECS) joue un rôle réparateur et compensateur en condition neuropathologique, en atténuant le taux de Ca^{2+}, l'activation de p38-MAPK, l'expression de la caspase-3 et la production de NO (Sánchez et al., 2012). Ces effets bénéfiques sont également attribués à la minocycline et semblent être associés à son effet neuroprotecteur (Zemke et Majid, 2004). Nos données ont montré que dans le même modèle de TC, l'effet anti-œdémateux et neuroprotecteur de la minocycline ainsi que son effet inhibiteur de l'activation microgliale, sont bloqués par l'administration des antagonistes des récepteurs CB1 et CB2 (López-Rodriguez et al., manuscrit en préparation). Ces résultats montrent une implication de ces derniers dans l'effet neuroprotecteur de la minocycline.

En ce qui concerne l'étazolate, un autre composé au profil pléiotrope, de nombreuses voies de recherche pourraient s'ouvrir afin d'examiner les mécanismes précis à l'origine de son effet neuroprotecteur dans le TC. Pour cela, il est indispensable d'intégrer l'approche *in vitro* dans ce travail, qui permettra d'examiner l'implication d'autres voies, telles que la voie $GABA_A$, dans l'effet neuroprotecteur de l'étazolate. Par ailleurs, les études expérimentales sur les lésions cérébrales aigües ont montré une inhibition aigüe et chronique post-lésionnelle de la neurotransmission $GABA_A$érgique, et une stimulation des voies excitatrices, qui pourraient être à l'origine d'une augmentation de l'excitabilité neuronale et de

l'épileptogenèse (O'Dell et al., 2000 ; Imbrosci et al., 2011). En outre, la stimulation des $RcGABA_A$ a été décrite comme stratégie neuroprotectrice dans des modèles expérimentaux de TC et d'ischémie cérébrale (Pavlov et al., 2011 ; Rudolph et al., 2011). Dans cette optique, il serait aussi intéressant d'examiner l'impact de notre modèle de TC sur le seuil épileptogène, afin d'étudier l'effet d'étazolate sur ce dernier.

Outre son effet thérapeutique dans le TC, l'étazolate pourrait avoir un intérêt dans d'autres pathologies du SNC, telles que l'IC. Etant donné que l'augmentation intracellulaire d'AMPc représente l'une des principales causes d'inhibition de l'agrégation plaquettaire, les stratégies qui favorisent la production d'AMPc pourraient s'opposer aux phénomènes thrombotiques rencontrés dans l'IC. L'étazolate pourrait donc exercer des effets anti-thrombotiques *via* son activité inhibitrice des PDE4, qui conduit à une élévation du taux d'AMPc (Smith et al., 1972). Dans ce contexte, une étude récente, menée par Ok et coll. (2012), a montré que l'epigallocatechin-3-gallate, un composé qui augmente le taux d'AMPc et qui est bien connu pour ses effet anti-oxydants et anti-inflammatoires, exerce des effets anti-agrégants plaquettaires de manière AMPc-dépendante *in vitro*. De manière intéressante, ce même composé est actuellement en essai clinique pour le traitement de la maladie d'Alzheimer (www.clinicaltrials.gov), grâce à sa capacité de favoriser l'activité de l'ADAM 10 et de réduire la production d'Aβ (Oregon et al., 2006). Ces données renforcent non seulement le potentiel pléiotrope de l'étazolate mais également suggèrent l'intérêt thérapeutique de l'étazolate pour les troubles thrombotiques, tels que l'IC.

Enfin, il est très important d'intégrer dans nos études l'approche d'imagerie cérébrale afin d'améliorer la détection et le suivi de l'œdème cérébral et des lésions focales et diffuses. Les techniques de l'imagerie cérébrale du petit animal nous sont devenus accessibles (Lescot et al., 2010a) et permettent entre autres, grâce au développement de séquences de diffusion, d'étudier la nature et l'évolution de l'œdème cérébral post-TC chez un même animal, parallèlement à l'évaluation des déficits fonctionnels à court et à long terme. Il est à rappeler que l'imagerie cérébrale constitue une avancée majeure dans la prise en charge des patients victimes de TC grave (Betz et al., 2012) et que ce nouvel outil permet d'accéder à un bilan lésionnel exhaustif, et permet grâce au développement de séquences métaboliques et de diffusion, d'étudier la capacité de récupération cérébrale (cf. Rappels bibliographiques, Le traumatisme crânien, § 1.2). Ainsi, nous pouvons renforcer l'évaluation préclinique de nos stratégies neuroprotectrices à l'aide d'outils

transposables à la clinique humaine, afin d'évaluer la lésion cérébrale et le pronostic et ainsi de limiter l'échec en phase clinique de nos stratégies neuroprotectrices prometteuses.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux a permis d'évaluer l'intérêt et les bénéfices dans le TC de deux stratégies thérapeutiques, par la minocycline et l'etazolate, qui favorisent la neuroprotection endogène en rétablissant le niveau post-TC de la sAPPα. Ces traitements conduisent individuellement à un effet anti-œdémateux avec une réduction des marqueurs de l'inflammation, de l'activation microgliale et de la lésion focale post-TC, mais surtout à une neuroprotection durable, à la fois histologique et fonctionnelle. Ces données montrent que la minocycline et l'étazolate constituent des stratégies neuroprotectrices prometteuses pour le traitement du TC. À cet égard, la minocycline est entrée en essai clinique chez les traumatisés crâniens aux Etats-Unis (www.clinicaltrials.com). L'étazolate est récemment entré en essai clinique pour la maladie d'Alzheimer et il devrait susciter un intérêt croissant en clinique, et la mise en place de nouveaux essais thérapeutiques dans les années à venir.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abelson-Mitchell, N., 2008. Epidemiology and prevention of head injuries: literature review. J Clin Nurs. 17, 46-57.

Abdel Baki, S. G., Schwab, B., Haber, M., Fenton, A. A. and Bergold, P. J., 2010. Minocycline synergizes with N-acetylcysteine and improves cognition and memory following traumatic brain injury in rats. PLoS One. 5, e12490.

Adelson, P. D., Dixon, C. E., Robichaud, P. and Kochanek, P. M., 1997. Motor and cognitive functional deficits following diffuse traumatic brain injury in the immature rat. J Neurotrauma. 14, 99-108.

Agwuh, K. N. and MacGowan, A., 2006. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylcyclines. J Antimicrob Chemother. 58, 256-265.

Aihara, N., Hall, J. J., Pitts, L. H., Fukuda, K. and Noble, L. J., 1995. Altered immunoexpression of microglia and macrophages after mild head injury. J Neurotrauma. 12, 53-63.

Alano, C. C., Kauppinen, T. M., Valls, A. V. and Swanson, R. A., 2006. Minocycline inhibits poly(ADP-ribose) polymerase-1 at nanomolar concentrations. Proc Natl Acad Sci U S A. 103, 9685-9690.

Allain, H. and Bentue-Ferrer, D., 2006. The anti-dementia drugs: myth, hype or reality? Clin Neuropharmacol. 29, 10-14.

Allan, S. M. and Rothwell, N. J., 2003. Inflammation in central nervous system injury. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 358, 1669-1677.

Allinson, T. M., Parkin, E. T., Turner, A. J. and Hooper, N. M., 2003. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. J Neurosci Res. 74, 342-352.

Alonso, G. D., Schoijet, A. C., Torres, H. N. and Flawia, M. M., 2007. TcrPDEA1, a cAMP-specific phosphodiesterase with atypical pharmacological properties from Trypanosoma cruzi. Mol Biochem Parasitol. 152, 72-79.

Amin, A. R., Attur, M. G., Thakker, G. D., Patel, P. D., Vyas, P. R., Patel, R. N., Patel, I. R. and Abramson, S. B., 1996. A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. Proc Natl Acad Sci U S A. 93, 14014-14019.

Amour, A., Slocombe, P. M., Webster, A., Butler, M., Knight, C. G., Smith, B. J., Stephens, P. E., Shelley, C., Hutton, M., Knauper, V., Docherty, A. J. and Murphy, G., 1998. TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. FEBS Lett. 435, 39-44.

Andes, D. and Craig, W. A., 2002. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. Int J Antimicrob Agents. 19, 261-268.

Anliker, B. and Muller, U., 2006. The functions of mammalian amyloid precursor protein and related amyloid precursor-like proteins. Neurodegener Dis. 3, 239-246.

Antonenko, Y. N., Rokitskaya, T. I., Cooper, A. J. and Krasnikov, B. F., 2010. Minocycline chelates Ca2+, binds to membranes, and depolarizes mitochondria by formation of Ca2+-dependent ion channels. J Bioenerg Biomembr. 42, 151-163.

Arakawa, S., Shirayama, Y., Fujita, Y., Ishima, T., Horio, M., Muneoka, K., Iyo, M. and Hashimoto, K., 2011. Minocycline produced antidepressant-like effects on the learned helplessness rats with alterations in levels of monoamine in the amygdala and no changes in BDNF levels in the hippocampus at baseline. Pharmacol Biochem Behav. 100, 601-606.

Arand, M., Melzner, H., Kinzl, L., Bruckner, U. B. and Gebhard, F., 2001. Early inflammatory mediator response following isolated traumatic brain injury and other major trauma in humans. Langenbecks Arch Surg. 386, 241-248.

Arumugam, T. V., Granger, D. N. and Mattson, M. P., 2005. Stroke and T-cells. Neuromolecular Med. 7, 229-242.

Arvin, K. L., Han, B. H., Du, Y., Lin, S. Z., Paul, S. M. and Holtzman, D. M., 2002. Minocycline markedly protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. Ann Neurol. 52, 54-61.

Atack, J. R., 2011b. GABAA receptor subtype-selective modulators. II. alpha5-selective inverse agonists for cognition enhancement. Curr Top Med Chem. 11, 1203-1214.

Atkins, C. M., Oliva, A. A., Jr., Alonso, O. F., Pearse, D. D., Bramlett, H. M. and Dietrich, W. D., 2007. Modulation of the cAMP signaling pathway after traumatic brain injury. Exp Neurol. 208, 145-158.

Atkins, E. J., Newman, N. J. and Biousse, V., 2008. Post-traumatic visual loss. Rev Neurol Dis. 5, 73-81.

Bailey, J. A., Ray, B., Greig, N. H. and Lahiri, D. K., 2011. Rivastigmine lowers Abeta and increases sAPPalpha levels, which parallel elevated synaptic markers and metabolic activity in degenerating primary rat neurons. PLoS One. 6, e21954.

Baker, A. J., Phan, N., Moulton, R. J., Fehlings, M. G., Yucel, Y., Zhao, M., Liu, E. and Tian, G. F., 2002. Attenuation of the electrophysiological function of the corpus callosum after fluid percussion injury in the rat. J Neurotrauma. 19, 587-599.

Bales, J. W., Wagner, A. K., Kline, A. E. and Dixon, C. E., 2009. Persistent cognitive dysfunction after traumatic brain injury: A dopamine hypothesis. Neurosci Biobehav Rev. 33, 981-1003.

Bandyopadhyay, S., Goldstein, L. E., Lahiri, D. K. and Rogers, J. T., 2007. Role of the APP non-amyloidogenic signaling pathway and targeting alpha-secretase as an alternative drug target for treatment of Alzheimer's disease. Curr Med Chem. 14, 2848-2864.

Barad, M., Bourtchouladze, R., Winder, D. G., Golan, H. and Kandel, E., 1998. Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long-term potentiation and improves memory. Proc Natl Acad Sci U S A. 95, 15020-15025.

Baratchi, S., Evans, J., Tate, W. P., Abraham, W. C. and Connor, B., 2011. Secreted amyloid precursor proteins promote proliferation and glial differentiation of adult hippocampal neural progenitor cells. Hippocampus.

Barger, S. W. and Mattson, M. P., 1996. Induction of neuroprotective kappa B-dependent transcription by secreted forms of the Alzheimer's beta-amyloid precursor. Brain Res Mol Brain Res. 40, 116-126.

Barnes, D. M., White, W. F. and Dichter, M. A., 1983. Etazolate (SQ20009): electrophysiology and effects on [3H]flunitrazepam binding in cultured cortical neurons. J Neurosci. 3, 762-772.

Barnham, K. J., McKinstry, W. J., Multhaup, G., Galatis, D., Morton, C. J., Curtain, C. C., Williamson, N. A., White, A. R., Hinds, M. G., Norton, R. S., Beyreuther, K., Masters, C. L., Parker, M. W. and Cappai, R., 2003. Structure of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein copper binding domain. A regulator of neuronal copper homeostasis. J Biol Chem. 278, 17401-17407.

Basu, A., Krady, J. K., O'Malley, M., Styren, S. D., DeKosky, S. T. and Levison, S. W., 2002. The type 1 interleukin-1 receptor is essential for the efficient activation of microglia and the induction of multiple proinflammatory mediators in response to brain injury. J Neurosci. 22, 6071-6082.

Bauer, A. T., Burgers, H. F., Rabie, T. and Marti, H. H., 2010. Matrix metalloproteinase-9 mediates hypoxia-induced vascular leakage in the brain via tight junction rearrangement. J Cereb Blood Flow Metab. 30, 837-848.

Bauer, R., Walter, B., Fritz, H. and Zwiener, U., 1999. Ontogenetic aspects of traumatic brain edema--facts and suggestions. Exp Toxicol Pathol. 51, 143-150.

Bayir, H., Kagan, V. E., Borisenko, G. G., Tyurina, Y. Y., Janesko, K. L., Vagni, V. A., Billiar, T. R., Williams, D. L. and Kochanek, P. M., 2005. Enhanced oxidative stress in iNOS-deficient mice after traumatic brain injury: support for a neuroprotective role of iNOS. J Cereb Blood Flow Metab. 25, 673-684.

Beer, B., Chasin, M., Clody, D. E. and Vogel, J. R., 1972. Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase in brain: effect on anxiety. Science. 176, 428-430.

Beer, B., Klepner, C. A., Lippa, A. S. and Squires, R. F., 1978. Enhancement of 3H-diazepam binding by SQ 65,396: a novel anti-anxiety agent. Pharmacol Biochem Behav. 9, 849-851.

Belelli, D., Harrison, N. L., Maguire, J., Macdonald, R. L., Walker, M. C. and Cope, D. W., 2009. Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. J Neurosci. 29, 12757-12763.

Bell, K. F., Zheng, L., Fahrenholz, F. and Cuello, A. C., 2008. ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis. Neurobiol Aging. 29, 554-565.

Bellander, B. M., Lidman, O., Ohlsson, M., Meijer, B., Piehl, F. and Svensson, M., 2010. Genetic regulation of microglia activation, complement expression, and neurodegeneration in a rat model of traumatic brain injury. Exp Brain Res. 205, 103-114.

Belmont, A., Agar, N., Hugeron, C., Gallais, B. and Azouvi, P., 2006. Fatigue and traumatic brain injury. Ann Readapt Med Phys. 49, 283-288, 370-284.

Beltman, J., Sonnenburg, W. K. and Beavo, J. A., 1993. The role of protein phosphorylation in the regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterases. Mol Cell Biochem. 127-128, 239-253.

Bennouna, M., Greene, V. B. and Defranoux, L., 2007. [Cholinergic hypothesis in psychosis following traumatic brain injury and cholinergic hypothesis in schizophrenia: a link?]. Encephale. 33, 616-620.

Bergman, M. R. and Holycross, B. J., 1996. Pharmacological modulation of myocardial tumor necrosis factor alpha production by phosphodiesterase inhibitors. J Pharmacol Exp Ther. 279, 247-254.

Beschorner, R., Dietz, K., Schauer, N., Mittelbronn, M., Schluesener, H. J., Trautmann, K., Meyermann, R. and Simon, P., 2007. Expression of EAAT1 reflects a possible neuroprotective function of reactive astrocytes and activated microglia following human traumatic brain injury. Histol Histopathol. 22, 515-526.

Beschorner, R., Nguyen, T. D., Gozalan, F., Pedal, I., Mattern, R., Schluesener, H. J., Meyermann, R. and Schwab, J. M., 2002. CD14 expression by activated parenchymal microglia/macrophages and infiltrating monocytes following human traumatic brain injury. Acta Neuropathol. 103, 541-549.

Besson, V. C., 2009. Drug targets for traumatic brain injury from poly(ADP-ribose)polymerase pathway modulation. Br J Pharmacol. 157, 695-704.

Besson, V. C., Croci, N., Boulu, R. G., Plotkine, M. and Marchand-Verrecchia, C., 2003. Deleterious poly(ADP-ribose)polymerase-1 pathway activation in traumatic brain injury in rat. Brain Res. 989, 58-66.

Besson, V. C., Zsengeller, Z., Plotkine, M., Szabo, C. and Marchand-Verrecchia, C., 2005. Beneficial effects of PJ34 and INO-1001, two novel water-soluble poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors, on the consequences of traumatic brain injury in rat. Brain Res. 1041, 149-156.

Betz, J., Zhuo, J., Roy, A., Shanmuganathan, K. and Gullapalli, R. P., 2012. Prognostic value of diffusion tensor imaging parameters in severe traumatic brain injury. J Neurotrauma. 29, 1292-1305.

Bevins, R. A. and Besheer, J., 2006. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. Nat Protoc. 1, 1306-1311.

Biacabe, B., Nores, J. M. and Bonfils, P., 2000. [Description and analysis of olfactory disorders after head trauma. Review of the literature]. Rev Neurol (Paris). 156, 451-457.

Bishburg, E. and Bishburg, K., 2009. Minocycline--an old drug for a new century: emphasis on methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and Acinetobacter baumannii. Int J Antimicrob Agents. 34, 395-401.

Bissonnette, B., 2000. [From the macroscopic lesion to cellular ischemia]. Ann Fr Anesth Reanim. 19, 270-274.

Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J. and Cerretti, D. P., 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. Nature. 385, 729-733.

Blasko, I., Beer, R., Bigl, M., Apelt, J., Franz, G., Rudzki, D., Ransmayr, G., Kampfl, A. and Schliebs, R., 2004. Experimental traumatic brain injury in rats stimulates the expression, production and activity of Alzheimer's disease beta-secretase (BACE-1). J Neural Transm. 111, 523-536.

Blum, D., Chtarto, A., Tenenbaum, L., Brotchi, J. and Levivier, M., 2004. Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders. Neurobiol Dis. 17, 359-366.
Bodovitz, S. and Klein, W. L., 1996. Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. J Biol Chem. 271, 4436-4440.

Boichot, E., Wallace, J. L., Germain, N., Corbel, M., Lugnier, C., Lagente, V, Bourguignon, J. J, 2000. Anti-inflammatory activities of a new series of selective phosphodiesterase 4 inhibitors derived from 9-benzyladenine. J Pharmacol Exp Ther. 292, 647-53.

Bonelli, R. M., Heuberger, C. and Reisecker, F., 2003. Minocycline for Huntington's disease: an open label study. Neurology. 60, 883-884.

Bonelli, R. M., Hodl, A. K., Hofmann, P. and Kapfhammer, H. P., 2004. Neuroprotection in Huntington's disease: a 2-year study on minocycline. Int Clin Psychopharmacol. 19, 337-342.

Borea, P. A., Supavilai, P. and Karobath, M., 1983. Differential modulation of etazolate or pentobarbital enhanced [3H] muscimol binding by benzodiazepine agonists and inverse agonists. Brain Res. 280, 383-386.

Boto, G. R., Gomez, P. A., De la Cruz, J. and Lobato, R. D., 2009. A historical analysis of severe head injury. Neurosurg Rev. 32, 343-353; discussion 353-344.

Bouma, G. J., Muizelaar, J. P., Choi, S. C., Newlon, P. G. and Young, H. F., 1991. Cerebral circulation and metabolism after severe traumatic brain injury: the elusive role of ischemia. J Neurosurg. 75, 685-693.

Bouron, A., Mbebi, C., Loeffler, J. P. and De Waard, M., 2004. The beta-amyloid precursor protein controls a store-operated Ca2+ entry in cortical neurons. Eur J Neurosci. 20,

2071-2078.

Bramlett, H. M. and Dietrich, W. D., 2002. Quantitative structural changes in white and gray matter 1 year following traumatic brain injury in rats. Acta Neuropathol. 103, 607-614.

Bramlett, H. M. and Dietrich, W. D., 2004. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. J Cereb Blood Flow Metab. 24, 133-150.

Brines, M. L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N. C., Cerami, C., Itri, L. M. and Cerami, A., 2000. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 10526-10531.

Brooks, D. N. and McKinlay, W., 1983. Personality and behavioural change after severe blunt head injury--a relative's view. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 46, 336-344.

Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A. and Israel, A., 2000. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. Mol Cell. 5, 207-216.

Brough, D., Tyrrell, P. J. and Allan, S. M., 2011. Regulation of interleukin-1 in acute brain injury. Trends Pharmacol Sci. 32, 617-622.

Brouillet, E., Trembleau, A., Galanaud, D., Volovitch, M., Bouillot, C., Valenza, C., Prochiantz, A. and Allinquant, B., 1999. The amyloid precursor protein interacts with Go heterotrimeric protein within a cell compartment specialized in signal transduction. J Neurosci. 19, 1717-1727.

Brundula, V., Rewcastle, N. B., Metz, L. M., Bernard, C. C. and Yong, V. W., 2002. Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. Brain. 125, 1297-1308.

Bugno, M., Witek, B., Bereta, J., Bereta, M., Edwards, D. R. and Kordula, T., 1999. Reprogramming of TIMP-1 and TIMP-3 expression profiles in brain microvascular endothelial cells and astrocytes in response to proinflammatory cytokines. FEBS Lett. 448, 9-14.

Buki, A. and Povlishock, J. T., 2006. All roads lead to disconnection?--Traumatic axonal injury revisited. Acta Neurochir (Wien). 148, 181-193; discussion 193-184.

Buki, A., Siman, R., Trojanowski, J. Q. and Povlishock, J. T., 1999. The role of calpain-mediated spectrin proteolysis in traumatically induced axonal injury. J Neuropathol Exp Neurol. 58, 365-375.

Bullock, M. R., Lyeth, B. G. and Muizelaar, J. P., 1999. Current status of neuroprotection trials for traumatic brain injury: lessons from animal models and clinical studies. Neurosurgery. 45, 207-217; discussion 217-220.

Bullock, M. R., Merchant, R. E., Choi, S. C., Gilman, C. B., Kreutzer, J. S., Marmarou, A. and Teasdale, G. M., 2002. Outcome measures for clinical trials in neurotrauma. Neurosurg Focus. 13, ECP1.

Bullock, R., Zauner, A., Woodward, J. J., Myseros, J., Choi, S. C., Ward, J. D., Marmarou, A. and Young, H. F., 1998. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. J Neurosurg. 89, 507-518.

Burton, T. R., Dibrov, A., Kashour, T. and Amara, F. M., 2002. Anti-apoptotic wild-type Alzheimer amyloid precursor protein signaling involves the p38 mitogen-activated protein kinase/MEF2 pathway. Brain Res Mol Brain Res. 108, 102-120.

Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P. and Black, R. A., 1998. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. J Biol Chem. 273, 27765-27767.

Bye, N., Habgood, M. D., Callaway, J. K., Malakooti, N., Potter, A., Kossmann, T. and Morganti-Kossmann, M. C., 2007. Transient neuroprotection by minocycline following traumatic brain injury is associated with attenuated microglial activation but no changes in cell apoptosis or neutrophil infiltration. Exp Neurol. 204, 220-233.

Cachard-Chastel, M., Lezoualc'h, F., Dewachter, I., Delomenie, C., Croes, S., Devijver, H., Langlois, M., Van Leuven, F., Sicsic, S. and Gardier, A. M., 2007. 5-HT4 receptor agonists increase sAPPalpha levels in the cortex and hippocampus of male C57BL/6j mice. Br J Pharmacol. 150, 883-892.

Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L. and Wong, P. C., 2001. BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. Nat Neurosci. 4, 233-234.

Cai, Z. Y., Yan, Y. and Chen, R., 2010. Minocycline reduces astrocytic reactivation and neuroinflammation in the hippocampus of a vascular cognitive impairment rat model. Neurosci Bull. 26, 28-36.

Caille, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Muller, U. and Prochiantz, A., 2004. Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. Development. 131, 2173-2181.

Cakmakci, H., 2009. Essentials of trauma: head and spine. Pediatr Radiol. 39 Suppl 3, 391-405.

Callahan, C. D. and Hinkebein, J. H., 2002. Assessment of anosmia after traumatic brain injury: performance characteristics of the University of Pennsylvania Smell Identification Test. J Head Trauma Rehabil. 17, 251-256.

Capell, A., Grunberg, J., Pesold, B., Diehlmann, A., Citron, M., Nixon, R., Beyreuther, K., Selkoe, D. J. and Haass, C., 1998. The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex. J Biol Chem. 273, 3205-3211.

Carlezon, W. A., Jr., Duman, R. S. and Nestler, E. J., 2005. The many faces of CREB. Trends Neurosci. 28, 436-445.

Carlos, T. M., Clark, R. S., Franicola-Higgins, D., Schiding, J. K. and Kochanek, P. M., 1997. Expression of endothelial adhesion molecules and recruitment of neutrophils after traumatic brain injury in rats. J Leukoc Biol. 61, 279-285.

Carlson, S. L., Parrish, M. E., Springer, J. E., Doty, K. and Dossett, L., 1998. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. Exp Neurol. 151, 77-88.

Carmen, J., Magnus, T., Cassiani-Ingoni, R., Sherman, L., Rao, M. S. and Mattson, M. P., 2007. Revisiting the astrocyte-oligodendrocyte relationship in the adult CNS. Prog Neurobiol. 82, 151-162.

Carty, M. L., Wixey, J. A., Colditz, P. B. and Buller, K. M., 2008. Post-insult minocycline treatment attenuates hypoxia-ischemia-induced neuroinflammation and white matter injury in the neonatal rat: a comparison of two different dose regimens. Int J Dev Neurosci. 26, 477-485.

Cawley, M. J., Marburger, R. K. and Earl, G. L., 1998. Investigational neuroprotective drugs in traumatic brain injury. J Neurosci Nurs. 30, 369-374.

Cernak, I., 2005. Animal models of head trauma. NeuroRx. 2, 410-422.

Chalaris, A., Adam, N., Sina, C., Rosenstiel, P., Lehmann-Koch, J., Schirmacher, P., Hartmann, D., Cichy, J., Gavrilova, O., Schreiber, S., Jostock, T., Matthews, V., Hasler, R., Becker, C., Neurath, M. F., Reiss, K., Saftig, P., Scheller, J. and Rose-John, S., 2010. Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. J Exp Med. 207, 1617-1624.

Chantry, A., Gregson, N. A. and Glynn, P., 1989. A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. J Biol Chem. 264, 21603-21607.

Chasin, M., Harris, D. N., Phillips, M. B. and Hess, S. M., 1972. 1-Ethyl-4-(isopropylidenehydrazino)-1H-pyrazolo-(3,4-b)-pyridine-5-carboxy lic acid, ethyl ester, hydrochloride (SQ 20009)--a potent new inhibitor of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterases. Biochem Pharmacol. 21, 2443-2450.

Chasseigneaux, S. and Allinquant, B., 2012. Functions of Abeta, sAPPalpha and sAPPbeta : similarities and differences. J Neurochem. 120 Suppl 1, 99-108.

Chauhan, N. B., Gatto, R. and Chauhan, M. B., 2010. Neuroanatomical correlation of behavioral deficits in the CCI model of TBI. J Neurosci Methods. 190, 1-9.

Checler, F., 1995. Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. J Neurochem. 65, 1431-1444.

Checler, F., Sunyach, C., Pardossi-Piquard, R., Sevalle, J., Vincent, B., Kawarai, T., Girardot, N., St George-Hyslop, P. and da Costa, C. A., 2007. The gamma/epsilon-secretase-derived APP intracellular domain fragments regulate p53. Curr Alzheimer Res. 4, 423-426.

Chen, M. and Fernandez, H. L., 2004b. Stimulation of beta-amyloid precursor protein alpha-processing by phorbol ester involves calcium and calpain activation. Biochem Biophys Res Commun. 316, 332-340.

Chen, M., Ona, V. O., Li, M., Ferrante, R. J., Fink, K. B., Zhu, S., Bian, J., Guo, L., Farrell, L. A., Hersch, S. M., Hobbs, W., Vonsattel, J. P., Cha, J. H. and Friedlander, R. M., 2000. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. Nat Med. 6, 797-801.

Chen, X. H., Siman, R., Iwata, A., Meaney, D. F., Trojanowski, J. Q. and Smith, D. H., 2004a. Long-term accumulation of amyloid-beta, beta-secretase, presenilin-1, and caspase-3 in damaged axons following brain trauma. Am J Pathol. 165, 357-371.

Chen, Y. and Tang, B. L., 2006. The amyloid precursor protein and postnatal neurogenesis/ neuroregeneration. Biochem Biophys Res Commun. 341, 1-5.

Chen-Roetling, J., Chen, L. and Regan, R. F., 2009. Minocycline attenuates iron neurotoxicity in cortical cell cultures. Biochem Biophys Res Commun. 386, 322-326.

Cheng, G., Yu, Z., Zhou, D. and Mattson, M. P., 2002. Phosphatidylinositol-3-kinase-Akt kinase and p42/p44 mitogen-activated protein kinases mediate neurotrophic and excitoprotective actions of a secreted form of amyloid precursor protein. Exp Neurol. 175, 407-414.

Cherian, L., Hlatky, R. and Robertson, C. S., 2004. Nitric oxide in traumatic brain injury. Brain Pathol. 14, 195-201.

Cherry, J. A. and Davis, R. L., 1999. Cyclic AMP phosphodiesterases are localized in regions of the mouse brain associated with reinforcement, movement, and affect. J Comp Neurol. 407, 287-301.

Choi, D. W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. Neuron. 1, 623-634.

Choi, Y., Kim, H. S., Shin, K. Y., Kim, E. M., Kim, M., Park, C. H., Jeong, Y. H., Yoo, J., Lee, J. P., Chang, K. A., Kim, S. and Suh, Y. H., 2007. Minocycline attenuates neuronal cell death and improves cognitive impairment in Alzheimer's disease models. Neuropsychopharmacology. 32, 2393-2404.

Claasen, A. M., Guevremont, D., Mason-Parker, S. E., Bourne, K., Tate, W. P., Abraham, W. C. and Williams, J. M., 2009. Secreted amyloid precursor protein-alpha upregulates

synaptic protein synthesis by a protein kinase G-dependent mechanism. Neurosci Lett. 460, 92-96.

Clausen, F., Hanell, A., Bjork, M., Hillered, L., Mir, A. K., Gram, H. and Marklund, N., 2009. Neutralization of interleukin-1beta modifies the inflammatory response and improves histological and cognitive outcome following traumatic brain injury in mice. Eur J Neurosci. 30, 385-396.

Clausen, F., Hanell, A., Israelsson, C., Hedin, J., Ebendal, T., Mir, A. K., Gram, H. and Marklund, N., 2011. Neutralization of interleukin-1beta reduces cerebral edema and tissue loss and improves late cognitive outcome following traumatic brain injury in mice. Eur J Neurosci. 34, 110-123.

Clausen, F., Lorant, T., Lewen, A. and Hillered, L., 2007. T lymphocyte trafficking: a novel target for neuroprotection in traumatic brain injury. J Neurotrauma. 24, 1295-1307.

Clausen, T. and Bullock, R., 2001. Medical treatment and neuroprotection in traumatic brain injury. Curr Pharm Des. 7, 1517-1532.

Cockerham, G. C., Goodrich, G. L., Weichel, E. D., Orcutt, J. C., Rizzo, J. F., Bower, K. S. and Schuchard, R. A., 2009. Eye and visual function in traumatic brain injury. J Rehabil Res Dev. 46, 811-818.

Colciaghi, F., Borroni, B., Zimmermann, M., Bellone, C., Longhi, A., Padovani, A., Cattabeni, F., Christen, Y. and Di Luca, M., 2004. Amyloid precursor protein metabolism is regulated toward alpha-secretase pathway by Ginkgo biloba extracts. Neurobiol Dis. 16, 454-460.

Colovic, M. and Caccia, S., 2008. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry of I3,II8-biapigenin, the major biflavone in Hypericum perforatum extracts. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 863, 74-79.

Colton, C. A., 2009. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. J Neuroimmune Pharmacol. 4, 399-418.

Copanaki, E., Chang, S., Vlachos, A., Tschape, J. A., Muller, U. C., Kogel, D. and Deller, T., 2010. sAPPalpha antagonizes dendritic degeneration and neuron death triggered by proteasomal stress. Mol Cell Neurosci. 44, 386-393.

Corrigan, F., Pham, C. L., Vink, R., Blumbergs, P. C., Masters, C. L., van den Heuvel, C. and Cappai, R., 2011. The neuroprotective domains of the amyloid precursor protein, in traumatic brain injury, are located in the two growth factor domains. Brain Res. 1378, 137-143.

Corrigan, F., Vink, R., Blumbergs, P. C., Masters, C. L., Cappai, R. and van den Heuvel, C., 2012a. sAPPalpha rescues deficits in APP knockout mice following focal traumatic brain injury. J Neurochem.

Coste, C., Agar, N., Petitfour, E., Quinette, P., Guillery-Girard, B., Azouvi, P. and Piolino, P., 2011. Exploring the roles of the executive and short-term feature-binding functions in retrieval of retrograde autobiographical memories in severe traumatic brain injury. Cortex. 47, 771-786.

Crack, P. J., Gould, J., Bye, N., Ross, S., Ali, U., Habgood, M. D., Morganti-Kossman, C., Saunders, N. R. and Hertzog, P. J., 2009. The genomic profile of the cerebral cortex after closed head injury in mice: effects of minocycline. J Neural Transm. 116, 1-12.

Csuka, E., Hans, V. H., Ammann, E., Trentz, O., Kossmann, T. and Morganti-Kossmann, M. C., 2000. Cell activation and inflammatory response following traumatic axonal injury in the rat. Neuroreport. 11, 2587-2590.

Cullheim, S. and Thams, S., 2007. The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion. Brain Res Rev. 55, 89-96.

Czeiter, E., Buki, A., Bukovics, P., Farkas, O., Pal, J., Kovesdi, E., Doczi, T. and Sandor, J., 2009. Calpain inhibition reduces axolemmal leakage in traumatic axonal injury. Molecules. 14, 5115-5123.

D'Hulst, C., Atack, J. R. and Kooy, R. F., 2009. The complexity of the GABAA receptor shapes unique pharmacological profiles. Drug Discov Today. 14, 866-875.

David, K. K., Andrabi, S. A., Dawson, T. M. and Dawson, V. L., 2009. Parthanatos, a messenger of death. Front Biosci. 14, 1116-1128.

De Strooper, B., 2003. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. Neuron. 38, 9-12.

De Strooper, B. and Annaert, W., 2000. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. J Cell Sci. 113 (Pt 11), 1857-1870.

Degos, V., Teissier, N., Gressens, P., Puybasset, L. and Mantz, J., 2008. [Inflammation and acute brain injuries in intensive care]. Ann Fr Anesth Reanim. 27, 1008-1015.

Diaz-Rodriguez, E., Cabrera, N., Esparis-Ogando, A., Montero, J. C. and Pandiella, A., 1999. Cleavage of the TrkA neurotrophin receptor by multiple metalloproteases generates signalling-competent truncated forms. Eur J Neurosci. 11, 1421-1430.

Diestel, A., Aktas, O., Hackel, D., Hake, I., Meier, S., Raine, C. S., Nitsch, R., Zipp, F. and Ullrich, O., 2003. Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage. J Exp Med. 198, 1729-1740.

Dietrich, W. D., Truettner, J., Zhao, W., Alonso, O. F., Busto, R. and Ginsberg, M. D., 1999. Sequential changes in glial fibrillary acidic protein and gene expression following parasagittal fluid-percussion brain injury in rats. J Neurotrauma. 16, 567-581.

Diguet, E., Gross, C. E., Tison, F. and Bezard, E., 2004. Rise and fall of minocycline in neuroprotection: need to promote publication of negative results. Exp Neurol. 189, 1-4.

Dockree, P. M. and Robertson, I. H., 2011. Electrophysiological markers of cognitive deficits in traumatic brain injury: a review. Int J Psychophysiol. 82, 53-60.

Dodel, R., Spottke, A., Gerhard, A., Reuss, A., Reinecker, S., Schimke, N., Trenkwalder, C., Sixel-Doring, F., Herting, B., Kamm, C., Gasser, T., Sawires, M., Geser, F., Kollensperger, M., Seppi, K., Kloss, M., Krause, M., Daniels, C., Deuschl, G., Bottger, S., Naumann, M., Lipp, A., Gruber, D., Kupsch, A., Du, Y., Turkheimer, F., Brooks, D. J., Klockgether, T., Poewe, W., Wenning, G., Schade-Brittinger, C., Oertel, W. H. and Eggert, K., 2009. Minocycline 1-year therapy in multiple-system-atrophy: effect on clinical symptoms and [(11)C] (R)-PK11195 PET (MEMSA-trial). Mov Disord. 25, 97-107.

Dommergues, M. A., Plaisant, F., Verney, C. and Gressens, P., 2003. Early microglial activation following neonatal excitotoxic brain damage in mice: a potential target for neuroprotection. Neuroscience. 121, 619-628.

Doty, R. L., 2001. Olfaction. Annu Rev Psychol. 52, 423-452.

Doty, R. L., Yousem, D. M., Pham, L. T., Kreshak, A. A., Geckle, R. and Lee, W. W., 1997. Olfactory dysfunction in patients with head trauma. Arch Neurol. 54, 1131-1140.

Dreymueller, D., Pruessmeyer, J., Groth, E. and Ludwig, A., 2011. The role of ADAM-mediated shedding in vascular biology. Eur J Cell Biol. 91, 472-485.

Drott, J., Desire, L., Drouin, D., Pando, M. and Haun, F., 2010. Etazolate improves performance in a foraging and homing task in aged rats. Eur J Pharmacol. 634, 95-100.

Du, Y., Ma, Z., Lin, S., Dodel, R. C., Gao, F., Bales, K. R., Triarhou, L. C., Chernet, E., Perry, K. W., Nelson, D. L., Luecke, S., Phebus, L. A., Bymaster, F. P. and Paul, S. M., 2001.

Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 98, 14669-14674.

Duffy, M. J., Mullooly, M., O'Donovan, N., Sukor, S., Crown, J., Pierce, A. and McGowan, P. M., 2011. The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer? Clin Proteomics. 8, 9.

Dunston, C. R., Griffiths, H. R., Lambert, P. A., Staddon, S. and Vernallis, A. B., 2010. Proteomic analysis of the anti-inflammatory action of minocycline. Proteomics. 11, 42-51.

Edwards, D. R., Handsley, M. M. and Pennington, C. J., 2008. The ADAM metalloproteinases. Mol Aspects Med. 29, 258-289.

Edwards, D. R., Leco, K. J., Beaudry, P. P., Atadja, P. W., Veillette, C. and Riabowol, K. T., 1996. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in young and old human fibroblasts. Exp Gerontol. 31, 207-223.

Efthimiopoulos, S., Punj, S., Manolopoulos, V., Pangalos, M., Wang, G. P., Refolo, L. M. and Robakis, N. K., 1996. Intracellular cyclic AMP inhibits constitutive and phorbol ester-stimulated secretory cleavage of amyloid precursor protein. J Neurochem. 67, 872-875.

Ehrenreich, H., Hasselblatt, M., Dembowski, C., Cepek, L., Lewczuk, P., Stiefel, M., Rustenbeck, H. H., Breiter, N., Jacob, S., Knerlich, F., Bohn, M., Poser, W., Ruther, E., Kochen, M., Gefeller, O., Gleiter, C., Wessel, T. C., De Ryck, M., Itri, L., Prange, H., Cerami, A., Brines, M. and Siren, A. L., 2002. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. Mol Med. 8, 495-505.

Eikelenboom, P., Veerhuis, R., Familian, A., Hoozemans, J. J., van Gool, W. A. and Rozemuller, A. J., 2008. Neuroinflammation in plaque and vascular beta-amyloid disorders: clinical and therapeutic implications. Neurodegener Dis. 5, 190-193.

Ekdahl, C. T., Claasen, J. H., Bonde, S., Kokaia, Z. and Lindvall, O., 2003. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 100, 13632-13637.

Ekdahl, C. T., Kokaia, Z. and Lindvall, O., 2009. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. Neuroscience. 158, 1021-1029.

Elkabes, S., DiCicco-Bloom, E. M. and Black, I. B., 1996. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. J Neurosci. 16, 2508-2521.

Ennaceur, A. and Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. Behav Brain Res. 31, 47-59.

Epis, R., Marcello, E., Gardoni, F., Vastagh, C., Malinverno, M., Balducci, C., Colombo, A., Borroni, B., Vara, H., Dell'Agli, M., Cattabeni, F., Giustetto, M., Borsello, T., Forloni, G., Padovani, A. and Di Luca, M., 2010. Blocking ADAM10 synaptic trafficking generates a model of sporadic Alzheimer's disease. Brain. 133, 3323-3335.

Etcheberrigaray, R., Tan, M., Dewachter, I., Kuiperi, C., Van der Auwera, I., Wera, S., Qiao, L., Bank, B., Nelson, T. J., Kozikowski, A. P., Van Leuven, F. and Alkon, D. L., 2004. Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 101, 11141-11146.

Faden, A. I., 2002. Neuroprotection and traumatic brain injury: theoretical option or realistic proposition. Curr Opin Neurol. 15, 707-712.

Faden, A. I., Demediuk, P., Panter, S. S. and Vink, R., 1989. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. Science. 244, 798-800.

Fahrenholz, F., 2007. Alpha-secretase as a therapeutic target. Curr Alzheimer Res. 4, 412-417.

Fahrenholz, F. and Postina, R., 2006. Alpha-secretase activation--an approach to Alzheimer's disease therapy. Neurodegener Dis. 3, 255-261.

Fambrough, D. and Goodman, C. S., 1996. The Drosophila beaten path gene encodes a novel secreted protein that regulates defasciculation at motor axon choice points. Cell. 87, 1049-1058.

Fan, L., Young, P. R., Barone, F. C., Feuerstein, G. Z., Smith, D. H. and McIntosh, T. K., 1995. Experimental brain injury induces expression of interleukin-1 beta mRNA in the rat brain. Brain Res Mol Brain Res. 30, 125-130.

Fan, L. W., Pang, Y., Lin, S., Rhodes, P. G. and Cai, Z., 2005. Minocycline attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. Neuroscience. 133, 159-168.

Farkas, O. and Povlishock, J. T., 2007. Cellular and subcellular change evoked by diffuse traumatic brain injury: a complex web of change extending far beyond focal damage. Prog Brain Res. 161, 43-59.

Farrant, M. and Kaila, K., 2007. The cellular, molecular and ionic basis of GABA(A) receptor signalling. Prog Brain Res. 160, 59-87.

Farzan, M., Schnitzler, C. E., Vasilieva, N., Leung, D. and Choe, H., 2000. BACE2, a beta - secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 9712-9717.

Faulkner, J. R., Herrmann, J. E., Woo, M. J., Tansey, K. E., Doan, N. B. and Sofroniew, M. V., 2004. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. J Neurosci. 24, 2143-2155.

Fedak, P. W., Moravec, C. S., McCarthy, P. M., Altamentova, S. M., Wong, A. P., Skrtic, M., Verma, S., Weisel, R. D. and Li, R. K., 2006. Altered expression of disintegrin metalloproteinases and their inhibitor in human dilated cardiomyopathy. Circulation. 113, 238-245.

Fee, D., Crumbaugh, A., Jacques, T., Herdrich, B., Sewell, D., Auerbach, D., Piaskowski, S., Hart, M. N., Sandor, M. and Fabry, Z., 2003. Activated/effector CD4+ T cells exacerbate acute damage in the central nervous system following traumatic injury. J Neuroimmunol. 136, 54-66.

Fei, Z., Zhang, X., Bai, H. M., Jiang, X. F., Li, X., Zhang, W. and Hu, W., 2007. Posttraumatic secondary brain insults exacerbates neuronal injury by altering metabotropic glutamate receptors. BMC Neurosci. 8, 96.

Fernandez, S. P. and Gaspar, P., 2012. Investigating anxiety and depressive-like phenotypes in genetic mouse models of serotonin depletion. Neuropharmacology. 62, 144-154.

Ferretti, M. T., Allard, S., Partridge, V., Ducatenzeiler, A. and Cuello, A. C., 2012. Minocycline corrects early, pre-plaque neuroinflammation and inhibits BACE-1 in a transgenic model of Alzheimer's disease-like amyloid pathology. J Neuroinflammation. 9, 62.

Festoff, B. W., Ameenuddin, S., Arnold, P. M., Wong, A., Santacruz, K. S. and Citron, B. A., 2006. Minocycline neuroprotects, reduces microgliosis, and inhibits caspase protease expression early after spinal cord injury. J Neurochem. 97, 1314-1326.

Filipovic, R. and Zecevic, N., 2008. Neuroprotective role of minocycline in co-cultures of human fetal neurons and microglia. Exp Neurol. 211, 41-51.

Fleminger, S., 2008. Long-term psychiatric disorders after traumatic brain injury. Eur J Anaesthesiol Suppl. 42, 123-130.

Flierl, M. A., Stahel, P. F., Beauchamp, K. M., Morgan, S. J., Smith, W. R. and Shohami, E., 2009. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. Nat Protoc. 4, 1328-1337.

Fogal, B. and Hewett, S. J., 2008. Interleukin-1beta: a bridge between inflammation and excitotoxicity? J Neurochem. 106, 1-23.

Folkerts, M. M., Berman, R. F., Muizelaar, J. P. and Rafols, J. A., 1998. Disruption of MAP-2 immunostaining in rat hippocampus after traumatic brain injury. J Neurotrauma. 15, 349-363.

Fortin, A., Lefebvre, M. B. and Ptito, M., 2010. Traumatic brain injury and olfactory deficits: the tale of two smell tests! Brain Inj. 24, 27-33.

Franciosi, S., Ryu, J. K., Choi, H. B., Radov, L., Kim, S. U. and McLarnon, J. G., 2006. Broad-spectrum effects of 4-aminopyridine to modulate amyloid beta1-42-induced cell signaling and functional responses in human microglia. J Neurosci. 26, 11652-11664.

Fujii, M., Fukazawa, K., Takayasu, S. and Sakagami, M., 2002. Olfactory dysfunction in patients with head trauma. Auris Nasus Larynx. 29, 35-40.

Furukawa, K., Barger, S. W., Blalock, E. M. and Mattson, M. P., 1996. Activation of K+ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. Nature. 379, 74-78.

Furukawa, K. and Mattson, M. P., 1998. Secreted amyloid precursor protein alpha selectively suppresses N-methyl-D-aspartate currents in hippocampal neurons: involvement of cyclic GMP. Neuroscience. 83, 429-438.

Furukawa, K., Sopher, B. L., Rydel, R. E., Begley, J. G., Pham, D. G., Martin, G. M., Fox, M. and Mattson, M. P., 1996. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. J Neurochem. 67, 1882-1896.

Gahm, C., Holmin, S. and Mathiesen, T., 2000. Temporal profiles and cellular sources of three nitric oxide synthase isoforms in the brain after experimental contusion. Neurosurgery. 46, 169-177.

Gakhar-Koppole, N., Hundeshagen, P., Mandl, C., Weyer, S. W., Allinquant, B., Muller, U. and Ciccolini, F., 2008. Activity requires soluble amyloid precursor protein alpha to promote neurite outgrowth in neural stem cell-derived neurons via activation of the MAPK pathway. Eur J Neurosci. 28, 871-882.

Gallagher, C. N., Hutchinson, P. J. and Pickard, J. D., 2007. Neuroimaging in trauma. Curr Opin Neurol. 20, 403-409.

Gao, Y., Nikulina, E., Mellado, W. and Filbin, M. T., 2003. Neurotrophins elevate cAMP to reach a threshold required to overcome inhibition by MAG through extracellular signal-regulated kinase-dependent inhibition of phosphodiesterase. J Neurosci. 23, 11770-11777.

Garcia-Martinez, E. M., Sanz-Blasco, S., Karachitos, A., Bandez, M. J., Fernandez-Gomez, F. J., Perez-Alvarez, S., de Mera, R. M., Jordan, M. J., Aguirre, N., Galindo, M. F., Villalobos, C., Navarro, A., Kmita, H. and Jordan, J., 2010. Mitochondria and calcium flux as targets of neuroprotection caused by minocycline in cerebellar granule cells. Biochem Pharmacol. 79, 239-250.

Garton, K. J., Gough, P. J., Philalay, J., Wille, P. T., Blobel, C. P., Whitehead, R. H., Dempsey, P. J. and Raines, E. W., 2003. Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17). J Biol Chem. 278, 37459-37464.

Gentleman, S. M., Nash, M. J., Sweeting, C. J., Graham, D. I. and Roberts, G. W., 1993. Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury. Neurosci Lett. 160, 139-144.

Gieseler, A., Schultze, A. T., Kupsch, K., Haroon, M. F., Wolf, G., Siemen, D. and Kreutzmann, P., 2009. Inhibitory modulation of the mitochondrial permeability transition

by minocycline. Biochem Pharmacol. 77, 888-896.

Giorgi, C., Baldassari, F., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Marchi, S., Missiroli, S., Patergnani, S., Rimessi, A., Suski, J. M., Wieckowski, M. R. and Pinton, P., 2012. Mitochondrial Ca(2+) and apoptosis. Cell Calcium.

Giulian, D., Baker, T. J., Shih, L. C. and Lachman, L. B., 1986. Interleukin 1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia. J Exp Med. 164, 594-604.

Glass, W. F., 2nd and Moore, J. B., Jr., 1979. Inhibition of human lung cyclic GMP and cyclic AMP phosphodiesterases by certain nucleosides, nucleotides, and pharmacological phosphodiesterase inhibitors. Biochem Pharmacol. 28, 1107-1112.

Gong, B., Vitolo, O. V., Trinchese, F., Liu, S., Shelanski, M. and Arancio, O., 2004. Persistent improvement in synaptic and cognitive functions in an Alzheimer mouse model after rolipram treatment. J Clin Invest. 114, 1624-1634.

Gonzalez, J. C., Egea, J., Del Carmen Godino, M., Fernandez-Gomez, F. J., Sanchez-Prieto, J., Gandia, L., Garcia, A. G., Jordan, J. and Hernandez-Guijo, J. M., 2007. Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca(2+) signalling in hippocampal neurons. Eur J Neurosci. 26, 2481-2495.

Goodman, Y. and Mattson, M. P., 1994. Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide-induced oxidative injury. Exp Neurol. 128, 1-12.

Gordon, P. H., Cheung, Y. K., Levin, B., Andrews, H., Doorish, C., Macarthur, R. B., Montes, J., Bednarz, K., Florence, J., Rowin, J., Boylan, K., Mozaffar, T., Tandan, R., Mitsumoto, H., Kelvin, E. A., Chapin, J., Bedlack, R., Rivner, M., McCluskey, L. F., Pestronk, A., Graves, M., Sorenson, E. J., Barohn, R. J., Belsh, J. M., Lou, J. S., Levine, T., Saperstein, D., Miller, R. G. and Scelsa, S. N., 2008. A novel, efficient, randomized selection trial comparing combinations of drug therapy for ALS. Amyotroph Lateral Scler. 9, 212-222.

Graham, D. I., Ford, I., Adams, J. H., Doyle, D., Teasdale, G. M., Lawrence, A. E. and McLellan, D. R., 1989. Ischaemic brain damage is still common in fatal non-missile head injury. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 52, 346-350.

Gralle, M., Botelho, M. G. and Wouters, F. S., 2009. Neuroprotective secreted amyloid precursor protein acts by disrupting amyloid precursor protein dimers. J Biol Chem. 284, 15016-15025.

Graziani, G. and Szabo, C., 2005. Clinical perspectives of PARP inhibitors. Pharmacol Res. 52, 109-118.

Greenberg, S. M., Qiu, W. Q., Selkoe, D. J., Ben-Itzhak, A. and Kosik, K. S., 1995. Amino-terminal region of the beta-amyloid precursor protein activates mitogen-activated protein kinase. Neurosci Lett. 198, 52-56.

Guimaraes, J. S., Freire, M. A., Lima, R. R., Picanco-Diniz, C. W., Pereira, A. and Gomes-Leal, W., 2010. Minocycline treatment reduces white matter damage after excitotoxic striatal injury. Brain Res. 1329, 182-193.

Guo, G. and Bhat, N. R., 2007. p38alpha MAP kinase mediates hypoxia-induced motor neuron cell death: a potential target of minocycline's neuroprotective action. Neurochem Res. 32, 2160-2166.

Guo, Q., Robinson, N. and Mattson, M. P., 1998. Secreted beta-amyloid precursor protein counteracts the proapoptotic action of mutant presenilin-1 by activation of NF-kappaB and stabilization of calcium homeostasis. J Biol Chem. 273, 12341-12351.

Guo, Z., Cupples, L. A., Kurz, A., Auerbach, S. H., Volicer, L., Chui, H., Green, R. C., Sadovnick, A. D., Duara, R., DeCarli, C., Johnson, K., Go, R. C., Growdon, J. H.,

Haines, J. L., Kukull, W. A. and Farrer, L. A., 2000. Head injury and the risk of AD in the MIRAGE study. Neurology. 54, 1316-1323.

Gutierrez, E., Huang, Y., Haglid, K., Bao, F., Hansson, H. A., Hamberger, A. and Viano, D., 2001. A new model for diffuse brain injury by rotational acceleration: I model, gross appearance, and astrocytosis. J Neurotrauma. 18, 247-257.

Hailer, N. P., 2008. Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: it is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells. Prog Neurobiol. 84, 211-233.

Hall, E. D., Vaishnav, R. A. and Mustafa, A. G., 2011. Antioxidant therapies for traumatic brain injury. Neurotherapeutics. 7, 51-61.

Han, C. Y. and Backous, D. D., 2005. Basic principles of cerebrospinal fluid metabolism and intracranial pressure homeostasis. Otolaryngol Clin North Am. 38, 569-576.

Hanisch, U. K., van Rossum, D., Xie, Y., Gast, K., Misselwitz, R., Auriola, S., Goldsteins, G., Koistinaho, J., Kettenmann, H. and Moller, T., 2004. The microglia-activating potential of thrombin: the protease is not involved in the induction of proinflammatory cytokines and chemokines. J Biol Chem. 279, 51880-51887.

Hannila, S. S. and Filbin, M. T., 2008. The role of cyclic AMP signaling in promoting axonal regeneration after spinal cord injury. Exp Neurol. 209, 321-332.

Haorah, J., Ramirez, S. H., Schall, K., Smith, D., Pandya, R. and Persidsky, Y., 2007. Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. J Neurochem. 101, 566-576.

Hartlage-Rubsamen, M., Zeitschel, U., Apelt, J., Gartner, U., Franke, H., Stahl, T., Gunther, A., Schliebs, R., Penkowa, M., Bigl, V. and Rossner, S., 2003. Astrocytic expression of the Alzheimer's disease beta-secretase (BACE1) is stimulus-dependent. Glia. 41, 169-179.

Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Lena Illert, A., von Figura, K. and Saftig, P., 2002. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. Hum Mol Genet. 11, 2615-2624.

Hatton, J., 2001. Pharmacological treatment of traumatic brain injury: a review of agents in development. CNS Drugs. 15, 553-581.

Hausmann, R., Kaiser, A., Lang, C., Bohnert, M. and Betz, P., 1999. A quantitative immunohistochemical study on the time-dependent course of acute inflammatory cellular response to human brain injury. Int J Legal Med. 112, 227-232.

Haxel, B. R., Grant, L. and Mackay-Sim, A., 2008. Olfactory dysfunction after head injury. J Head Trauma Rehabil. 23, 407-413.

He, Y., Appel, S. and Le, W., 2001. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. Brain Res. 909, 187-193.

Hellal, F., Pruneau, D., Palmier, B., Faye, P., Croci, N., Plotkine, M. and Marchand-Verrecchia, C., 2003. Detrimental role of bradykinin B2 receptor in a murine model of diffuse brain injury. J Neurotrauma. 20, 841-851.

Helmy, A., Carpenter, K. L., Menon, D. K., Pickard, J. D. and Hutchinson, P. J., 2011. The cytokine response to human traumatic brain injury: temporal profiles and evidence for cerebral parenchymal production. J Cereb Blood Flow Metab. 31, 658-670.

Henkel, J. S., Beers, D. R., Zhao, W. and Appel, S. H., 2009. Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. J Neuroimmune Pharmacol. 4, 389-398.

Hirao, T., Nanba, D., Tanaka, M., Ishiguro, H., Kinugasa, Y., Doki, Y., Yano, M., Matsuura, N., Monden, M. and Higashiyama, S., 2006. Overexpression of ADAM9 enhances growth f actor-mediated recycling of E-cadherin in human colon cancer cell line HT29 cells. Exp Cell Res. 312, 331-339.

Hlatky, R., Contant, C. F., Diaz-Marchan, P., Valadka, A. B. and Robertson, C. S., 2004. Significance of a reduced cerebral blood flow during the first 12 hours after traumatic brain injury. Neurocrit Care. 1, 69-83.

Holbrook, E. H. and Leopold, D. A., 2006. An updated review of clinical olfaction. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 14, 23-28.

Holmin, S. and Mathiesen, T., 2000. Intracerebral administration of interleukin-1beta and induction of inflammation, apoptosis, and vasogenic edema. J Neurosurg. 92, 108-120.

Holmin, S., Mathiesen, T., Shetye, J. and Biberfeld, P., 1995. Intracerebral inflammatory response to experimental brain contusion. Acta Neurochir (Wien). 132, 110-119.

Homsi S, 2010. Inhibition de l'activation microgliale: une nouvelle stratégie neuroprotectrice pour le traitement du traumatisme crânien. Thèse de Doctorat d'Université Pairs Descartes, Ecole Doctorale du Médicament.

Homsi, S., Federico, F., Croci, N., Palmier, B., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C. and Jafarian-Tehrani, M., 2009. Minocycline effects on cerebral edema: relations with inflammatory and oxidative stress markers following traumatic brain injury in mice. Brain Res. 1291, 122-132.

Homsi, S., Piaggio, T., Croci, N., Noble, F., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C. and Jafarian-Tehrani, M., 2010. Blockade of acute microglial activation by minocycline promotes neuroprotection and reduces locomotor hyperactivity after closed head injury in mice: a twelve-week follow-up study. J Neurotrauma. 27, 911-921.

Hou, Y., Yu, Y. B., Liu, G. and Luo, Y., 2009. A natural squamosamide derivative FLZ reduces amyloid-beta production by increasing non-amyloidogenic AbetaPP processing. J Alzheimers Dis. 18, 153-165.

Houslay, M. D. and Adams, D. R., 2003. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. Biochem J. 370, 1-18.

Houslay, M. D., Schafer, P. and Zhang, K. Y., 2005. Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. Drug Discov Today. 10, 1503-1519.

Howland, D. S., Trusko, S. P., Savage, M. J., Reaume, A. G., Lang, D. M., Hirsch, J. D., Maeda, N., Siman, R., Greenberg, B. D., Scott, R. W. and Flood, D. G., 1998. Modulation of secreted beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in brain by cholesterol. J Biol Chem. 273, 16576-16582.

Huang, W. C., Qiao, Y., Xu, L., Kacimi, R., Sun, X., Giffard, R. G. and Yenari, M. A., 2010. Direct protection of cultured neurons from ischemia-like injury by minocycline. Anat Cell Biol. 43, 325-331.

Hulley, P., Hartikka, J., Abdel'Al, S., Engels, P., Buerki, H. R., Wiederhold, K. H., Muller, T., Kelly, P., Lowe, D. and Lubbert, H., 1995. Inhibitors of type IV phosphodiesterases reduce the toxicity of MPTP in substantia nigra neurons in vivo. Eur J Neurosci. 7, 2431-2440.

Huse, J. T., Liu, K., Pijak, D. S., Carlin, D., Lee, V. M. and Doms, R. W., 2002. Beta-secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain. J Biol Chem. 277, 16278-16284.

Hutchinson, P. J., O'Connell, M. T., Rothwell, N. J., Hopkins, S. J., Nortje, J., Carpenter, K. L., Timofeev, I., Al-Rawi, P. G., Menon, D. K. and Pickard, J. D., 2007. Inflammation in

human brain injury: intracerebral concentrations of IL-1alpha, IL-1beta, and their endogenous inhibitor IL-1ra. J Neurotrauma. 24, 1545-1557.

Ibarra, A. and Diaz-Ruiz, A., 2006. Protective effect of cyclosporin-A in spinal cord injury: an overview. Curr Med Chem. 13, 2703-2710.

Ikin, A. F., Sabo, S. L., Lanier, L. M. and Buxbaum, J. D., 2007. A macromolecular complex involving the amyloid precursor protein (APP) and the cytosolic adapter FE65 is a negative regulator of axon branching. Mol Cell Neurosci. 35, 57-63.

Ikonomovic, M. D., Uryu, K., Abrahamson, E. E., Ciallella, J. R., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., Clark, R. S., Marion, D. W., Wisniewski, S. R. and DeKosky, S. T., 2004. Alzheimer's pathology in human temporal cortex surgically excised after severe brain injury. Exp Neurol. 190, 192-203.

Imbrosci, B. and Mittmann, T., 2011. Functional consequences of the disturbances in the GABA-mediated inhibition induced by injuries in the cerebral cortex. Neural Plast. 2011, 614329.

Ingebretsen, C., Clark, J. F., Allen, D. O. and Ashmore, J., 1974. Effect of glucagon, dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and phosphodiesterase inhibitors on rat liver phosphorylase activity and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate levels. Biochem Pharmacol. 23, 2139-2146.

Israelsson, C., Bengtsson, H., Kylberg, A., Kullander, K., Lewen, A., Hillered, L. and Ebendal, T., 2008. Distinct cellular patterns of upregulated chemokine expression supporting a prominent inflammatory role in traumatic brain injury. J Neurotrauma. 25, 959-974.

Itoh, T., Tokumura, M. and Abe, K., 2004. Effects of rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, in combination with imipramine on depressive behavior, CRE-binding activity and BDNF level in learned helplessness rats. Eur J Pharmacol. 498, 135-142.

Iwatsubo, T., Mann, D. M., Odaka, A., Suzuki, N. and Ihara, Y., 1995. Amyloid beta protein (A beta) deposition: A beta 42(43) precedes A beta 40 in Down syndrome. Ann Neurol. 37, 294-299.

Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S. and Mekada, E., 1998. A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. Embo J. 17, 7260-7272.

Jacobs, R. S. and McNiece, D. M., 1977. Motor nerve terminal facilitatory action of SQ 20009: an inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase. J Pharmacol Exp Ther. 202, 404-410.

Jafarian-Tehrani, M., Louin, G., Royo, N. C., Besson, V. C., Bohme, G. A., Plotkine, M. and Marchand-Verrecchia, C., 2005. 1400W, a potent selective inducible NOS inhibitor, improves histopathological outcome following traumatic brain injury in rats. Nitric Oxide. 12, 61-69.

Jennett, B., Snoek, J., Bond, M. R. and Brooks, N., 1981. Disability after severe head injury: observations on the use of the Glasgow Outcome Scale. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 44, 285-293.

Jiang, R. S., Wu, S. H., Liang, K. L., Shiao, J. Y., Hsin, C. H. and Su, M. C., 2010. Steroid treatment of posttraumatic anosmia. Eur Arch Otorhinolaryngol. 267, 1563-1567.

Jin, L. W., Ninomiya, H., Roch, J. M., Schubert, D., Masliah, E., Otero, D. A. and Saitoh, T., 1994. Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension. J Neurosci. 14, 5461-5470.

John, V., Beck, J. P., Bienkowski, M. J., Sinha, S. and Heinrikson, R. L., 2003. Human beta-secretase (BACE) and BACE inhibitors. J Med Chem. 46, 4625-4630.

Johnson, V. E., Stewart, W. and Smith, D. H., 2010. Traumatic brain injury and amyloid-beta pathology: a link to Alzheimer's disease? Nat Rev Neurosci. 11, 361-370.

Jorissen, E., Prox, J., Bernreuther, C., Weber, S., Schwanbeck, R., Serneels, L., Snellinx, A., Craessaerts, K., Thathiah, A., Tesseur, I., Bartsch, U., Weskamp, G., Blobel, C. P., Glatzel, M., De Strooper, B. and Saftig, P., 2010. The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. J Neurosci. 30, 4833-4844.

Kalvodova, L., Kahya, N., Schwille, P., Ehehalt, R., Verkade, P., Drechsel, D. and Simons, K., 2005. Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro. J Biol Chem. 280, 36815-36823.

Kaminska, B., Gaweda-Walerych, K. and Zawadzka, M., 2004. Molecular mechanisms of neuroprotective action of immunosuppressants--facts and hypotheses. J Cell Mol Med. 8, 45-58.

Kamm, K., Vanderkolk, W., Lawrence, C., Jonker, M. and Davis, A. T., 2006. The effect of traumatic brain injury upon the concentration and expression of interleukin-1beta and interleukin-10 in the rat. J Trauma. 60, 152-157.

Kang, H. M., Jin, J., Lee, S., Ryu, J. and Park, C., 2010. A novel method for olfactory bulbectomy using photochemically induced lesion. Neuroreport. 21, 179-184.

Kazanis, I., 2005. CNS injury research; reviewing the last decade: methodological errors and a proposal for a new strategy. Brain Res Brain Res Rev. 50, 377-386.

Kelso, M. L., Scheff, N. N., Scheff, S. W. and Pauly, J. R., 2011. Melatonin and minocycline for combinatorial therapy to improve functional and histopathological deficits following traumatic brain injury. Neurosci Lett. 488, 60-64.

Kelts, E. A., 2010. Traumatic brain injury and visual dysfunction: a limited overview. NeuroRehabilitation. 27, 223-229.

Kenne, E., Erlandsson, A., Lindbom, L., Hillered, L. and Clausen, F., 2012. Neutrophil depletion reduces edema formation and tissue loss following traumatic brain injury in mice. J Neuroinflammation. 9, 17.

Kermer, P., Klocker, N. and Bahr, M., 1999. Neuronal death after brain injury. Models, mechanisms, and therapeutic strategies in vivo. Cell Tissue Res. 298, 383-395.

Kim, E., 2002. Agitation, aggression, and disinhibition syndromes after traumatic brain injury. NeuroRehabilitation. 17, 297-310.

Kim, H. S. and Suh, Y. H., 2009. Minocycline and neurodegenerative diseases. Behav Brain Res. 196, 168-179.

Kim, J. H. and Kim, H. J., 2005. Direct involvement of G protein alpha(q/11) subunit in regulation of muscarinic receptor-mediated sAPPalpha release. Arch Pharm Res. 28, 1275-1281.

Kim, S. S., Kong, P. J., Kim, B. S., Sheen, D. H., Nam, S. Y. and Chun, W., 2004. Inhibitory action of minocycline on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide and prostaglandin E2 in BV2 microglial cells. Arch Pharm Res. 27, 314-318.

Kinnunen, K. M., Greenwood, R., Powell, J. H., Leech, R., Hawkins, P. C., Bonnelle, V., Patel, M. C., Counsell, S. J. and Sharp, D. J., 2011. White matter damage and cognitive impairment after traumatic brain injury. Brain. 134, 449-463.

Knoblach, S. M., Fan, L. and Faden, A. I., 1999. Early neuronal expression of tumor necrosis factor-alpha after experimental brain injury contributes to neurological impairment. J

Neuroimmunol. 95, 115-125.

Kobayashi, M. and Costanzo, R. M., 2009. Olfactory nerve recovery following mild and severe injury and the efficacy of dexamethasone treatment. Chem Senses. 34, 573-580.

Kobori, N., Clifton, G. L. and Dash, P., 2002. Altered expression of novel genes in the cerebral cortex following experimental brain injury. Brain Res Mol Brain Res. 104, 148-158.

Kogel, D., Deller, T. and Behl, C., 2011. Roles of amyloid precursor protein family members in neuroprotection, stress signaling and aging. Exp Brain Res. 217, 471-479.

Kogel, D., Schomburg, R., Copanaki, E. and Prehn, J. H., 2005. Regulation of gene expression by the amyloid precursor protein: inhibition of the JNK/c-Jun pathway. Cell Death Differ. 12, 1-9.

Koistinaho, M., Malm, T. M., Kettunen, M. I., Goldsteins, G., Starckx, S., Kauppinen, R. A., Opdenakker, G. and Koistinaho, J., 2005. Minocycline protects against permanent cerebral ischemia in wild type but not in matrix metalloprotease-9-deficient mice. J Cereb Blood Flow Metab. 25, 460-467.

Kojro, E., Postina, R., Buro, C., Meiringer, C., Gehrig-Burger, K. and Fahrenholz, F., 2006. The neuropeptide PACAP promotes the alpha-secretase pathway for processing the Alzheimer amyloid precursor protein. Faseb J. 20, 512-514.

Kondo, K., Maruishi, M., Ueno, H., Sawada, K., Hashimoto, Y., Ohshita, T., Takahashi, T., Ohtsuki, T. and Matsumoto, M., 2010. The pathophysiology of prospective memory failure after diffuse axonal injury--lesion-symptom analysis using diffusion tensor imaging. BMC Neurosci. 11, 147.

Korpi, E. R., Grunder, G. and Luddens, H., 2002. Drug interactions at GABA(A) receptors. Prog Neurobiol. 67, 113-159.

Kossmann, T., Hans, V., Imhof, H. G., Trentz, O. and Morganti-Kossmann, M. C., 1996. Interleukin-6 released in human cerebrospinal fluid following traumatic brain injury may trigger nerve growth factor production in astrocytes. Brain Res. 713, 143-152.

Kossmann, T., Stahel, P. F., Lenzlinger, P. M., Redl, H., Dubs, R. W., Trentz, O., Schlag, G. and Morganti-Kossmann, M. C., 1997. Interleukin-8 released into the cerebrospinal fluid after brain injury is associated with blood-brain barrier dysfunction and nerve growth factor production. J Cereb Blood Flow Metab. 17, 280-289.

Kostrzewa, R. M., Brus, R., Kalbfleisch, J. H., Perry, K. W. and Fuller, R. W., 1994. Proposed animal model of attention deficit hyperactivity disorder. Brain Res Bull. 34, 161-167.

Kovesdi, E., Bukovics, P., Besson, V., Nyiradi, J., Luckl, J., Pal, J., Sumegi, B., Doczi, T., Hernadi, I. and Buki, A., 2010. A novel PARP inhibitor L-2286 in a rat model of impact acceleration head injury: An immunohistochemical and behavioral study. Int J Mol Sci. 11, 1253-1268.

Kraus, M. F., Susmaras, T., Caughlin, B. P., Walker, C. J., Sweeney, J. A. and Little, D. M., 2007. White matter integrity and cognition in chronic traumatic brain injury: a diffusion tensor imaging study. Brain. 130, 2508-2519.

Kraus, R. L., Pasieczny, R., Lariosa-Willingham, K., Turner, M. S., Jiang, A. and Trauger, J. W., 2005. Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. J Neurochem. 94, 819-827.

Kremlev, S. G., Roberts, R. L. and Palmer, C., 2007. Minocycline modulates chemokine receptors but not interleukin-10 mRNA expression in hypoxic-ischemic neonatal rat brain. J Neurosci Res. 85, 2450-2459.

Kreutzberg, G. W., 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci. 19, 312-318.

Kriz, J., Nguyen, M. D. and Julien, J. P., 2002. Minocycline slows disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Dis. 10, 268-278.

Kuhn, P. H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J. W., Kremmer, E., Rossner, S. and Lichtenthaler, S. F., 2010. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. Embo J. 29, 3020-3032.

Kuno, R., Yoshida, Y., Nitta, A., Nabeshima, T., Wang, J., Sonobe, Y., Kawanokuchi, J., Takeuchi, H., Mizuno, T. and Suzumura, A., 2006. The role of TNF-alpha and its receptors in the production of NGF and GDNF by astrocytes. Brain Res. 1116, 12-18.

Kupsch, K., Hertel, S., Kreutzmann, P., Wolf, G., Wallesch, C. W., Siemen, D. and Schonfeld, P., 2009. Impairment of mitochondrial function by minocycline. Febs J. 276, 1729-1738.

LaFerla, F. M., 2002. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. Nat Rev Neurosci. 3, 862-872.

Lafont, F., Rouget, M., Triller, A., Prochiantz, A. and Rousselet, A., 1992. In vitro control of neuronal polarity by glycosaminoglycans. Development. 114, 17-29.

Laird, M. D., Vender, J. R. and Dhandapani, K. M., 2008. Opposing roles for reactive astrocytes following traumatic brain injury. Neurosignals. 16, 154-164.

Lambert, D. W., Yarski, M., Warner, F. J., Thornhill, P., Parkin, E. T., Smith, A. I., Hooper, N. M. and Turner, A. J., 2005. Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). J Biol Chem. 280, 30113-30119.

Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C. and Fahrenholz, F., 1999. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. Proc Natl Acad Sci U S A. 96, 3922-3927.

Landis, B. N. and Lacroix, J. S., 2006. Postoperative/posttraumatic gustatory dysfunction. Adv Otorhinolaryngol. 63, 242-254.

Lannfelt, L., Basun, H., Wahlund, L. O., Rowe, B. A. and Wagner, S. L., 1995. Decreased alpha-secretase-cleaved amyloid precursor protein as a diagnostic marker for Alzheimer's disease. Nat Med. 1, 829-832.

LaPlaca, M. C., Simon, C. M., Prado, G. R. and Cullen, D. K., 2007. CNS injury biomechanics and experimental models. Prog Brain Res. 161, 13-26.

Lazarini, F., Gabellec, M. M., Torquet, N. and Lledo, P. M., 2012. Early activation of microglia triggers long-lasting impairment of adult neurogenesis in the olfactory bulb. J Neurosci. 32, 3652-3664.

Lechpammer, M., Manning, S. M., Samonte, F., Nelligan, J., Sabo, E., Talos, D. M., Volpe, J. J. and Jensen, F. E., 2008. Minocycline treatment following hypoxic/ischaemic injury attenuates white matter injury in a rodent model of periventricular leucomalacia. Neuropathol Appl Neurobiol. 34, 379-393.

Lee, B. Y., Ban, J. Y. and Seong, Y. H., 2005. Chronic stimulation of GABAA receptor with muscimol reduces amyloid beta protein (25-35)-induced neurotoxicity in cultured rat cortical cells. Neurosci Res. 52, 347-356.

Lee, M., McGeer, E. G. and McGeer, P. L., 2011a. Mechanisms of GABA release from human astrocytes. Glia. 59, 1600-1611.

Lee, M., Schwab, C. and McGeer, P. L., 2011b. Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. Glia. 59, 152-165.

Leeb-Lundberg, F., Snowman, A. and Olsen, R. W., 1981. Interaction of anticonvulsants with the barbiturate-benzodiazepine-GABA receptor complex. Eur J Pharmacol. 72, 125-129.

Lemere, C. A., Blusztajn, J. K., Yamaguchi, H., Wisniewski, T., Saido, T. C. and Selkoe, D. J., 1996. Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. Neurobiol Dis. 3, 16-32.

Lenzlinger, P. M., Hans, V. H., Joller-Jemelka, H. I., Trentz, O., Morganti-Kossmann, M. C. and Kossmann, T., 2001. Markers for cell-mediated immune response are elevated in cerebrospinal fluid and serum after severe traumatic brain injury in humans. J Neurotrauma. 18, 479-489.

Lescot, T., Fulla-Oller, L., Palmier, B., Po, C., Beziaud, T., Puybasset, L., Plotkine, M., Gillet, B., Meric, P. and Marchand-Leroux, C., 2010b. Effect of acute poly(ADP-ribose) polymerase inhibition by 3-AB on blood-brain barrier permeability and edema formation after focal traumatic brain injury in rats. J Neurotrauma. 27, 1069-1079.

Lescot, T., Fulla-Oller, L., Po, C., Chen, X. R., Puybasset, L., Gillet, B., Plotkine, M., Meric, P. and Marchand-Leroux, C., 2010a. Temporal and regional changes after focal traumatic brain injury. J Neurotrauma. 27, 85-94.

Lesne, S., Ali, C., Gabriel, C., Croci, N., MacKenzie, E. T., Glabe, C. G., Plotkine, M., Marchand-Verrecchia, C., Vivien, D. and Buisson, A., 2005. NMDA receptor activation inhibits alpha-secretase and promotes neuronal amyloid-beta production. J Neurosci. 25, 9367-9377.

Leuchtenberger, S., Maler, J., Czirr, E., Ness, J., Lichtenthaler, S. F., Esselmann, H., Pietrzik, C. U., Wiltfang, J. and Weggen, S., 2009. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and ectodomain shedding of the amyloid precursor protein. Neurodegener Dis. 6, 1-8.

Levin, H. S., Williams, D. H., Valastro, M., Eisenberg, H. M., Crofford, M. J. and Handel, S. F., 1990. Corpus callosal atrophy following closed head injury: detection with magnetic resonance imaging. J Neurosurg. 73, 77-81.

Li, H. and Prince, D. A., 2002. Synaptic activity in chronically injured, epileptogenic sensory-motor neocortex. J Neurophysiol. 88, 2-12.

Li, X. Y. and Feng, D. F., 2009. Diffuse axonal injury: novel insights into detection and treatment. J Clin Neurosci. 16, 614-619.

Lin, S., Wei, X., Xu, Y., Yan, C., Dodel, R., Zhang, Y., Liu, J., Klaunig, J. E., Farlow, M. and Du, Y., 2003. Minocycline blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity and free radical production in rat cerebellar granule neurons. Life Sci. 72, 1635-1641.

Lin, S., Zhang, Y., Dodel, R., Farlow, M. R., Paul, S. M. and Du, Y., 2001. Minocycline blocks nitric oxide-induced neurotoxicity by inhibition p38 MAP kinase in rat cerebellar granule neurons. Neurosci Lett. 315, 61-64.

Lindbom, L., 2003. Regulation of vascular permeability by neutrophils in acute inflammation. Chem Immunol Allergy. 83, 146-166.

Lingor, P., Koch, J. C., Tonges, L. and Bahr, M., 2012. Axonal degeneration as a therapeutic target in the CNS. Cell Tissue Res.

Liu, B. and Hong, J. S., 2003. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. J Pharmacol Exp Ther. 304, 1-7.

Lloyd, E., Somera-Molina, K., Van Eldik, L. J., Watterson, D. M. and Wainwright, M. S., 2008. Suppression of acute proinflammatory cytokine and chemokine upregulation by post-injury administration of a novel small molecule improves long-term neurologic outcome in a mouse model of traumatic brain injury. J Neuroinflammation. 5, 28.

Loane, D. J. and Byrnes, K. R., 2010. Role of microglia in neurotrauma. Neurotherapeutics. 7, 366-377.

Loane, D. J., Pocivavsek, A., Moussa, C. E., Thompson, R., Matsuoka, Y., Faden, A. I., Rebeck, G. W. and Burns, M. P., 2009. Amyloid precursor protein secretases as therapeutic targets for traumatic brain injury. Nat Med. 15, 377-379.

Louin, G., Marchand-Verrecchia, C., Palmier, B., Plotkine, M. and Jafarian-Tehrani, M., 2006. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces neurological deficit but not cerebral edema following traumatic brain injury. Neuropharmacology. 50, 182-190.

Love, S., Barber, R. and Wilcock, G. K., 1999. Neuronal accumulation of poly(ADP-ribose) after brain ischaemia. Neuropathol Appl Neurobiol. 25, 98-103.

Lu, K. T., Wang, Y. W., Yang, J. T., Yang, Y. L. and Chen, H. I., 2005. Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons. J Neurotrauma. 22, 885-895.

Lucas, S. M., Rothwell, N. J. and Gibson, R. M., 2006. The role of inflammation in CNS injury and disease. Br J Pharmacol. 147 Suppl 1, S232-240.

Lundgren, K., Helm-Estabrooks, N. and Klein, R., 2010. Stuttering Following Acquired Brain Damage: A Review of the Literature. J Neurolinguistics. 23, 447-454.

Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J. C., Yan, Q., Richards, W. G., Citron, M. and Vassar, R., 2001. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. Nat Neurosci. 4, 231-232.

Lye, T. C. and Shores, E. A., 2000. Traumatic brain injury as a risk factor for Alzheimer's disease: a review. Neuropsychol Rev. 10, 115-129.

Lynch, M. A., 2009. The multifaceted profile of activated microglia. Mol Neurobiol. 40, 139-156.

Maas, A. I., 2001. Neuroprotective agents in traumatic brain injury. Expert Opin Investig Drugs. 10, 753-767.

Maas, A. I., Roozenbeek, B. and Manley, G. T., 2010. Clinical trials in traumatic brain injury: past experience and current developments. Neurotherapeutics. 7, 115-126.
Macdonald, R. L. and Olsen, R. W., 1994. GABAA receptor channels. Annu Rev Neurosci. 17, 569-602.

Machado, L. S., Kozak, A., Ergul, A., Hess, D. C., Borlongan, C. V. and Fagan, S. C., 2006. Delayed minocycline inhibits ischemia-activated matrix metalloproteinases 2 and 9 after experimental stroke. BMC Neurosci. 7, 56.

Magara, F., Ricceri, L., Wolfer, D. P. and Lipp, H. P., 2000. The acallosal mouse strain I/LnJ: a putative model of ADHD? Neurosci Biobehav Rev. 24, 45-50.

Maillet, M., Robert, S. J., Cacquevel, M., Gastineau, M., Vivien, D., Bertoglio, J., Zugaza, J. L., Fischmeister, R. and Lezoualc'h, F., 2003. Crosstalk between Rap1 and Rac regulates secretion of sAPPalpha. Nat Cell Biol. 5, 633-639.

Makkar, S. R., Zhang, S. Q. and Cranney, J., 2010. Behavioral and neural analysis of GABA in the acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of fear memory. Neuropsychopharmacology. 35, 1625-1652.

Malm, T. M., Magga, J., Kuh, G. F., Vatanen, T., Koistinaho, M. and Koistinaho, J., 2008. Minocycline reduces engraftment and activation of bone marrow-derived cells but sustains their phagocytic activity in a mouse model of Alzheimer's disease. Glia. 56, 1767-1779.

Mamere, A. E., Saraiva, L. A., Matos, A. L., Carneiro, A. A. and Santos, A. C., 2009. Evaluation of delayed neuronal and axonal damage secondary to moderate and severe traumatic brain injury using quantitative MR imaging techniques. AJNR Am J Neuroradiol. 30, 947-952.

Man, S., Ubogu, E. E. and Ransohoff, R. M., 2007. Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. Brain Pathol. 17, 243-250.

Mansson, R., Hansson, M. J., Morota, S., Uchino, H., Ekdahl, C. T. and Elmer, E., 2007. Re-evaluation of mitochondrial permeability transition as a primary neuroprotective target of minocycline. Neurobiol Dis. 25, 198-205.

Marambaud, P., Chevallier, N., Ancolio, K. and Checler, F., 1998. Post-transcriptional contribution of a cAMP-dependent pathway to the formation of alpha- and beta/gamma-secretases-derived products of beta APP maturation in human cells expressing wild-type and Swedish mutated beta APP. Mol Med. 4, 715-723.

Marambaud, P., Wilk, S. and Checler, F., 1996. Protein kinase A phosphorylation of the proteasome: a contribution to the alpha-secretase pathway in human cells. J Neurochem. 67, 2616-2619.

Marcade, M., Bourdin, J., Loiseau, N., Peillon, H., Rayer, A., Drouin, D., Schweighoffer, F. and Desire, L., 2008. Etazolate, a neuroprotective drug linking GABA(A) receptor pharmacology to amyloid precursor protein processing. J Neurochem. 106, 392-404.

Marcello, E., Gardoni, F., Mauceri, D., Romorini, S., Jeromin, A., Epis, R., Borroni, B., Cattabeni, F., Sala, C., Padovani, A. and Di Luca, M., 2007. Synapse-associated protein-97 mediates alpha-secretase ADAM10 trafficking and promotes its activity. J Neurosci. 27, 1682-1691.

Margulies, S. and Hicks, R., 2009. Combination therapies for traumatic brain injury: prospective considerations. J Neurotrauma. 26, 925-939.

Marmarou, A., Foda, M. A., van den Brink, W., Campbell, J., Kita, H. and Demetriadou, K., 1994. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. J Neurosurg. 80, 291-300.

Marmarou, A., Guy, M., Murphey, L., Roy, F., Layani, L., Combal, J. P. and Marquer, C., 2005. A single dose, three-arm, placebo-controlled, phase I study of the bradykinin B2 receptor antagonist Anatibant (LF16-0687Ms) in patients with severe traumatic brain injury. J Neurotrauma. 22, 1444-1455.

Marmarou, A., Nichols, J., Burgess, J., Newell, D., Troha, J., Burnham, D. and Pitts, L., 1999. Effects of the bradykinin antagonist Bradycor (deltibant, CP-1027) in severe traumatic brain injury: results of a multi-center, randomized, placebo-controlled trial. American Brain Injury Consortium Study Group. J Neurotrauma. 16, 431-444.

Marolda, R., Ciotti, M. T., Matrone, C., Possenti, R., Calissano, P., Cavallaro, S. and Severini, C., 2012. Substance P activates ADAM9 mRNA expression and induces alpha-secretase-mediated amyloid precursor protein cleavage. Neuropharmacology.
Marshall, L. F., 2000. Head injury: recent past, present, and future. Neurosurgery. 47, 546-561.

Mathé, J. F., Richard, I. and Rome, J., 2005. [Serious brain injury and public health, epidemiologic and financial considerations, comprehensive management and care]. Ann Fr Anesth Reanim. 24, 688-694.

Matéo, J., Lescot, T., Ghout, I., Azouvi, P., Aegerter, P., Tazaourte, K., Weiss, J. J., Vigué, B., and Comité de Pilotage du PHRC National TCG IDF. Neuromonitorage des traumatismes crâniens graves en réanimation à la phase aigue : Etat actuel des pratiquesen Ile de France. Absract in SFAR 2010.

Mathias, J. L. and Wheaton, P., 2007. Changes in attention and information-processing speed following severe traumatic brain injury: a meta-analytic review. Neuropsychology. 21, 212-223.

Matsuki, S., Iuchi, Y., Ikeda, Y., Sasagawa, I., Tomita, Y. and Fujii, J., 2003. Suppression of cytochrome c release and apoptosis in testes with heat stress by minocycline. Biochem Biophys Res Commun. 312, 843-849.

Mattson, A. J. and Levin, H. S., 1990. Frontal lobe dysfunction following closed head injury. A review of the literature. J Nerv Ment Dis. 178, 282-291.

Mattson, M. P., 1994. Secreted forms of beta-amyloid precursor protein modulate dendrite outgrowth and calcium responses to glutamate in cultured embryonic hippocampal neurons. J Neurobiol. 25, 439-450.

Mattson, M. P., Cheng, B., Culwell, A. R., Esch, F. S., Lieberburg, I. and Rydel, R. E., 1993. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. Neuron. 10, 243-254.

Mattson, M. P. and Furukawa, K., 1998. Signaling events regulating the neurodevelopmental triad. Glutamate and secreted forms of beta-amyloid precursor protein as examples. Perspect Dev Neurobiol. 5, 337-352.

Mattson, M. P., Mark, R. J., Furukawa, K. and Bruce, A. J., 1997. Disruption of brain cell ion homeostasis in Alzheimer's disease by oxy radicals, and signaling pathways that protect therefrom. Chem Res Toxicol. 10, 507-517.

Mattson, M. P. and Pedersen, W. A., 1998. Effects of amyloid precursor protein derivatives and oxidative stress on basal forebrain cholinergic systems in Alzheimer's disease. Int J Dev Neurosci. 16, 737-753.

Maxwell, C. R., Kanes, S. J., Abel, T. and Siegel, S. J., 2004. Phosphodiesterase inhibitors: a novel mechanism for receptor-independent antipsychotic medications. Neuroscience. 129, 101-107.

McGraw, J., Hiebert, G. W. and Steeves, J. D., 2001. Modulating astrogliosis after neurotrauma. J Neurosci Res. 63, 109-115.

McIntosh, T. K., Smith, D. H., Meaney, D. F., Kotapka, M. J., Gennarelli, T. A. and Graham, D. I., 1996. Neuropathological sequelae of traumatic brain injury: relationship to neurochemical and biomechanical mechanisms. Lab Invest. 74, 315-342.

McIntosh, T. K., Vink, R., Noble, L., Yamakami, I., Fernyak, S., Soares, H. and Faden, A. L., 1989. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. Neuroscience. 28, 233-244.

Medana, I. M. and Esiri, M. M., 2003. Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. Brain. 126, 515-530.

Mei, X. P., Xu, H., Xie, C., Ren, J., Zhou, Y., Zhang, H. and Xu, L. X., 2011. Post-injury administration of minocycline: an effective treatment for nerve-injury induced neuropathic pain. Neurosci Res. 70, 305-312.

Mei, Z., Zhang, F., Tao, L., Zheng, W., Cao, Y., Wang, Z., Tang, S., Le, K., Chen, S., Pi, R. and Liu, P., 2009. Cryptotanshinone, a compound from Salvia miltiorrhiza modulates amyloid precursor protein metabolism and attenuates beta-amyloid deposition through upregulating alpha-secretase in vivo and in vitro. Neurosci Lett. 452, 90-95.

Menet, V., Prieto, M., Privat, A. and Gimenez y Ribotta, M., 2003. Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 100, 8999-9004.

Menniti, F. S., Faraci, W. S. and Schmidt, C. J., 2006. Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development. Nat Rev Drug Discov. 5, 660-670.

Mésenge, C., Verrecchia, C., Allix, M., Boulu, R. R. and Plotkine, M., 1996. Reduction of the neurological deficit in mice with traumatic brain injury by nitric oxide synthase inhibitors. J Neurotrauma. 13, 209-214.

Metz, L. M., Li, D., Traboulsee, A., Myles, M. L., Duquette, P., Godin, J., Constantin, M. and Yong, V. W., 2009. Glatiramer acetate in combination with minocycline in patients with relapsing--remitting multiple sclerosis: results of a Canadian, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. Mult Scler. 15, 1183-1194.

Meziane, H., Dodart, J. C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S. M. and Ungerer, A., 1998. Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnestic mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 95, 12683-12688.

Miyachi, Y., Yoshioka, A., Imamura, S. and Niwa, Y., 1986. Effect of antibiotics on the generation of reactive oxygen species. J Invest Dermatol. 86, 449-453.

Monning, U., Konig, G., Banati, R. B., Mechler, H., Czech, C., Gehrmann, J., Schreiter-Gasser, U., Masters, C. L. and Beyreuther, K., 1992. Alzheimer beta A4-amyloid protein precursor in immunocompetent cells. J Biol Chem. 267, 23950-23956.

Monning, U., Konig, G., Prior, R., Mechler, H., Schreiter-Gasser, U., Masters, C. L. and Beyreuther, K., 1990. Synthesis and secretion of Alzheimer amyloid beta A4 precursor protein by stimulated human peripheral blood leucocytes. FEBS Lett. 277, 261-266.

Monti, B., Berteotti, C. and Contestabile, A., 2006. Subchronic rolipram delivery activates hippocampal CREB and arc, enhances retention and slows down extinction of conditioned fear. Neuropsychopharmacology. 31, 278-286.

Moore, A. R. and Willoughby, D. A., 1995. The role of cAMP regulation in controlling inflammation. Clin Exp Immunol. 101, 387-389.

Morganti-Kossmann, M. C., Rancan, M., Otto, V. I., Stahel, P. F. and Kossmann, T., 2001. Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept. Shock. 16, 165-177.

Morganti-Kossmann, M. C., Satgunaseelan, L., Bye, N. and Kossmann, T., 2007. Modulation of immune response by head injury. Injury. 38, 1392-1400.

Mori, T., Wang, X., Aoki, T. and Lo, E. H., 2002. Downregulation of matrix metalloproteinase-9 and attenuation of edema via inhibition of ERK mitogen activated protein kinase in traumatic brain injury. J Neurotrauma. 19, 1411-1419.

Morimoto, N., Shimazawa, M., Yamashima, T., Nagai, H. and Hara, H., 2005. Minocycline inhibits oxidative stress and decreases in vitro and in vivo ischemic neuronal damage. Brain Res. 1044, 8-15.

Morimoto, T., Ohsawa, I., Takamura, C., Ishiguro, M., Nakamura, Y. and Kohsaka, S., 1998. Novel domain-specific actions of amyloid precursor protein on developing synapses. J Neurosci. 18, 9386-9393.

Morris, G. F., Bullock, R., Marshall, S. B., Marmarou, A., Maas, A. and Marshall, L. F., 1999. Failure of the competitive N-methyl-D-aspartate antagonist Selfotel (CGS 19755) in the treatment of severe head injury: results of two phase III clinical trials. The Selfotel Investigators. J Neurosurg. 91, 737-743.

Morrison, B., 3rd, Elkin, B. S., Dolle, J. P. and Yarmush, M. L., 2011. In vitro models of traumatic brain injury. Annu Rev Biomed Eng. 13, 91-126.

Moss, S. J., Smart, T. G., Blackstone, C. D. and Huganir, R. L., 1992. Functional modulation of GABAA receptors by cAMP-dependent protein phosphorylation. Science. 257, 661-665.

Moult, P. R., 2009. Neuronal glutamate and GABAA receptor function in health and disease. Biochem Soc Trans. 37, 1317-1322.

Moya, K. L., Benowitz, L. I., Schneider, G. E. and Allinquant, B., 1994. The amyloid precursor protein is developmentally regulated and correlated with synaptogenesis. Dev Biol. 161, 597-603.

Mucignat-Caretta, C., Bondi, M. and Caretta, A., 2006. Time course of alterations after olfactory bulbectomy in mice. Physiol Behav. 89, 637-643.

Mueller, E. M., Hofmann, S. G. and Cherry, J. A., 2010. The type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram disturbs expression and extinction of conditioned fear in mice. Neuropharmacology. 59, 1-8.

Mura, A. and Feldon, J., 2003. Spatial learning in rats is impaired after degeneration of the nigrostriatal dopaminergic system. Mov Disord. 18, 860-871.

Muraguchi, T., Takegami, Y., Ohtsuka, T., Kitajima, S., Chandana, E. P., Omura, A., Miki, T., Takahashi, R., Matsumoto, N., Ludwig, A., Noda, M. and Takahashi, C., 2007. RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity. Nat Neurosci. 10, 838-845.

Murata, Y., Rosell, A., Scannevin, R. H., Rhodes, K. J., Wang, X. and Lo, E. H., 2008. Extension of the thrombolytic time window with minocycline in experimental stroke. Stroke. 39, 3372-3377.

Nagel, S., Su, Y., Horstmann, S., Heiland, S., Gardner, H., Koziol, J., Martinez-Torres, F. J. and Wagner, S., 2008. Minocycline and hypothermia for reperfusion injury after focal cerebral ischemia in the rat: effects on BBB breakdown and MMP expression in the acute and subacute phase. Brain Res. 1188, 198-206.

Nakagawa, S., Kim, J. E., Lee, R., Malberg, J. E., Chen, J., Steffen, C., Zhang, Y. J., Nestler, E. J. and Duman, R. S., 2002. Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. J Neurosci. 22, 3673-3682.

Narayan, R. K., Michel, M. E., Ansell, B., Baethmann, A., Biegon, A., Bracken, M. B., Bullock, M. R., Choi, S. C., Clifton, G. L., Contant, C. F., Coplin, W. M., Dietrich, W. D., Ghajar, J., Grady, S. M., Grossman, R. G., Hall, E. D., Heetderks, W., Hovda, D. A., Jallo, J., Katz, R. L., Knoller, N., Kochanek, P. M., Maas, A. I., Majde, J., Marion, D. W., Marmarou, A., Marshall, L. F., McIntosh, T. K., Miller, E., Mohberg, N., Muizelaar, J. P., Pitts, L. H., Quinn, P., Riesenfeld, G., Robertson, C. S., Strauss, K. I., Teasdale, G., Temkin, N., Tuma, R., Wade, C., Walker, M. D., Weinrich, M., Whyte, J., Wilberger, J., Young, A. B. and Yurkewicz, L., 2002. Clinical trials in head injury. J Neurotrauma. 19, 503-557.

Naslund, J., Jensen, M., Tjernberg, L. O., Thyberg, J., Terenius, L. and Nordstedt, C., 1994. The metabolic pathway generating p3, an A beta-peptide fragment, is probably non-amyloidogenic. Biochem Biophys Res Commun. 204, 780-787.

Natale, J. E., Ahmed, F., Cernak, I., Stoica, B. and Faden, A. I., 2003. Gene expression profile changes are commonly modulated across models and species after traumatic brain injury. J Neurotrauma. 20, 907-927.

Ng, S. Y., Semple, B. D., Morganti-Kossmann, M. C. and Bye, N., 2012. Attenuation of microglial activation with minocycline is not associated with changes in neurogenesis

after focal traumatic brain injury in adult mice. J Neurotrauma. 29, 1410-1425.

Nicholl, J. and LaFrance, W. C., Jr., 2009. Neuropsychiatric sequelae of traumatic brain injury. Semin Neurol. 29, 247-255.

Nihashi, T., Inao, S., Kajita, Y., Kawai, T., Sugimoto, T., Niwa, M., Kabeya, R., Hata, N., Hayashi, S. and Yoshida, J., 2001. Expression and distribution of beta amyloid precursor protein and beta amyloid peptide in reactive astrocytes after transient middle cerebral artery occlusion. Acta Neurochir (Wien). 143, 287-295.

Nikulina, E., Tidwell, J. L., Dai, H. N., Bregman, B. S. and Filbin, M. T., 2004. The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery. Proc Natl Acad Sci U S A. 101, 8786-8790.

Noble, W., Garwood, C., Stephenson, J., Kinsey, A. M., Hanger, D. P. and Anderton, B. H., 2009. Minocycline reduces the development of abnormal tau species in models of Alzheimer's disease. Faseb J. 23, 739-750.

Nunan, J. and Small, D. H., 2000. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. FEBS Lett. 483, 6-10.

O'Brien, R. J. and Wong, P. C., 2011. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. Annu Rev Neurosci. 34, 185-204.

O'Dell, D. M., Gibson, C. J., Wilson, M. S., DeFord, S. M. and Hamm, R. J., 2000. Positive and negative modulation of the GABA(A) receptor and outcome after traumatic brain injury in rats. Brain Res. 861, 325-332.

O'Donnell, J. M. and Zhang, H. T., 2004. Antidepressant effects of inhibitors of cAMP phosphodiesterase (PDE4). Trends Pharmacol Sci. 25, 158-163.

Obregon, D. F., Rezai-Zadeh, K., Bai, Y., Sun, N., Hou, H., Ehrhart, J., Zeng, J., Mori, T., Arendash, G. W., Shytle, D., Town, T. and Tan, J., 2006. ADAM10 activation is required for green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. J Biol Chem. 281, 16419-16427.

Octave, J. N., 1995. The amyloid peptide and its precursor in Alzheimer's disease. Rev Neurosci. 6, 287-316.

Ohm, T. G., Scharnagl, H., Marz, W. and Bohl, J., 1999. Apolipoprotein E isoforms and the development of low and high Braak stages of Alzheimer's disease-related lesions. Acta Neuropathol. 98, 273-280.

Ohsawa, I., Takamura, C. and Kohsaka, S., 1997. The amino-terminal region of amyloid precursor protein is responsible for neurite outgrowth in rat neocortical explant culture. Biochem Biophys Res Commun. 236, 59-65.

Okamoto, T., Takeda, S., Murayama, Y., Ogata, E. and Nishimoto, I., 1995. Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. J Biol Chem. 270, 4205-4208.

Olesen, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Wittchen, H. U. and Jonsson, B., 2012. The economic cost of brain disorders in Europe. Eur J Neurol. 19, 155-162.

Olsen, R. W., Bergman, M. O., Van Ness, P. C., Lummis, S. C., Watkins, A. E., Napias, C. and Greenlee, D. V., 1981. gamma-Aminobutyric acid receptor binding in mammalian brain. Heterogeneity of binding sites. Mol Pharmacol. 19, 217-227.

Overstreet, D. H., Double, K. and Schiller, G. D., 1989. Antidepressant effects of rolipram in a genetic animal model of depression: cholinergic supersensitivity and weight gain. Pharmacol Biochem Behav. 34, 691-696.

Pace, M. C., Cicciarella, G., Barbato, E., Maisto, M., Passavanti, M. B., Gazzerro, G., Barbarisi, M. and Aurilio, C., 2006. Severe traumatic brain injury: management and prognosis. Minerva Anestesiol. 72, 235-242.

Pagenstecher, A., Stalder, A. K., Kincaid, C. L., Shapiro, S. D. and Campbell, I. L., 1998. Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states. Am J Pathol. 152, 729-741.

Palin, K., Cunningham, C., Forse, P., Perry, V. H. and Platt, N., 2008. Systemic inflammation switches the inflammatory cytokine profile in CNS Wallerian degeneration. Neurobiol Dis. 30, 19-29.

Pandey, S. C., Zhang, H., Roy, A. and Xu, T., 2005. Deficits in amygdaloid cAMP-responsive element-binding protein signaling play a role in genetic predisposition to anxiety and alcoholism. J Clin Invest. 115, 2762-2773.

Pannu, R. and Singh, I., 2006. Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide synthase: neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms. Neurochem Int. 49, 170-182.

Papadopoulos, M. C. and Verkman, A. S., 2007. Aquaporin-4 and brain edema. Pediatr Nephrol. 22, 778-784.

Parashos, S. A., Swearingen, C. J., Biglan, K. M., Bodis-Wollner, I., Liang, G. S., Ross, G. W., Tilley, B. C. and Shulman, L. M., 2009. Determinants of the timing of symptomatic treatment in early Parkinson disease: The National Institutes of Health Exploratory Trials in Parkinson Disease (NET-PD) Experience. Arch Neurol. 66, 1099-1104.

Park, E., Bell, J. D. and Baker, A. J., 2008. Traumatic brain injury: can the consequences be stopped? Cmaj. 178, 1163-1170.

Parkes, J. D., Thompson, C., Brennan, L., Gajraj, N., Howcroft, B. and Ruiz, J., 1984. Rolipram in Parkinson's disease. Adv Neurol. 40, 563-565.

Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E. H., Turner, A. J. and Hooper, N. M., 1999. Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells. Biochemistry. 38, 9728-9734.

Patterson, C., Feightner, J. W., Garcia, A., Hsiung, G. Y., MacKnight, C. and Sadovnick, A. D., 2008. Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease. Cmaj. 178, 548-556.

Pavlov, I., Huusko, N., Drexel, M., Kirchmair, E., Sperk, G., Pitkanen, A. and Walker, M. C., 2011. Progressive loss of phasic, but not tonic, GABAA receptor-mediated inhibition in dentate granule cells in a model of post-traumatic epilepsy in rats. Neuroscience. 194, 208-219.

Payen, J. F., Fauvage, B., Falcon, D. and Lavagne, P., 2003. [Brain oedema following blood-brain barrier disruption: mechanisms and diagnosis]. Ann Fr Anesth Reanim. 22, 220-225.

Pearse, D. D., Pereira, F. C., Marcillo, A. E., Bates, M. L., Berrocal, Y. A., Filbin, M. T. and Bunge, M. B., 2004. cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. Nat Med. 10, 610-616.

Pedersen, M. O., Larsen, A., Stoltenberg, M. and Penkowa, M., 2009. Cell death in the injured brain: roles of metallothioneins. Prog Histochem Cytochem. 44, 1-27.

Peduto, L., 2009. ADAM9 as a potential target molecule in cancer. Curr Pharm Des. 15, 2282-2287.

Perluigi, M. and Butterfield, D. A., 2012. Oxidative Stress and Down Syndrome: A Route toward Alzheimer-Like Dementia. Curr Gerontol Geriatr Res. 2012, 724904.

Perry, V. H., 2010. Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration. Acta Neuropathol. 120, 277-286.

Peschon, J. J., Torrance, D. S., Stocking, K. L., Glaccum, M. B., Otten, C., Willis, C. R., Charrier, K., Morrissey, P. J., Ware, C. B. and Mohler, K. M., 1998. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. J Immunol. 160, 943-952.

Phillis, J. W., Horrocks, L. A. and Farooqui, A. A., 2006. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. Brain Res Rev. 52, 201-243.

Pinteaux, E., Parker, L. C., Rothwell, N. J. and Luheshi, G. N., 2002. Expression of interleukin-1 receptors and their role in interleukin-1 actions in murine microglial cells. J Neurochem. 83, 754-763.

Pinzon, A., Marcillo, A., Quintana, A., Stamler, S., Bunge, M. B., Bramlett, H. M. and Dietrich, W. D., 2008. A re-assessment of minocycline as a neuroprotective agent in a rat spinal cord contusion model. Brain Res. 1243, 146-151.

Placheta, P. and Karobath, M., 1980. In vitro modulation by SQ 20009 and SQ 65396 of GABA receptor binding in rat CNS membranes. Eur J Pharmacol. 62, 225-228.

Plassman, B. L., Havlik, R. J., Steffens, D. C., Helms, M. J., Newman, T. N., Drosdick, D., Phillips, C., Gau, B. A., Welsh-Bohmer, K. A., Burke, J. R., Guralnik, J. M. and Breitner, J. C., 2000. Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias. Neurology. 55, 1158-1166.

Pleines, U. E., Stover, J. F., Kossmann, T., Trentz, O. and Morganti-Kossmann, M. C., 1998. Soluble ICAM-1 in CSF coincides with the extent of cerebral damage in patients with severe traumatic brain injury. J Neurotrauma. 15, 399-409.

Poliakov, A., Cotrina, M. and Wilkinson, D. G., 2004. Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. Dev Cell. 7, 465-480.

Pontieri, F. E., Ricci, A., Pellicano, C., Benincasa, D. and Buttarelli, F. R., 2005. Minocycline in amyotrophic lateral sclerosis: a pilot study. Neurol Sci. 26, 285-287.

Popa-Wagner, A., Schroder, E., Walker, L. C. and Kessler, C., 1998. beta-Amyloid precursor protein and ss-amyloid peptide immunoreactivity in the rat brain after middle cerebral artery occlusion: effect of age. Stroke. 29, 2196-2202.

Postina, R., 2012. Activation of alpha-secretase cleavage. J Neurochem. 120 Suppl 1, 46-54.

Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., Flamez, P., Dequenne, A., Godaux, E., van Leuven, F. and Fahrenholz, F., 2004. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. J Clin Invest. 113, 1456-1464.

Press, N. J. and Banner, K. H., 2009. PDE4 inhibitors - a review of the current field. Prog Med Chem. 47, 37-74.

Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretzschmar, H. A. and Herms, J., 2006. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. J Neurosci. 26, 7212-7221.

Psychoyos, S., Ford, C. J. and Phillips, M. A., 1982. Inhibition by etazolate (SQ 20009) and cartazolate (SQ 65396) of adenosine-stimulated [3H]cAMP formation in [2-3H]adenine-prelabeled vesicles prepared from guinea pig cerebral cortex. Biochem Pharmacol. 31, 1441-1442.

Qi, H., Rand, M. D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T. and Artavanis-Tsakonas, S., 1999. Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian.

Science. 283, 91-94.

Raghavendra Rao, V. L., Dogan, A., Bowen, K. K. and Dempsey, R. J., 2000. Traumatic brain injury leads to increased expression of peripheral-type benzodiazepine receptors, neuronal death, and activation of astrocytes and microglia in rat thalamus. Exp Neurol. 161, 102-114.

Ramlackhansingh, A. F., Brooks, D. J., Greenwood, R. J., Bose, S. K., Turkheimer, F. E., Kinnunen, K. M., Gentleman, S., Heckemann, R. A., Gunanayagam, K., Gelosa, G. and Sharp, D. J., 2011. Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. Ann Neurol. 70, 374-383.

Ransohoff, R. M., 2009. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. Immunity. 31, 711-721.

Rappert, A., Bechmann, I., Pivneva, T., Mahlo, J., Biber, K., Nolte, C., Kovac, A. D., Gerard, C., Boddeke, H. W., Nitsch, R. and Kettenmann, H., 2004. CXCR3-dependent microglial recruitment is essential for dendrite loss after brain lesion. J Neurosci. 24, 8500-8509.

Reid, W. M. and Hamm, R. J., 2008. Post-injury atomoxetine treatment improves cognition following experimental traumatic brain injury. J Neurotrauma. 25, 248-256.

Reinert, M. M. and Bullock, R., 1999. Clinical trials in head injury. Neurol Res. 21, 330-338.

Reinhard, C., Hebert, S. S. and De Strooper, B., 2005. The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. Embo J. 24, 3996-4006.

Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D. and Saftig, P., 2005. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. Embo J. 24, 742-752.

Reiter, E. R., DiNardo, L. J. and Costanzo, R. M., 2004. Effects of head injury on olfaction and taste. Otolaryngol Clin North Am. 37, 1167-1184.

Ribaut-Barassin, C., Moussaoui, S., Brugg, B., Haeberle, A. M., Huber, G., Imperato, A., Delhaye-Bouchaud, N., Mariani, J. and Bailly, Y. J., 2000. Hemisynaptic distribution patterns of presenilins and beta-APP isoforms in the rodent cerebellum and hippocampus. Synapse. 35, 96-110.

Riggio, S. and Wong, M., 2009. Neurobehavioral sequelae of traumatic brain injury. Mt Sinai J Med. 76, 163-172.

Ring, S., Weyer, S. W., Kilian, S. B., Waldron, E., Pietrzik, C. U., Filippov, M. A., Herms, J., Buchholz, C., Eckman, C. B., Korte, M., Wolfer, D. P. and Muller, U. C., 2007. The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. J Neurosci. 27, 7817-7826.

Roberts, I., Yates, D., Sandercock, P., Farrell, B., Wasserberg, J., Lomas, G., Cottingham, R., Svoboda, P., Brayley, N., Mazairac, G., Laloe, V., Munoz-Sanchez, A., Arango, M., Hartzenberg, B., Khamis, H., Yutthakasemsunt, S., Komolafe, E., Olldashi, F., Yadav, Y., Murillo-Cabezas, F., Shakur, H. and Edwards, P., 2004. Effect of intravenous corticosteroids on death within 14 days in 10008 adults with clinically significant head injury (MRC CRASH trial): randomised placebo-controlled trial. Lancet. 364, 1321-1328.

Roch, J. M., Masliah, E., Roch-Levecq, A. C., Sundsmo, M. P., Otero, D. A., Veinbergs, I. and Saitoh, T., 1994. Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor. Proc Natl Acad Sci U S A. 91, 7450-7454.

Rogers, J. M. and Read, C. A., 2007. Psychiatric comorbidity following traumatic brain injury. Brain Inj. 21, 1321-1333.

Rose, G. M., Hopper, A., De Vivo, M. and Tehim, A., 2005. Phosphodiesterase inhibitors for cognitive enhancement. Curr Pharm Des. 11, 3329-3334.

Rossjohn, J., Cappai, R., Feil, S. C., Henry, A., McKinstry, W. J., Galatis, D., Hesse, L., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C. L. and Parker, M. W., 1999. Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. Nat Struct Biol. 6, 327-331.

Rothwell, N., 2003. Interleukin-1 and neuronal injury: mechanisms, modification, and therapeutic potential. Brain Behav Immun. 17, 152-157.

Rudolph, U. and Knoflach, F., 2011. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. Nat Rev Drug Discov. 10, 685-697.

Runnerstam, M., Bao, F., Huang, Y., Shi, J., Gutierrez, E., Hamberger, A., Hansson, H. A., Viano, D. and Haglid, K., 2001. A new model for diffuse brain injury by rotational acceleration: II. Effects on extracellular glutamate, intracranial pressure, and neuronal apoptosis. J Neurotrauma. 18, 259-273.

Ryu, J. K., Franciosi, S., Sattayaprasert, P., Kim, S. U. and McLarnon, J. G., 2004. Minocycline inhibits neuronal death and glial activation induced by beta-amyloid peptide in rat hippocampus. Glia. 48, 85-90.

Saatman, K. E., Duhaime, A. C., Bullock, R., Maas, A. I., Valadka, A. and Manley, G. T., 2008. Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. J Neurotrauma. 25, 719-738.

Saftig, P. and Reiss, K., 2011. The "A Disintegrin And Metalloproteases" ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? Eur J Cell Biol. 90, 527-535.

Saijo, K. and Glass, C. K., 2011. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. Nat Rev Immunol. 11, 775-787.

Sanchez, A. J. and Garcia-Merino, A., 2012. Neuroprotective agents: cannabinoids. Clin Immunol. 142, 57-67.

Sanchez Mejia, R. O., Ona, V. O., Li, M. and Friedlander, R. M., 2001. Minocycline reduces traumatic brain injury-mediated caspase-1 activation, tissue damage, and neurological dysfunction. Neurosurgery. 48, 1393-1399; discussion 1399-1401.

Sanchez-Alavez, M., Chan, S. L., Mattson, M. P. and Criado, J. R., 2007. Electrophysiological and cerebrovascular effects of the alpha-secretase-derived form of amyloid precursor protein in young and middle-aged rats. Brain Res. 1131, 112-117.

Sarno, S., Erasmus, L. P., Lipp, B. and Schlaegel, W., 2003. Multisensory integration after traumatic brain injury: a reaction time study between pairings of vision, touch and audition. Brain Inj. 17, 413-426.

Schabitz, W. R., Schneider, A. and Laage, R., 2008. Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study. Neurology. 71, 1461; author reply 1461.

Scharnagl, H., Tisljar, U., Winkler, K., Huttinger, M., Nauck, M. A., Gross, W., Wieland, H., Ohm, T. G. and Marz, W., 1999. The betaA4 amyloid peptide complexes to and enhances the uptake of beta-very low density lipoproteins by the low density lipoprotein receptor-related protein and heparan sulfate proteoglycans pathway. Lab Invest. 79, 1271-1286.

Schildknecht, S., Pape, R., Muller, N., Robotta, M., Marquardt, A., Burkle, A., Drescher, M. and Leist, M., 2010. Neuroprotection by minocycline caused by direct and specific scavenging of peroxynitrite. J Biol Chem. 286, 4991-5002.

Schnell, L., Fearn, S., Klassen, H., Schwab, M. E. and Perry, V. H., 1999. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. Eur J Neurosci. 11, 3648-3658.

Schultz, J., 1974. Inhibition of phosphodiesterase activity in brain cortical slices from guinea pig and rat. Pharmacol Res Commun. 6, 335-341.

Schwab, J. M., Beschorner, R., Meyermann, R., Gozalan, F. and Schluesener, H. J., 2002. Persistent accumulation of cyclooxygenase-1-expressing microglial cells and macrophages and transient upregulation by endothelium in human brain injury. J Neurosurg. 96, 892-899.

Schwab, J. M., Seid, K. and Schluesener, H. J., 2001. Traumatic brain injury induces prolonged accumulation of cyclooxygenase-1 expressing microglia/brain macrophages in rats. J Neurotrauma. 18, 881-890.

Schwarzbold, M. L., Rial, D., De Bem, T., Machado, D. G., Cunha, M. P., dos Santos, A. A., dos Santos, D. B., Figueiredo, C. P., Farina, M., Goldfeder, E. M., Rodrigues, A. L., Prediger, R. D. and Walz, R., 2010. Effects of traumatic brain injury of different severities on emotional, cognitive, and oxidative stress-related parameters in mice. J Neurotrauma. 27, 1883-1893.

Seabrook, T. J., Jiang, L., Maier, M. and Lemere, C. A., 2006. Minocycline affects microglia activation, Abeta deposition, and behavior in APP-tg mice. Glia. 53, 776-782.

Seel, R. T., Kreutzer, J. S., Rosenthal, M., Hammond, F. M., Corrigan, J. D. and Black, K., 2003. Depression after traumatic brain injury: a National Institute on Disability and Rehabilitation Research Model Systems multicenter investigation. Arch Phys Med Rehabil. 84, 177-184.

Selkoe, D. J., 1994. Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. Annu Rev Neurosci. 17, 489-517.

Selkoe, D. J., Podlisny, M. B., Joachim, C. L., Vickers, E. A., Lee, G., Fritz, L. C. and Oltersdorf, T., 1988. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. Proc Natl Acad Sci U S A. 85, 7341-7345.

Seth, P. and Koul, N., 2008. Astrocyte, the star avatar: redefined. J Biosci. 33, 405-421.

Shakur, H., Andrews, P., Asser, T., Balica, L., Boeriu, C., Quintero, J. D., Dewan, Y., Druwe, P., Fletcher, O., Frost, C., Hartzenberg, B., Mantilla, J. M., Murillo-Cabezas, F., Pachl, J., Ravi, R. R., Ratsep, I., Sampaio, C., Singh, M., Svoboda, P. and Roberts, I., 2009. The BRAIN TRIAL: a randomised, placebo controlled trial of a Bradykinin B2 receptor antagonist (Anatibant) in patients with traumatic brain injury. Trials. 10, 109.

Shepherd, J. K., Grewal, S. S., Fletcher, A., Bill, D. J. and Dourish, C. T., 1994. Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. Psychopharmacology (Berl). 116, 56-64.

Shigemori, Y., Katayama, Y., Mori, T., Maeda, T. and Kawamata, T., 2006. Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats. Acta Neurochir Suppl. 96, 130-133.

Shimoda, Y., Satoh, M., Nakamura, M., Akatsu, T. and Hiramori, K., 2005. Activated tumour necrosis factor-alpha shedding process is associated with in-hospital complication in patients with acute myocardial infarction. Clin Sci (Lond). 108, 339-347.

Shiozaki, T., Hayakata, T., Tasaki, O., Hosotubo, H., Fuijita, K., Mouri, T., Tajima, G., Kajino, K., Nakae, H., Tanaka, H., Shimazu, T. and Sugimoto, H., 2005. Cerebrospinal fluid concentrations of anti-inflammatory mediators in early-phase severe traumatic brain injury. Shock. 23, 406-410.

Shohami, E., Ginis, I. and Hallenbeck, J. M., 1999. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. Cytokine Growth Factor Rev. 10, 119-130.

Shohami, E., Novikov, M., Bass, R., Yamin, A. and Gallily, R., 1994. Closed head injury triggers early production of TNF alpha and IL-6 by brain tissue. J Cereb Blood Flow Metab. 14, 615-619.

Sieghart, W., 1995. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. Pharmacol Rev. 47, 181-234.

Sieghart, W., 2006. Structure, pharmacology, and function of GABAA receptor subtypes. Adv Pharmacol. 54, 231-263.

Sieghart, W. and Sperk, G., 2002. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. Curr Top Med Chem. 2, 795-816.

Silvestre, J. S., Fernandez, A. G. and Palacios, J. M., 1999. Effects of rolipram on the elevated plus-maze test in rats: a preliminary study. J Psychopharmacol. 13, 274-277.

Sinopoli, K. J., Schachar, R. and Dennis, M., 2011. Traumatic brain injury and secondary attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents: the effect of reward on inhibitory control. J Clin Exp Neuropsychol. 33, 805-819.

Siopi, E., Calabria, S., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C. and Jafarian-Tehrani, M., 2012. Minocycline Restores Olfactory Bulb Volume and Olfactory Behavior after Traumatic Brain Injury in Mice. J Neurotrauma.

Siopi, E., Cho, A. H., Homsi, S., Croci, N., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C. and Jafarian-Tehrani, M., 2011. Minocycline restores sAPPalpha levels and reduces the late histopathological consequences of traumatic brain injury in mice. J Neurotrauma. 28, 2135-2143.

Siopi, E., Llufriu-Daben, G., Fanucchi, F., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C. and Jafarian-Tehrani, M., 2012. Evaluation of late cognitive impairment and anxiety states following traumatic brain injury in mice: the effect of minocycline. Neurosci Lett. 511, 110-115.

Skandsen, T., Finnanger, T. G., Andersson, S., Lydersen, S., Brunner, J. F. and Vik, A., 2010. Cognitive impairment 3 months after moderate and severe traumatic brain injury: a prospective follow-up study. Arch Phys Med Rehabil. 91, 1904-1913.

Small, D. H., Nurcombe, V., Moir, R., Michaelson, S., Monard, D., Beyreuther, K. and Masters, C. L., 1992. Association and release of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease from chick brain extracellular matrix. J Neurosci. 12, 4143-4150.
Smith, C. C., 1972. The cyclic AMP system and drug devekopment. The American Association for the Advancement of Science. 2, 103-108.

Smith, D. H., Chen, X. H., Pierce, J. E., Wolf, J. A., Trojanowski, J. Q., Graham, D. I. and McIntosh, T. K., 1997. Progressive atrophy and neuron death for one year following brain trauma in the rat. J Neurotrauma. 14, 715-727.

Smith-Swintosky, V. L., Pettigrew, L. C., Craddock, S. D., Culwell, A. R., Rydel, R. E. and Mattson, M. P., 1994. Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect against ischemic brain injury. J Neurochem. 63, 781-784.

Soares, H. D., Hicks, R. R., Smith, D. and McIntosh, T. K., 1995. Inflammatory leukocytic recruitment and diffuse neuronal degeneration are separate pathological processes resulting from traumatic brain injury. J Neurosci. 15, 8223-8233.

Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Lower, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., Masters, C. L., Muller, U., Kins, S. and Beyreuther, K., 2005. Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. Embo J. 24, 3624-3634.

Sosa, I., Reyes, O. and Kuffler, D. P., 2005. Immunosuppressants: neuroprotection and promoting neurological recovery following peripheral nerve and spinal cord lesions. Exp Neurol. 195, 7-15.

Spaethling, J. M., Geddes-Klein, D. M., Miller, W. J., von Reyn, C. R., Singh, P., Mesfin, M., Bernstein, S. J. and Meaney, D. F., 2007. Linking impact to cellular and molecular sequelae of CNS injury: modeling in vivo complexity with in vitro simplicity. Prog Brain Res. 161, 27-39.

Spikman, J. M., Timmerman, M. E., Milders, M. V., Veenstra, W. S. and van der Naalt, J., 2012. Social cognition impairments in relation to general cognitive deficits, injury severity, and prefrontal lesions in traumatic brain injury patients. J Neurotrauma. 29, 101-111.

Squire, L. R., 2004. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. Neurobiol Learn Mem. 82, 171-177.

Stamatovic, S. M., Dimitrijevic, O. B., Keep, R. F. and Andjelkovic, A. V., 2006. Inflammation and brain edema: new insights into the role of chemokines and their receptors. Acta Neurochir Suppl. 96, 444-450.

Stirling, D. P., Koochesfahani, K. M., Steeves, J. D. and Tetzlaff, W., 2005. Minocycline as a neuroprotective agent. Neuroscientist. 11, 308-322.

Stockley, J. H. and O'Neill, C., 2007. The proteins BACE1 and BACE2 and beta-secretase activity in normal and Alzheimer's disease brain. Biochem Soc Trans. 35, 574-576.

Stoica, B. A. and Faden, A. I., 2010. Cell death mechanisms and modulation in traumatic brain injury. Neurotherapeutics. 7, 3-12.

Stone, J. R., Singleton, R. H. and Povlishock, J. T., 2000. Antibodies to the C-terminus of the beta-amyloid precursor protein (APP): a site specific marker for the detection of traumatic axonal injury. Brain Res. 871, 288-302.

Storey, E. and Cappai, R., 1999. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease and the Abeta peptide. Neuropathol Appl Neurobiol. 25, 81-97.

Strauss, K. I., Barbe, M. F., Marshall, R. M., Raghupathi, R., Mehta, S. and Narayan, R. K., 2000. Prolonged cyclooxygenase-2 induction in neurons and glia following traumatic brain injury in the rat. J Neurotrauma. 17, 695-711.

Strauss, K. I. and Marini, A. M., 2002. Cyclooxygenase-2 inhibition protects cultured cerebellar granule neurons from glutamate-mediated cell death. J Neurotrauma. 19, 627-638.

Stuss, D. T., 2011. Functions of the frontal lobes: relation to executive functions. J Int Neuropsychol Soc. 17, 759-765.

Stuss, D. T. and Levine, B., 2002. Adult clinical neuropsychology: lessons from studies of the frontal lobes. Annu Rev Psychol. 53, 401-433.

Supavilai, P. and Karobath, M., 1979. Stimulation of benzodiazepine receptor binding by SQ 20009 is chloride-dependent and picrotoxin-sensitive. Eur J Pharmacol. 60, 111-113.

Supavilai, P. and Karobath, M., 1980. Interaction of SQ 20009 and GABA-like drugs as modulators of benzodiazepine receptor binding. Eur J Pharmacol. 62, 229-233.

Supavilai, P. and Karobath, M., 1981. Action of pyrazolopyridines as modulators of [3H]flunitrazepam binding to the gaba/benzodiazepine receptor complex of the cerebellum. Eur J Pharmacol. 70, 183-193.

Switzer, J. A., Hall, C. E., Close, B., Nichols, F. T., Gross, H., Bruno, A. and Hess, D. C., 2010. A telestroke network enhances recruitment into acute stroke clinical trials.

Stroke. 41, 566-569.

Szymanska, A., Biernaskie, J., Laidley, D., Granter-Button, S. and Corbett, D., 2006. Minocycline and intracerebral hemorrhage: influence of injury severity and delay to treatment. Exp Neurol. 197, 189-196.

Tagliaferri, F., Compagnone, C., Yoganandan, N. and Gennarelli, T. A., 2009. Traumatic brain injury after frontal crashes: relationship with body mass index. J Trauma. 66, 727-729.

Takahashi, K., Rochford, C. D. and Neumann, H., 2005. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. J Exp Med. 201, 647-657.

Taylor, C. J., Ireland, D. R., Ballagh, I., Bourne, K., Marechal, N. M., Turner, P. R., Bilkey, D. K., Tate, W. P. and Abraham, W. C., 2008. Endogenous secreted amyloid precursor protein-alpha regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. Neurobiol Dis. 31, 250-260.

Teasdale, G. and Jennett, B., 1978. Assessment of coma and severity of brain damage. Anesthesiology. 49, 225-226.

Tehranian, R., Andell-Jonsson, S., Beni, S. M., Yatsiv, I., Shohami, E., Bartfai, T., Lundkvist, J. and Iverfeldt, K., 2002. Improved recovery and delayed cytokine induction after closed head injury in mice with central overexpression of the secreted isoform of the interleukin-1 receptor antagonist. J Neurotrauma. 19, 939-951.

Teixeira, M. M., Gristwood, R. W., Cooper, N. and Hellewell, P. G., 1997. Phosphodiesterase (PDE)4 inhibitors: anti-inflammatory drugs of the future? Trends Pharmacol Sci. 18, 164-171.

Teng, Y. D., Choi, H., Onario, R. C., Zhu, S., Desilets, F. C., Lan, S., Woodard, E. J., Snyder, E. Y., Eichler, M. E. and Friedlander, R. M., 2004. Minocycline inhibits contusion-triggered mitochondrial cytochrome c release and mitigates functional deficits after spinal cord injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 101, 3071-3076.

Thomas, M., Ashizawa, T. and Jankovic, J., 2004. Minocycline in Huntington's disease: a pilot study. Mov Disord. 19, 692-695.

Thompson, A. M., Park, K. G., Kelly, D. R., MacNamara, I. and Munro, A., 1997. Training for minor surgery in general practice: is it adequate? J R Coll Surg Edinb. 42, 89-91.

Thompson, H. J., Lifshitz, J., Marklund, N., Grady, M. S., Graham, D. I., Hovda, D. A. and McIntosh, T. K., 2005. Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. J Neurotrauma. 22, 42-75.

Thornton, E., Vink, R., Blumbergs, P. C. and Van Den Heuvel, C., 2006. Soluble amyloid precursor protein alpha reduces neuronal injury and improves functional outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. Brain Res. 1094, 38-46.

Tikka, T. M. and Koistinaho, J. E., 2001a. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. J Immunol. 166, 7527-7533.

Tikka, T. M., Vartiainen, N. E., Goldsteins, G., Oja, S. S., Andersen, P. M., Marklund, S. L. and Koistinaho, J., 2002. Minocycline prevents neurotoxicity induced by cerebrospinal fluid from patients with motor neurone disease. Brain. 125, 722-731.

Tomas-Camardiel, M., Rite, I., Herrera, A. J., de Pablos, R. M., Cano, J., Machado, A. and Venero, J. L., 2004. Minocycline reduces the lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction, peroxynitrite-mediated nitration of proteins, disruption of the blood-brain barrier, and damage in the nigral dopaminergic system. Neurobiol Dis. 16, 190-201.

Tomimoto, H., Akiguchi, I., Wakita, H., Nakamura, S. and Kimura, J., 1995. Ultrastructural localization of amyloid protein precursor in the normal and postischemic gerbil brain.

Brain Res. 672, 187-195.

Treiber, C., Simons, A., Strauss, M., Hafner, M., Cappai, R., Bayer, T. A. and Multhaup, G., 2004. Clioquinol mediates copper uptake and counteracts copper efflux activities of the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease. J Biol Chem. 279, 51958-51964.

Tsuji, M., Wilson, M. A., Lange, M. S. and Johnston, M. V., 2004. Minocycline worsens hypoxic-ischemic brain injury in a neonatal mouse model. Exp Neurol. 189, 58-65.

Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P. and Abraham, W. C., 2003. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. Prog Neurobiol. 70, 1-32.

Unterberg, A. W., Stover, J., Kress, B. and Kiening, K. L., 2004. Edema and brain trauma. Neuroscience. 129, 1021-1029.

Van Den Heuvel, C., Thornton, E. and Vink, R., 2007. Traumatic brain injury and Alzheimer's disease: a review. Prog Brain Res. 161, 303-316.

Van Den Hurk, W. H., Bloemen, M. and Martens, G. J., 2001. Expression of the gene encoding the beta-amyloid precursor protein APP in Xenopus laevis. Brain Res Mol Brain Res. 97, 13-20.

Van der Naalt, J., van Zomeren, A. H., Sluiter, W. J. and Minderhoud, J. M., 2000. Acute behavioural disturbances related to imaging studies and outcome in mild-to-moderate head injury. Brain Inj. 14, 781-788.

Van Gassen, G., Annaert, W. and Van Broeckhoven, C., 2000. Binding partners of Alzheimer's disease proteins: are they physiologically relevant? Neurobiol Dis. 7, 135-151.

van Landeghem, F. K., Weiss, T., Oehmichen, M. and von Deimling, A., 2006. Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury. J Neurotrauma. 23, 1518-1528.

Van Nostrand, W. E., Schmaier, A. H., Farrow, J. S. and Cunningham, D. D., 1991. Platelet protease nexin-2/amyloid beta-protein precursor. Possible pathologic and physiologic functions. Ann N Y Acad Sci. 640, 140-144.

Van Nostrand, W. E., Wagner, S. L., Shankle, W. R., Farrow, J. S., Dick, M., Rozemuller, J. M., Kuiper, M. A., Wolters, E. C., Zimmerman, J., Cotman, C. W. and et al., 1992. Decreased levels of soluble amyloid beta-protein precursor in cerebrospinal fluid of live Alzheimer disease patients. Proc Natl Acad Sci U S A. 89, 2551-2555.

Vassalli, P., 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. Annu Rev Immunol. 10, 411-452.

Vecil, G. G., Larsen, P. H., Corley, S. M., Herx, L. M., Besson, A., Goodyer, C. G. and Yong, V. W., 2000. Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo. J Neurosci Res. 61, 212-224.

Vellas, B., Sol, O., Snyder, P. J., Ousset, P. J., Haddad, R., Maurin, M., Lemarie, J. C., Desire, L. and Pando, M. P., 2011. EHT0202 in Alzheimer's disease: a 3-month, randomized, placebo-controlled, double-blind study. Curr Alzheimer Res. 8, 203-212.

Venezia, V., Nizzari, M., Repetto, E., Violani, E., Corsaro, A., Thellung, S., Villa, V., Carlo, P., Schettini, G., Florio, T. and Russo, C., 2006. Amyloid precursor protein modulates ERK-1 and -2 signaling. Ann N Y Acad Sci. 1090, 455-465.

Venkatesan, C., Chrzaszcz, M., Choi, N. and Wainwright, M. S., 2010. Chronic upregulation of activated microglia immunoreactive for galectin-3/Mac-2 and nerve growth factor following diffuse axonal injury. J Neuroinflammation. 7, 32.

Viggiano, D., 2008. The hyperactive syndrome: metanalysis of genetic alterations, pharmacological treatments and brain lesions which increase locomotor activity. Behav Brain Res. 194, 1-14.

Vincent, B. and Checler, F., 2011. alpha-Secretase in Alzheimer's Disease and Beyond: Mechanistic, Regulation and Function in the Shedding of Membrane Proteins. Curr Alzheimer Res.

Vincent, B. and Checler, F., 2012. alpha-Secretase in Alzheimer's Disease and Beyond: Mechanistic, Regulation and Function in the Shedding of Membrane Proteins. Curr Alzheimer Res. 9, 140-156.

Vink, R. and Nimm, A. J., 2009. Multifunctional drugs for head injury. Neurotherapeutics. 6, 28-42.

Vitolo, O. V., Sant'Angelo, A., Costanzo, V., Battaglia, F., Arancio, O. and Shelanski, M., 2002. Amyloid beta -peptide inhibition of the PKA/CREB pathway and long-term potentiation: reversibility by drugs that enhance cAMP signaling. Proc Natl Acad Sci U S A. 99, 13217-13221.

Wachtel, H., 1983. Potential antidepressant activity of rolipram and other selective cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase inhibitors. Neuropharmacology. 22, 267-272.

Walf, A. A. and Frye, C. A., 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. Nat Protoc. 2, 322-328.

Wallis, R. A., Panizzon, K. L., Henry, D. and Wasterlain, C. G., 1993. Neuroprotection against nitric oxide injury with inhibitors of ADP-ribosylation. Neuroreport. 5, 245-248.

Walsh, D. M., Tseng, B. P., Rydel, R. E., Podlisny, M. B. and Selkoe, D. J., 2000. The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. Biochemistry. 39, 10831-10839.

Walsh, D. T., Montero, R. M., Bresciani, L. G., Jen, A. Y., Leclercq, P. D., Saunders, D., AN, E. L.-A., Gbadamoshi, L., Gentleman, S. M. and Jen, L. S., 2002. Amyloid-beta peptide is toxic to neurons in vivo via indirect mechanisms. Neurobiol Dis. 10, 20-27.

Wang, C. X. and Shuaib, A., 2002. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. Prog Neurobiol. 67, 161-172.

Wang, H. C. and Ma, Y. B., 2010. Experimental models of traumatic axonal injury. J Clin Neurosci. 17, 157-162.

Wang, H. Y., Lee, D. H., D'Andrea, M. R., Peterson, P. A., Shank, R. P. and Reitz, A. B., 2000. beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. J Biol Chem. 275, 5626-5632.

Wang, K. K., Larner, S. F., Robinson, G. and Hayes, R. L., 2006. Neuroprotection targets after traumatic brain injury. Curr Opin Neurol. 19, 514-519.

Wang, P., Myers, J. G., Wu, P., Cheewatrakoolpong, B., Egan, R. W. and Billah, M. M., 1997. Expression, purification, and characterization of human cAMP-specific phosphodiesterase (PDE4) subtypes A, B, C, and D. Biochem Biophys Res Commun. 234, 320-324.

Wang, X., Mori, T., Jung, J. C., Fini, M. E. and Lo, E. H., 2002b. Secretion of matrix metalloproteinase-2 and -9 after mechanical trauma injury in rat cortical cultures and involvement of MAP kinase. J Neurotrauma. 19, 615-625.

Wardlaw, J. M., Easton, V. J. and Statham, P., 2002. Which CT features help predict outcome after head injury? J Neurol Neurosurg Psychiatry. 72, 188-192; discussion 151.

Wasserman, J. K. and Schlichter, L. C., 2007a. Minocycline protects the blood-brain barrier and reduces edema following intracerebral hemorrhage in the rat. Exp Neurol. 207, 227-237.

Wasserman, J. K. and Schlichter, L. C., 2007b. Neuron death and inflammation in a rat model of intracerebral hemorrhage: effects of delayed minocycline treatment. Brain Res. 1136, 208-218.

Wasserman, L., Shaw, T., Vu, M., Ko, C., Bollegala, D. and Bhalerao, S., 2008. An overview of traumatic brain injury and suicide. Brain Inj. 22, 811-819.

Weber, J. T., 2012. Altered calcium signaling following traumatic brain injury. Front Pharmacol. 3, 60.

Weidemann, A., Konig, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L. and Beyreuther, K., 1989. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. Cell. 57, 115-126.

Wells, J. E., Hurlbert, R. J., Fehlings, M. G. and Yong, V. W., 2003. Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. Brain. 126, 1628-1637.

Weng, Y. C. and Kriz, J., 2007. Differential neuroprotective effects of a minocycline-based drug cocktail in transient and permanent focal cerebral ischemia. Exp Neurol. 204, 433-442.

Werner, C. and Engelhard, K., 2007. Pathophysiology of traumatic brain injury. Br J Anaesth. 99, 4-9.

Weskamp, G., Cai, H., Brodie, T. A., Higashyama, S., Manova, K., Ludwig, T. and Blobel, C. P., 2002. Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. Mol Cell Biol. 22, 1537-1544.

Weyer, S. W., Klevanski, M., Delekate, A., Voikar, V., Aydin, D., Hick, M., Filippov, M., Drost, N., Schaller, K. L., Saar, M., Vogt, M. A., Gass, P., Samanta, A., Jaschke, A., Korte, M., Wolfer, D. P., Caldwell, J. H. and Muller, U. C., 2011. APP and APLP2 are essential at PNS and CNS synapses for transmission, spatial learning and LTP. Embo J. 30, 2266-2280.

Whalen, M. J., Carlos, T. M., Kochanek, P. M., Clark, R. S., Heineman, S., Schiding, J. K., Franicola, D., Memarzadeh, F., Lo, W., Marion, D. W. and Dekosky, S. T., 1999. Neutrophils do not mediate blood-brain barrier permeability early after controlled cortical impact in rats. J Neurotrauma. 16, 583-594.

Whitaker, C. M., Beaumont, E., Wells, M. J., Magnuson, D. S., Hetman, M. and Onifer, S. M., 2008. Rolipram attenuates acute oligodendrocyte death in the adult rat ventrolateral funiculus following contusive cervical spinal cord injury. Neurosci Lett. 438, 200-204.

Whiteman, M. and Halliwell, B., 1997. Prevention of peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and inactivation of alpha1-antiproteinase by antibiotics. Free Radic Res. 26, 49-56.

Williams, A. J., Wei, H. H., Dave, J. R. and Tortella, F. C., 2007. Acute and delayed neuroinflammatory response following experimental penetrating ballistic brain injury in the rat. J Neuroinflammation. 4, 17.

Williams, M. and Risley, E. A., 1979. Enhancement of the binding of 3H-diazepam to rat brain membranes in vitro by SQ 20009, A novel anxiolytic, gamma-aminobutyric acid (GABA) and muscimol. Life Sci. 24, 833-841.

Williams, R. H., Little, S. A. and Ensinck, J. W., 1969. Adenyl cyclase and phosphodiesterase activities in brain areas of man, monkey and rat. Am J Med Sci. 258, 190-202.

Winter, C. D., Pringle, A. K., Clough, G. F. and Church, M. K., 2004. Raised parenchymal interleukin-6 levels correlate with improved outcome after traumatic brain injury. Brain.

127, 315-320.

Wright, D. W., Kellermann, A. L., Hertzberg, V. S., Clark, P. L., Frankel, M., Goldstein, F. C., Salomone, J. P., Dent, L. L., Harris, O. A., Ander, D. S., Lowery, D. W., Patel, M. M., Denson, D. D., Gordon, A. B., Wald, M. M., Gupta, S., Hoffman, S. W. and Stein, D. G., 2007. ProTECT: a randomized clinical trial of progesterone for acute traumatic brain injury. Ann Emerg Med. 49, 391-402, 402 e391-392.

Wu, C., Chen, P., Yu, H., Liu, Q., Zong, X., Cai, H. and Wang, P., 2009a. A novel biomimetic olfactory-based biosensor for single olfactory sensory neuron monitoring. Biosens Bioelectron. 24, 1498-1502.

Wu, D. C., Jackson-Lewis, V., Vila, M., Tieu, K., Teismann, P., Vadseth, C., Choi, D. K., Ischiropoulos, H. and Przedborski, S., 2002. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. J Neurosci. 22, 1763-1771.

Wu, J., Yang, S., Hua, Y., Liu, W., Keep, R. F. and Xi, G., 2010. Minocycline attenuates brain edema, brain atrophy and neurological deficits after intracerebral hemorrhage. Acta Neurochir Suppl. 106, 147-150.

Wu, J., Yang, S., Xi, G., Fu, G., Keep, R. F. and Hua, Y., 2009b. Minocycline reduces intracerebral hemorrhage-induced brain injury. Neurol Res. 31, 183-188.

Xiao, G., Wei, J., Yan, W., Wang, W. and Lu, Z., 2008. Improved outcomes from the administration of progesterone for patients with acute severe traumatic brain injury: a randomized controlled trial. Crit Care. 12, R61.

Xiong, Y., Mahmood, A. and Chopp, M., 2009. Emerging treatments for traumatic brain injury. Expert Opin Emerg Drugs. 14, 67-84.

Xu, L., Fagan, S. C., Waller, J. L., Edwards, D., Borlongan, C. V., Zheng, J., Hill, W. D., Feuerstein, G. and Hess, D. C., 2004. Low dose intravenous minocycline is neuroprotective after middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats. BMC Neurol. 4, 7.

Yamashita, N., Hayashi, A., Baba, J. and Sawa, A., 1997. Rolipram, a phosphodiesterase-4-selective inhibitor, promotes the survival of cultured rat dopaminergic neurons. Jpn J Pharmacol. 75, 155-159.

Yamori, Y., Horie, R., Handa, H., Sato, M. and Fukase, M., 1976. Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. Stroke. 7, 46-53.

Yang, L., Sugama, S., Chirichigno, J. W., Gregorio, J., Lorenzl, S., Shin, D. H., Browne, S. E., Shimizu, Y., Joh, T. H., Beal, M. F. and Albers, D. S., 2003. Minocycline enhances MPTP toxicity to dopaminergic neurons. J Neurosci Res. 74, 278-285.

Yang, P., Baker, K. A. and Hagg, T., 2006. The ADAMs family: coordinators of nervous system development, plasticity and repair. Prog Neurobiol. 79, 73-94.

Yao, P. L., Tsai, M. F., Lin, Y. C., Wang, C. H., Liao, W. Y., Chen, J. J. and Yang, P. C., 2005. Global expression profiling of theophylline response genes in macrophages: evidence of airway anti-inflammatory regulation. Respir Res. 6, 89.

Yatsiv, I., Grigoriadis, N., Simeonidou, C., Stahel, P. F., Schmidt, O. I., Alexandrovitch, A. G., Tsenter, J. and Shohami, E., 2005. Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. Faseb J. 19, 1701-1703.

Yenari, M. A., Xu, L., Tang, X. N., Qiao, Y. and Giffard, R. G., 2006. Microglia potentiate damage to blood-brain barrier constituents: improvement by minocycline in vivo and in vitro. Stroke. 37, 1087-1093.

Yong, V. W., Power, C., Forsyth, P. and Edwards, D. R., 2001. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. Nat Rev Neurosci. 2, 502-511.

Youdim, M. B., Maruyama, W. and Naoi, M., 2005. Neuropharmacological, neuroprotective and amyloid precursor processing properties of selective MAO-B inhibitor antiparkinsonian drug, rasagiline. Drugs Today (Barc). 41, 369-391.

Young-Pearse, T. L., Chen, A. C., Chang, R., Marquez, C. and Selkoe, D. J., 2008. Secreted APP regulates the function of full-length APP in neurite outgrowth through interaction with integrin beta1. Neural Dev. 3, 15.

Yrjanheikki, J., Keinanen, R., Pellikka, M., Hokfelt, T. and Koistinaho, J., 1998. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 95, 15769-15774.

Yrjanheikki, J., Tikka, T., Keinanen, R., Goldsteins, G., Chan, P. H. and Koistinaho, J., 1999. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. Proc Natl Acad Sci U S A. 96, 13496-13500.

Yuan, P., Tragon, T., Xia, M., Leclair, C. A., Skoumbourdis, A. P., Zheng, W., Thomas, C. J., Huang, R., Austin, C. P., Chen, G. and Guitart, X., 2011. Phosphodiesterase 4 inhibitors enhance sexual pleasure-seeking activity in rodents. Pharmacol Biochem Behav. 98, 349-355.

Yurkewicz, L., Weaver, J., Bullock, M. R. and Marshall, L. F., 2005. The effect of the selective NMDA receptor antagonist traxoprodil in the treatment of traumatic brain injury. J Neurotrauma. 22, 1428-1443.

Zabad, R. K., Metz, L. M., Todoruk, T. R., Zhang, Y., Mitchell, J. R., Yeung, M., Patry, D. G., Bell, R. B. and Yong, V. W., 2007. The clinical response to minocycline in multiple sclerosis is accompanied by beneficial immune changes: a pilot study. Mult Scler. 13, 517-526.

Zeller, E., Stief, H. J., Pflug, B. and Sastre-y-Hernandez, M., 1984. Results of a phase II study of the antidepressant effect of rolipram. Pharmacopsychiatry. 17, 188-190.

Zemke, D. and Majid, A., 2004. The potential of minocycline for neuroprotection in human neurologic disease. Clin Neuropharmacol. 27, 293-298.

Zhang, S., Huang, Y., Zhu, Y. C. and Yao, T., 2005. Estrogen stimulates release of secreted amyloid precursor protein from primary rat cortical neurons via protein kinase C pathway. Acta Pharmacol Sin. 26, 171-176.

Zhang, W., Narayanan, M. and Friedlander, R. M., 2003. Additive neuroprotective effects of minocycline with creatine in a mouse model of ALS. Ann Neurol. 53, 267-270.

Zhang, Y., Metz, L. M., Yong, V. W., Bell, R. B., Yeung, M., Patry, D. G. and Mitchell, J. R., 2008. Pilot study of minocycline in relapsing-remitting multiple sclerosis. Can J Neurol Sci. 35, 185-191.

Zhao, F., Hua, Y., He, Y., Keep, R. F. and Xi, G., 2011. Minocycline-induced attenuation of iron overload and brain injury after experimental intracerebral hemorrhage. Stroke. 42, 3587-3593.

Zhu, S., Stavrovskaya, I. G., Drozda, M., Kim, B. Y., Ona, V., Li, M., Sarang, S., Liu, A. S., Hartley, D. M., Wu, D. C., Gullans, S., Ferrante, R. J., Przedborski, S., Kristal, B. S. and Friedlander, R. M., 2002. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. Nature. 417, 74-78.

Ziebell, J. M. and Morganti-Kossmann, M. C., 2010. Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. Neurotherapeutics. 7, 22-30.

Zueger, M., Urani, A., Chourbaji, S., Zacher, C., Roche, M., Harkin, A. and Gass, P., 2005. Olfactory bulbectomy in mice induces alterations in exploratory behavior. Neurosci Lett. 374, 142-146.

RESUMÉ

La gravité du traumatisme crânien (TC) dépend de la sévérité immédiate des lésions primaires mais également de leur aggravation dans les heures et les jours qui suivent le TC, avec l'apparition de lésions secondaires. La neuro-inflammation constitue l'une des cascades physiopathologiques post-TC dont le contrôle a été décrit comme une stratégie neuroprotectice potentielle. Elle compromet le taux de la forme soluble α du précurseur du peptide ß amyloÏde, sAPPα, un neuroprotecteur endogène issu de l'action des enzymes α-sécrétases (ADAMs). Dans ce contexte, mon travail de thèse a eu pour but d'étudier l'intérêt thérapeutique des composés pharmacologiques modulant le taux de sAPPα post-TC sur les conséquences biochimiques, histopathologiques et fonctionnelles, à court et à long terme, dans un modèle de TC par percussion mécanique chez la souris. Parmi les différents composés, la minocycline, une tetracycline de 2e génération aux effets anti-inflammatoires, et l'étazolate, une pyrazolopyridine récemment décrite comme activateur des α-sécrétases, ont été sélectionnés. Le traitement anti-inflammatoire par la minocycline permet de restaurer le taux de la sAPPα, et cet effet dans la phase précoce est accompagné d'une réduction des conséquences histopathologiques (atrophie callosale et striatale, lésion des bulbes olfactifs et ventriculomégalie) à 3 mois post-TC. Sur le plan fonctionnel, le test d'aversion olfactive a été pour la première fois mis au point sur un modèle expérimental de TC et a permis de révéler un déficit olfactif persistant dans notre modèle. De plus, un déficit cognitif persistant a été également mis en évidence par le test NORT « *Novel Object Recognition Test* ». Le même traitement par la minocycline a permis de corriger ces déficits olfactif et cognitif à court et à long terme (3 mois) post-TC. Les résultats obtenus sur l'étazolate (étude de fenêtre thérapeutique, étude d'effet-dose) ont montré, pour la première fois dans un modèle de lésion cérébrale, son potentiel anti-inflammatoire et anti-œdémateux, associé à la restauration du taux de la sAPPα, avec une fenêtre thérapeutique d'au moins de 2h. Le même traitement réduit les conséquences histopathologiques (activation microgliale, ventriculomégalie, lésion des bulbes olfactives) et fonctionnelles (hyperactivité locomotrice, déficit cognitif), à court à long terme (3 mois) post-TC. En conclusion, l'ensemble de ce travail a permis d'établir les bénéfices d'une stratégie pharmacologique s'opposant à la fois à la neuro-inflammation et à la chute du taux de la sAPPα dans la phase précoce de TC avec une amélioration histologique et fonctionnelle à long terme, soulignant son intérêt thérapeutique. Il est important de souligner que la minocycline est déjà entrée en essai clinique pour le traitement de TC, et que malgré le peu de données précliniques, l'étazolate (EHT-0202) est tout récemment entré en phase II pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

DISCIPLINE : Neuropharmacologie

MOTS CLÉS :

Traumatisme crânien	Hyperactivité locomotrice
Œdème cérébral	Déficit olfactif
Neuro-inflammation	Déficit cognitif
Activation microgliale	Minocycline
sAPPα	Etazolate