



Evaluation d'un peptide de synthèse dans la réparation des lésions traumatiques de la substance blanche.

Laurent Sakka

► To cite this version:

Laurent Sakka. Evaluation d'un peptide de synthèse dans la réparation des lésions traumatiques de la substance blanche.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2015. Français. NNT : 2015CLF1S001 . tel-01889251

HAL Id: tel-01889251

<https://theses.hal.science/tel-01889251>

Submitted on 5 Oct 2018

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.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

UNIVERSITE D'Auvergne

Année 2015

N° d'ordre

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
 N° d'ordre

Présentée à l'Université d'Auvergne
 pour l'obtention du grade de DOCTEUR
 (Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Neurosciences

soutenue le 16 janvier 2015

par

Laurent SAKKA

Evaluation d'un peptide de synthèse dans la réparation des lésions traumatiques de la substance blanche.

Thèse codirigée par le Dr Stéphane Gobron et le Pr Jean-Jacques Lemaire

M. Jean CHAZAL	PUPH Université d'Auvergne	Président
Mme Marie-Odile JAUBERTEAU	PUPH Université de Limoges	Rapporteur
M. Stéphane VELUT	PUPH Université de Tours	Rapporteur
M. Paul AVAN	PUPH Université d'Auvergne	Examineur
M. Stéphane GOBRON	Directeur de Neuronax, Saint-Beauzire	Examineur
M. Fabrice LALLOUE	MCU Université de Limoges	Examineur
M. Jean-Jacques LEMAIRE	PUPH Université d'Auvergne	Examineur

IGCNC, EA7282, Université d'Auvergne

Remerciements

A M. Le professeur Jean CHAZAL
Directeur du Laboratoire d'Anatomie
Doyen de la faculté de médecine

Je vous remercie pour l'intérêt et le soutien constants que vous avez apportés à notre projet pour qu'il puisse voir le jour. Ce travail représente finalement la concrétisation de cette idée d'ouverture de la recherche académique à la recherche industrielle que vous avez toujours prônée et qui est une source d'enrichissement mutuel. Neurochirurgien, anatomiste et surtout homme de culture, vous faites évoluer les choses. Grâce à vous notre laboratoire d'anatomie change de physionomie. Il se modernise, il s'étoffe en compétences, il va de l'avant. Merci de l'honneur que vous m'accorder en acceptant la présidence de ce jury de thèse. Merci pour votre amitié.

A Mme le Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU
Directrice du Laboratoire d'immunologie, l'EA3842, Homéostasie cellulaire et pathologies, Limoges

Je vous remercie d'accepter d'être rapporteur de mon travail de thèse. Votre avis est d'autant plus enrichissant que votre expertise porte sur des thématiques proches de la notre.

A M. le Professeur Stéphane VELUT
Directeur du Laboratoire d'Anatomie, Faculté de Médecine de Tours

Je te remercie infiniment d'accepter de participer à ce jury et d'être rapporteur de mon travail de thèse. Ton avis est d'autant plus pertinent que nous connaissons ton expertise sur l'anatomie de la structure blanche.

A M. Le professeur Paul AVAN
Directeur du Laboratoire de Biophysique Sensorielle, INSERM, UMR 1107,
Clermont-Ferrand

Je vous remercie d'accepter de participer à ce jury de thèse. Merci pour ces années de travail en commun. Chaque réunion de travail est un moment privilégié, une bouffée d'oxygène. Nous discutons souvent de vous, avec Jean Gabrillargues. Et on se dit qu'on a une chance inouïe de connaître quelqu'un de brillant, avec une telle ouverture d'esprit et une telle simplicité.

A M. Fabrice LALLOUE
Laboratoire d'Immunologie, EA3842, Homéostasie cellulaire et pathologies,
Limoges

Je vous remercie d'accepter de faire partie du jury de ce travail de thèse. Votre avis est d'autant plus important que notre sujet de thèse rejoint vos thématiques de recherche sur le peptide NX210, les voies de signalisation et les facteurs de croissance.

A M. Le professeur Jean-Jacques LEMAIRE
Directeur de l'EA7282, Image Guided Clinical Neurosciences and
Connectomics, Clermont-Ferrand

Ce travail a commencé sous ton impulsion et grâce à ce poste interface entre le CNRS et le CHU pour lequel tu as bataillé. Au sein de l'équipe IGCNC, je suis un peu le seul à faire de la biologie... Ma formation ne me destinait pas naturellement à la biologie moléculaire et à l'immunohistochimie, mais je dois reconnaître que ces facettes supplémentaires acquises grâce à toi ouvrent des champs d'investigation formidables.

A M. Stéphane GOBRON
Directeur de l'entreprise Neuronax, Saint-Beauzire

Je ne sais pas comment te remercier... Jean-Jacques nous a d'abord mis en contact. Tout nous opposait : un industriel vs un académique, un moléculiste vs macroscopiste, un fondamentaliste vs un chirurgien avec un peu de culture fondamentale. On a rapidement appris à parler le même langage, à travailler ensemble en gardant nos spécificités. Les journées et les soirées de travail se sont enchaînées pour conceptualiser nos thématiques de recherche, préparer nos demandes de financements, nos présentations au conseil régional, au département, à Clermont-communauté, au

Feder, aux investisseurs privés, aux associations. Grâce à toi, j'ai bien appris de la « bio mol » en formation accélérée mais aussi cet autre aspect de la recherche auquel aucun enseignant-chercheur n'est jamais formé : son financement, qui prend plus de temps que la paille. Jean Chazal ne cesse d'exorter les universitaires à « abattre les cloisons et apprendre à travailler ensemble ». Le résultat est là : des projets pour des années.

**A Mme Françoise MARILLIA, Vice-Présidente de l'UdA,
et à Mme Estèle TOURNIER, Clermont-Communauté**

Grâce à vos conseils précieux, grâce à la confiance et au soutien dont vous nous avez témoigné dès le début de notre programme de recherche, alors qu'il était encore à l'état d'ébauche, nous avons pu obtenir les financements qui ont permis la concrétisation de notre projet.

**A M. le Professeur Bernard IRTUM
Chef du service de Neurochirurgie, CHU de Clermont-Ferrand**

Je vous remercie de votre soutien et votre enthousiasme pour notre travail de recherche, et de votre implication dans l'élaboration de notre essai clinique.

A Viorel ACHIM, Kader CHABANE, Guillaume COLL, Aurélien COSTE, Toufic KHALIL et Denis SINARDET

Mes collègues neurochirurgiens, qui se sont partagé mes gardes et mes consultations pendant mes deux années de recherche à plein temps.

A Jean-Marc GARCIER et Marc FILAIRE

Merci à tous les deux pour votre amitié, votre soutien professionnel et l'atmosphère privilégiée qui règne au laboratoire d'anatomie.

A M. le Professeur Alain ESCHALLIER

Je vous suis infiniment reconnaissant d'avoir rendu possible cette collaboration précieuse avec Maryse Chalus ingénieur de recherche en expérimentation animale.

A Nathalie DELETTAGE, Maryse CHALUS et Amélie DUVAL

Je vous remercie de votre implication dans le travail de recherche. Vous avez été indispensables !

A Jean GABRILLARGUES

Toujours présent, toujours efficace, un ami véritable.

A Sylvain SANTONI et Jean-Cristophe LEGARS

Aux Professeurs Guy VANNEUVILLE et Georges ESCANDE

Anciens Directeurs du Laboratoire d'Anatomie, vous m'avez formé et soutenu tout au cours de mon cursus anatomique. Je vous dois beaucoup, ce que je suis, et notamment votre amitiés.

Aux professeurs Jean-Michel Rogez et Roger Robert,

Chirurgiens et anatomistes, vous avez créé à Nantes une grande école d'anatomie, fondée sur cette étroite complémentarité entre la recherche, la pédagogie et l'application clinique. Je vous remercie pour votre amitié et votre soutien au cours de mon cursus anatomique.

A Elizabeth VITTE

Je te dois ma carrière anatomique. Merci de ton soutien infailible et de ton amitié. Merci de t'être battue seule pour moi.

A Fleur, Louis et Jean

A mes parents, à Florence et Isabelle, à Pauline, Benjamin et Manon.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Introduction

Etude bibliographique

I) Physiopathologie des lésions traumatiques de la substance blanche du SNC

A) La lésion primaire

1) Le traumatisme cérébral

2) Le traumatisme médullaire

B) Les lésions secondaires

1) Les événements métaboliques et cytologiques de la phase aiguë

1.1 Les lésions histologiques

1.2 Le métabolisme glucidique.

1.3 Les troubles de l'équilibre ionique.

1.4 L'excitotoxicité.

1.5 La production de radicaux libres.

1.6 La rupture de la barrière hémato-encéphalique.

1.7 La réaction inflammatoire et immune.

1.8 Les phénomènes de morts cellulaires par nécrose et apoptose.

1.9 La démyélinisation.

2) La cinétique des lésions anatomopathologiques cérébrales

2.1 La phase aiguë

2.2 La phase subaiguë

2.3 La phase chronique

3) L'apport des modèles de lésion médullaire

3.1 Modifications histologiques

3.2 Modifications cytologiques

3.2.1 Les altérations cytosquelettiques

3.2.2 Les altérations du fonctionnement axonal

3.2.3 Les lésions de la gaine de myéline

3.2.4 Les oligodendrocytes et les cellules de Schwann

C) La persistance de lésions évolutives à distance

1) La lésion cérébrale

2) La lésion médullaire

II) La réparation de la substance blanche et ses obstacles

A) Les exemples de régénération spontanée

1) Chez le zebrafish

2) Chez les amphibiens

2.1 La régénération de la moelle spinale

2.2 La régénération de l'encéphale

3) Au cours de la période néonatale chez les mammifères et l'homme

3.1 Chez les mammifères marsupiaux

3.2 Chez l'homme

B) La régénération de la substance blanche chez les mammifères et l'homme adultes.

1) Les cellules souches neurales

1.1 Les niches à cellules souches dans le cerveau adulte

1.2 Les cellules souches dans la moelle spinale

1.3 Les facteurs moléculaires du recrutement cellulaire

1.3.1 Les laminines

1.3.2 Les protéoglycanes

1.3.3 Les ténascines

1.3.4 La reeline

2) La croissance et le guidage de l'axone

2.1 L'inhibition du cône de croissance

2.2 Les inhibiteurs associés à la myéline

2.2.1 Nogo

2.2.2 MAG

2.2.3 OMgp

2.2.4 Mécanismes d'action

2.3 La matrice extracellulaire et la cicatrice gliale

2.3.1 Les CSPG

2.3.2 Les laminines

2.3.3 Facteurs sécrétés par les fibroblastes et les cellules méningées

2.3.3.1 Les sémaphorines

2.3.3.2 Les éphrines

2.3.4 Nétrines et slits

2.3.5 Les protéines thrombospondines type-1 repeat (TSR)

3) La synaptogenèse

3.1 Les CSPG

3.2 La reeline

3.3 Les thrombospondines

4) La myélinisation

4.1 Les oligodendrocytes

4.2 Les intégrines

4.3 La ténascine-R

C) La plasticité de la substance blanche ou plasticité myélinique

III) Les approches thérapeutiques

A) Les approches pharmacologiques ou moléculaires

1) La neuroprotection

1.1 Les agents anti-apoptotiques

1.2 Les inhibiteurs de l'excitotoxicité et de l'inflammation

2) La neurorégénération : axonogenèse et synaptogenèse

2.1 Le blocage des inhibiteurs associés à la myéline

2.2 Le blocage des inhibiteurs associés à la cicatrice gliale

2.2 Les facteurs de croissance

B) Les approches cellulaires**C) Le NX210****1) La SCO Spondine**

1.1 La Sécrétion

1.2 La structure moléculaire

1.3 Propriétés biologiques de la SCO-Spondine et de ses peptides dérivés

2) Le NX210

2.1 Caractérisation chimique

2.2 Propriétés biologiques

Objectifs de l'étude**Partie expérimentale****I) Matériel et méthode****1) Le composé pharmacologique****2) Effet neuroprotecteur du NX210 sur le stress oxydatif *in vitro*.****3) Effet neuroprotecteur du NX210 sur l'apoptose par mesure de l'activité des caspases 3/7****4) Effet du NX210 dans le traumatisme médullaire chez le rat**

4.1. Animaux

4.2. Modèles animaux et procédure chirurgicale

4.2.1 Effets sur la croissance neuritique *in vivo*

4.2.2 Effets sur le recouvrement fonctionnel après lésion médullaire

5) Etude du recrutement cellulaire après lésion du corps calleux

5.1 Animaux

5.2 Procédure expérimentale

5.2.1 Organisation des lots

5.2.2 Procédure chirurgicale

5.3 Coloration à l'or colloïdal

5.4 Immunohistochimie

6) Quantification et analyse statistique**II) Résultats****1) Effet neuroprotecteur du NX210 sur le stress oxydatif *in vitro***

1.1 Evaluation de la viabilité cellulaire par le test WST-1

1.2 Evaluation de la viabilité cellulaire au rouge neutre

1.3 Evaluation de l'apoptose par l'activité des Caspases 3/7

2) Effets du NX210 sur la croissance neuritique *in vivo***3) Effets du NX210 sur le recouvrement fonctionnel****4) Etude du recrutement cellulaire dans une lésion du corps calleux****Discussion****Conclusions et perspectives****Annexe****Références bibliographiques**

Liste des abréviations

ApoER : apolipoprotein E receptor
 APP : amyloid precursor protein
 Arp2/3 : actin-related proteins 2/3
 ATP : adénosine triphosphate
 BDNF : brain-derived neurotrophic factor
 BHE : barrière hémato-encéphalique
 BMP : bone morphogenic protein
 CNR1 : cadherin-related neuronal receptor-1
 CSPG : chondroitin sulfate proteoglycans
 DCX : doublecortin, doublin ou lissencephalin-X
 DG : gyrus denté
 DMEM : Dulbecco's modified eagle medium
 ECT : encéphalopathie traumatique chronique
 EGFL : epidermal growth factor-like
 EGFLR : epidermal growth factor-like repeat
 FGF : fibroblast growth factor
 FNIII : fibronectin type III repeat
 FN6-8 : fibronectin type III homologous domains 6-8
 GD : gyrus denté
 GFAP : glial fibrillary acidic protein
 HSPG : heparan sulfate proteoglycans
 HTIC : hypertension intracrânienne
 ICAM-1 : intercellular adhesion molecule-1
 IGF : insulin like growth factor
 L1CAM : L1 cell adhesion molecule
 MAG : myelin-associated glycoprotein
 MAI : myelin associated inhibitor
 MAP : microtubule associated protein (MAP1B : microtubule-associated protein 1B)
 MBP : myelin basic protein
 MCP : monocyte chemoattractant protein
 MMP : matrix metalloproteinase
 NF : neurofilament
 NG2 : neural/glial antigen 2
 NMDA : N-Methyl-D-aspartate
 NRG : neuréguline
 NRT : neurotrophine
 OMgp : oligodendrocyte myelin glycoprotein

OPC : oligodendrocyte progenitor cell
OSC : organe subcommissural
P75NRT : récepteur p75 aux Neurotrophines
PDGF : platelet-derived growth factor
PDGFR α : platelet-derived growth factor receptor α
PirB : paired immunoglobulin-like receptorB
PLP : proteolipid protein
PNN : perineural net
PSA-NCAM : polysialic acid - neural cell adhesion molecule
Récepteur AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor
Récepteur NMDA : N-methyl-D-aspartate receptor
RNS : reactive nitrogen species
ROS : reactive oxygen species
SCI : spinal cord injury
SGZ : subgranular zone
SHH : sonic hedgehog
SNC : système nerveux central
TBI : traumatic brain injury
TN : télescine
TNF : tumor necrosis factor
TSP : thrombospondine
TSR : thrombospondin repeat
VLDLR : very low-density lipoprotein receptor
VEGF : vascular endothelial growth factor
WST : water soluble tetrazolium
ZSV : zone subventriculaire

Liste des figures

Figure 1. Traumatisme cérébral. Les destructions tissulaires de la lésion primaire conduisent à l'œdème et à l'HTIC.

Figure 2. Phase aiguë du traumatisme cérébral. Production de cytokines, œdème cérébral et morts cellulaires

Figure 3. Les troubles du métabolisme glucidique

Figure 4. La production de radicaux libres.

Figure 5. L'influx calcique génère simultanément trois cascades d'événements intracellulaires conduisant à la nécrose ou à l'apoptose

Figure 6. Distinctions schématiques entre les mécanismes nécrotiques et apoptotiques

Figure 7. Cinétique des événements métaboliques et cytologiques de la lésion secondaire du traumatisme cérébral.

Figure 8. Les niches à cellules souches chez les rongeurs.

Figure 9. La zone subventriculaire chez l'homme.

Figure 10. Représentation schématique d'une CSPG et de ses sites d'interaction.

Figure 11. Régulation du comportement cellulaire par les CSPG de la matrice extracellulaire.

Figure 12. La structure du cône de croissance.

Figure 13. Les 3 étapes de la croissance axonale.

Figure 14. La dynamique cytosquelettique.

Figure 15. Structure moléculaire de Nogo, sites de fixation, effets biologiques.

Figure 16. Mécanisme d'action des MAI. Collapsus du cône de croissance.

Figure 17. Mode d'action des CSPG. Interaction avec les MAI.

Figure 18. Intervention des GTPases RhoA, rac1 et CDC42, dans la régulation du fonctionnement du cône de croissance.

Figure 19. Organisation des gènes codant pour les thrombospondines.

Figure 20. Sites d'interaction des TSP avec différents ligands de la matrice extracellulaire.

Figure 21. La structure de la SCO-spondine.

Figure 22. Le rôle des CSPG dans la stabilisation des réseaux synaptiques.

Figure 23. Les phases de la remyélinisation.

Figure 24. La plasticité de la substance blanche chez l'adulte.

Figure 25 : Axes de recherche dans le traitement des lésions médullaires traumatiques : cibles et mécanismes d'action.

Figure 26 : Axes de recherche dans le traitement des lésions cérébrales traumatiques : cibles et mécanismes d'action.

Figure 27. Réduction du WST-1 en formazan.

Figure 28. Evaluation de la locomotion chez le rat par le score de Basso, Beattie et Bresnahan.

Figure 29. Effet neuroprotecteur du NX210 sur le stress oxydatif. Evaluation de la viabilité cellulaire par le WST-1

Figure 30a. Effet neuroprotecteur du NX210 sur le stress oxydatif. Evaluation de la viabilité cellulaire au rouge neutre. Traitement par administration simultanée de NX210 et H₂O₂.

Figure 30b. Effet neuroprotecteur du NX210 sur le stress oxydatif. Evaluation de la viabilité cellulaire au rouge neutre. Traitement par NX210 avant administration d'H₂O₂.

Figure 31. Effet neuroprotecteur du NX210 sur le stress oxydatif. Evaluation de l'activité anti-apoptotique par mesure de l'activité des Caspases 3/7.

Figure 32. Effets du NX210 sur la croissance neuritique dans un modèle de lésion médullaire chez le rat.

Figure 33. Effets du NX210 sur le recouvrement fonctionnel après contusion médullaire chez le rat : Poids corporel.

Figure 34. Effets du NX210 sur le recouvrement fonctionnel après contusion médullaire chez le rat : score de BBB.

Figure 35 : Effets du NX210 sur le recouvrement fonctionnel après contusion médullaire chez le rat : open arena test.

Figure 36. Effets du NX210 sur le recouvrement fonctionnel après contusion médullaire chez le rat : étude des réflexes.

Figure 37. Le recrutement de cellules souches neurales par immunomarquage de la nestine.

Figure 38. Mise en évidence du recrutement de cellules de phénotype astrocytaire par comarquage de la nestine et de la GFAP.

Figure 39. Mise en évidence du recrutement de cellules neuronales par immunomarquage du NeuN.

Figure 40. Mise en évidence du recrutement de cellules myélinisantes par immunomarquage du NG2.

Figure 41. Effet scavenger potentiel du NX210.

Figure 42. Anatomie comparative des tractus ascendants et descendants de la moelle spinale chez le rat et l'homme.

Introduction

Les lésions traumatiques de la substance blanche du système nerveux central constituent un enjeu de santé publique. A l'étage encéphalique, elles constituent le principal substratum anatomique des séquelles neuropsychologiques qui compliquent près de 30% des traumatismes crâniens (Kinnunen et al, 2011 ; Mathe et al, 2005).

Les capacités de la substance blanche à se régénérer sont limitées chez l'adulte. Les modèles animaux montrent certes des images de réparation histologique, mais chez l'homme, elles ne sont pas suffisantes pour restituer la fonctionnalité du connectome détruit. Ainsi, l'amélioration neurologique qu'on peut constater chez certains patients après lésion cérébrale ou médullaire s'explique plus volontiers par la mise en jeu de phénomènes de plasticité corticale que par des phénomènes neurorégénératifs. Cela signifie que les dommages tissulaires et les troubles neurologiques qu'ils supportent sont généralement définitifs.

La substance blanche n'est pas pour autant une structure statique. Des expérimentations animales confirmées par des études d'imagerie en tenseur de diffusion chez l'homme montrent des phénomènes de plasticité myélinique grâce auxquels elle se remodèle en permanence sous l'action de facteurs environnementaux. Ces capacités de remodelage qui persistent tout au long de la vie, constituent des leviers d'action potentiels pour la recherche de traitements régénérateurs.

La physiopathologie des lésions traumatiques de la substance blanche est d'une extrême complexité comme en témoigne la diversité des modèles d'étude expérimentaux. De surcroît, les spécificités anatomiques et physiologiques de certains modèles rendent hasardeuse la transposition des résultats à l'homme. Cela doit conduire à extrapoler avec prudence les résultats obtenus chez l'animal. Surtout, cela peut expliquer pourquoi des résultats parfois prometteurs en phase préclinique donnent des résultats décevants en phase clinique (van der Staay 2009). La convergence de certains aspects physiopathologiques entre l'homme et l'animal justifie néanmoins le recours à ces modèles animaux : les modifications de l'environnement cellulaire par la lésion, l'inhibition de la repousse axonale, les anomalies de la myélinisation, avec en arrière-plan l'existence d'une réaction astrogliale prolongée.

Cette incapacité de la substance blanche adulte à régénérer *ad integrum* une structure pleinement fonctionnelle contraste avec les étonnantes capacités régénératrices de l'embryon. Ce constat établi chez tous les mammifères, nous a conduits à nous demander dans quelle mesure l'apport d'un morphogène embryonnaire à un organisme adulte pourrait contribuer à restaurer ces capacités régénératrices. Nous nous sommes donc intéressés à la SCO-Spondine, une glycoprotéine sécrétée précocement au cours de l'ontogenèse cérébrale par une différenciation sécrétoire de l'épendyme située à la jonction diencéphalo-mésencéphalique. Etonnamment conservée au cours de la phylogenèse, puisqu'on l'identifie chez tous les vertébrés et certains prochordés, elle constituerait un morphogène essentiel au développement du névraxe, en intervenant notamment dans la mise en place des commissures. Elle montre *in vitro* des propriétés particulièrement intéressantes pour une application dans le domaine des thérapies neuroréparatrices, en particulier, elle stimule les phénomènes d'adhésion cellulaire, la croissance axonale et la fasciculation.

Le NX210 est un peptide de douze acides aminés dérivé d'un domaine fonctionnel de la SCO-spondine, caractérisé et breveté par Neuronax, une entreprise spécialisée en pharmacologie *in vitro* implantée sur le site universitaire de Clermont-Ferrand. Les premiers tests *in vitro* du NX210 confirment l'intérêt thérapeutique que la molécule mère laissait entrevoir en favorisant notamment la synaptogenèse et la neuritogenèse.

L'objectif de notre travail est de compléter l'exploration du NX210 pour amener la molécule en phase clinique dans l'optique de réparer les lésions de la substance blanche du système nerveux central. Pour cela, nous avons soumis la molécule à des tests *in vitro* pour explorer ses capacités neuroprotectrices et à des tests *in vivo* pour explorer ses capacités de neuroréparation. L'étude de la repousse axonale et de son efficacité clinique a été réalisée sur deux modèles de lésion de la substance blanche médullaire. L'étude mécanistique sur le recrutement cellulaire a été réalisée sur un modèle de lésion de la substance blanche cérébrale.

Le programme expérimental a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe de recherche IGCNC, EA 7282, de l'Université d'Auvergne, dirigée par Jean-Jacques Lemaire et l'entreprise Neuronax dirigée par Stéphane Gobron.

Etude bibliographique

I) Physiopathologie des lésions traumatiques de la substance blanche du SNC

L'impact clinique des lésions traumatiques de la substance blanche est lié à l'intrication de deux caractéristiques physiopathologiques : (1) l'incapacité de la substance blanche à se régénérer spontanément ; (2) l'extension secondaire de la lésion tissulaire initiale au territoire sain adjacent. Les travaux historiques de Ramon y Cajal avaient montré que l'incapacité de la substance blanche à se régénérer n'était pas une propriété intrinsèque du neurone mais résultait de l'influence de l'environnement cellulaire (Ramon y Cajal, 1928). Une démonstration simple de ce concept fut plus tard apportée par Tello qui obtint la repousse d'un axone du système nerveux central après avoir greffé un neurone central dans un nerf périphérique (Tello, 1911).

Les mécanismes cellulaires et biochimiques expliquant comment l'environnement cellulaire pouvait être réfractaire à la réparation ont été étudiés *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux de traumatismes crâniens et médullaires. Ces approches expérimentales ont permis de distinguer deux phases lésionnelles successives : (1) une phase primaire où se constituent des lésions directement liées à l'impact traumatique, et (2) une phase secondaire d'extension suscitée par une cascade d'événements métaboliques.

A) La lésion primaire

La lésion primaire comprend les dommages tissulaires directement occasionnés par les forces de collision sur le tissu nerveux. Elle est liée aux caractéristiques anatomiques et biomécaniques du névraxe et de son enveloppe ostéoméningée crâniospinale. L'étage encéphalique et l'étage spinal présentent des propriétés biomécaniques distinctes, qui seront abordés succinctement, notre attention portant surtout aux événements moléculaires et cellulaires accessibles à la neuroprotection et à la neuroréparation.

1) Le traumatisme cérébral

Au cours du choc, l'enceinte crânienne vient brutalement comprimer le tissu cérébral sous-jacent à l'impact par un effet de coup, ou le tissu opposé à l'impact selon un mécanisme de contrecoup (Pudenz et al, 1946). Il en résulte des lésions de contusions parenchymateuses associant des déchirures, des sections ou des écrasements tissulaires à des ruptures vasculaires (Bao et al, 2003). On observe une destruction des fibres nerveuses, des pertes de neurones et d'oligodendrocytes. Les lésions vasculaires sont responsables d'une rupture de la barrière hémato-encéphalique, de la libération dans le milieu extracellulaire de molécules pro-inflammatoires et de l'extravasation de monocytes circulants (Andriessen et al, 2010).

L'accélération-décélération brutale de l'extrémité céphalique se répercute différemment sur les structures cérébrales selon leur fixité et leurs caractères biomécaniques, créant des forces de compression, de torsion et de cisaillement (Gentry et al, 1988). Celles-ci génèrent des lésions tissulaires diffuses au sein de la substance blanche cérébrale appelées « lésions axonales diffuses » (Adams et al, 1989). Elles se localisent, selon une sévérité croissante, dans (1) la substance blanche lobaire à l'interface entre la substance blanche et la substance grise, (2) le corps calleux, et (3) la substance blanche dorsolatérale de la partie rostrale du tronc cérébral (Adams et al, 1989 ; Gentry et al, 1994). Ces lésions sont associées à des altérations des vaisseaux responsables de lésions ischémiques et œdémateuses (Strich et al, 1956 ; Gennarelli et al, 1983).

La distinction entre lésions diffuses et focales est probablement artificielle. On constate en effet en clinique que les lésions focales coexistent avec les lésions diffuses chez près de 50% des traumatisés crâniens modérés à sévères (Skandsen et al, 2010). Sur le plan histologique, les lésions touchant le corps cellulaire des neurones sont décrites comme des lésions focales et celles touchant l'axone des mêmes neurones sont décrites comme des lésions diffuses. Les modèles animaux de traumatisme crânien montrent en réalité des phénomènes de morts neuronales à distance des lésions focales (Singleton et al, 2004) et des destructions axonales plus volontiers au sein des lésions focales (Wang et al, 2010).

Au plan cytotologique, il se produit un œdème cytotoxique avec un aspect de gonflement astrocytaire. Très précocement, la concentration extracellulaire en glutamate augmente, atteignant

jusqu'à 50 fois les valeurs physiologiques dans les foyers de contusions chez l'homme (Bullock et al, 1995, 1998). Cette augmentation peut résulter de la libération de glutamate par les pertes cellulaires ou provenir du dysfonctionnement des pompes ioniques ATP-dépendantes impactées par les troubles du métabolisme énergétique. La suractivation des récepteurs NMDA et AMPA par ce largage de glutamate entraîne un influx ionique massif ou « dépolarisation traumatique » conduisant à la mort des neurones et des cellules gliales (Park et al, 2004). L'inhibition de ce mécanisme cytotoxique appelé stress glutamatergique est un des objectifs des traitements neuroprotecteurs (Figure 1).

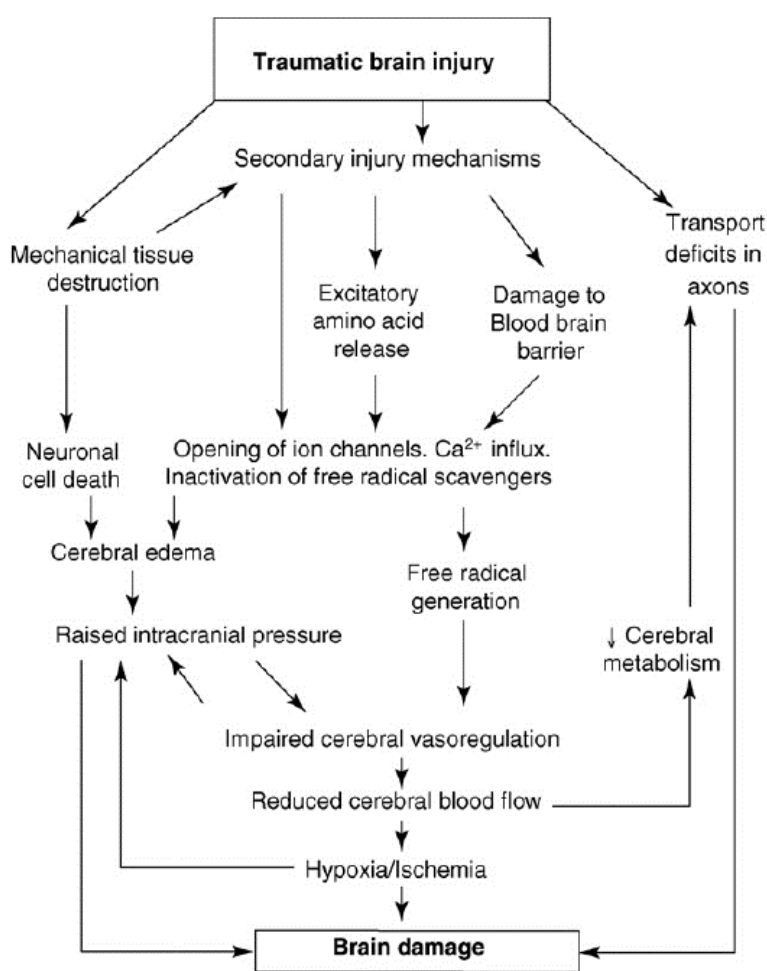


Figure 1. Traumatisme cérébral. Les destructions tissulaires de la lésion primaire conduisent à l'œdème et à l'HTIC. L'excitotoxicité des aminoacides, l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique, la cytotoxicité au calcium, l'œdème cytotoxique et l'ischémie sont les événements fondamentaux de la lésion secondaire (Jains et al, 2008).

La nature et la répartition des lésions sont déterminées par les caractéristiques biomécaniques du tissu nerveux, de l'enceinte crânienne et de leurs interactions. Ainsi, les lobes frontaux, les lobes temporaux (Bigler et al, 2007) et le corps calleux (Viano et al, 2005) sont particulièrement vulnérables. Les rapports étroits de l'hippocampe contre le bord libre de la tente du cervelet (Bigler et al, 2002) et ceux du corps calleux contre le bord libre de la faux du cerveau contribuent à expliquer les lésions mécaniques directes de l'hippocampe et du corps calleux impactés respectivement contre l'incisure de la tente du cervelet et le bord libre de la faux. Inversement, le thalamus serait protégé contre l'impact direct du traumatisme par sa localisation profonde (Fearing et al, 2008). Les lésions thalamiques constatées expérimentalement (Smith et al, 1997) et chez l'homme (Adams et al, 2001 ; Jennett et al, 2001) résulteraient de la dégénérescence rétrograde de ses connexions corticales à partir de zones de cortex lésées (Warner et al, 2010). Ces disparités expliquent pourquoi le choix du site anatomique n'est pas indifférent dans la mise au point des modèles d'étude expérimentale de contusion cérébrale traumatique.

2) Le traumatisme médullaire

La phase primaire de la lésion médullaire s'étale sur les deux premières heures suivant le traumatisme (Norenberg et al, 2004). La diversité des modèles expérimentaux, la multiplicité des mécanismes mis en jeu et leur intrication rendent difficile l'élaboration d'une vision synthétique de la physiopathologie.

Les modèles de section, d'aspiration (Duchossoy et al, 2001), de contusion par impact (Bresnahan 1987), de contusion par compression statique au moyen d'un clip (von Euler et al, 1997) ou d'un ballonnet (Tarlov et al, 1953) donnent chacun un éclairage différent des mécanismes physiopathologiques mis en jeu. Le modèle de contusion médullaire, le plus utilisé dans la littérature, semble reproduire le plus fidèlement les lésions histologiques rencontrées en traumatologie humaine (Metz et al, 2000). Les modèles par compression mimeraient plus fidèlement les lésions ischémiques constatées chez l'homme (Huang et al, 2007).

Les lésions anatomopathologiques associent des déchirures, des sections ou des écrasements tissulaires occasionnés par un fragment osseux, discal ou ligamentaire déplacé. Un mécanisme d'accélération-décélération peut également exister comme à l'étage encéphalique (Baptiste et al, 2006). Un œdème pan-médullaire coexiste avec des hémorragies de la substance

grise. Des lésions microvasculaires forment des pétéchies au sein de la substance blanche (Nashmi et al, 2001). La section anatomique complète du cordon médullaire est rarement constatée en clinique, le foyer lésionnel étant le plus souvent entouré d'une fine couche subpiaie d'axones épargnés par l'impact mécanique (Bunge et al, 1993). Ces axones, qui constituent le support anatomique des voies longues, présentent néanmoins d'importantes altérations de leur gaine de myéline (McDonald et al, 2006). La remyélinisation précoce de ces fibres intactes pourraient contribuer à expliquer les récupérations motrices spontanées classiquement constatées dans les modèles murins (Li et al, 1997 ; Bradbury et al, 2006). Ces axones passant en pont à travers le foyer de contusion constituent une cible intéressante pour la mise au point de stratégies régénératives.

Sur le plan cytologique, cette phase initiales est caractérisée par l'activation précoce des cellules microgliales qui surexpriment le TNF- α et l'IL- β (Donnelly et al, 2007 ; Pineau et al, 2007). Les lésions axonales et la mort de cellules neuronales et gliales succèdent à des ruptures membranaires d'origine mécanique.

B) La lésion secondaire

Les événements cellulaires et biochimiques de la phase secondaire sont similaires aux étages encéphalique et médullaire, certaines particularités sont probablement liées aux modèles expérimentaux. Ils ont surtout été étudiés sur des modèles murins de lésions cérébrales traumatiques et ischémiques (McIntosh et al, 1998 ; Lee et al, 1999).

1) Les événements métaboliques et cytologiques de la phase aiguë

Au cours de la phase aiguë précoce, qui s'étale de la deuxième à la quarante-huitième heure (Walker et al, 2009), se met en route la cascade d'événements physiopathologiques générant les lésions secondaires : les troubles du métabolisme glucidique et de l'équilibre ionique, l'excitotoxicité et la production de radicaux libres, la rupture de la barrière hémato-encéphalique, la réaction inflammatoire et les morts cellulaires par nécrose et apoptose. Chaque événement constitue une cible potentielle pour le développement d'agents neuroprotecteurs.

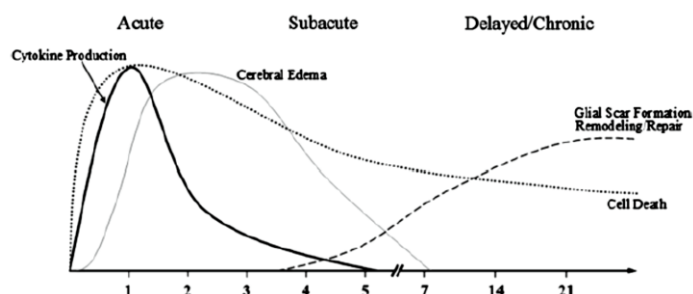


Figure 2. Phase aiguë du traumatisme cérébral. Production de cytokines, œdème cérébral et morts cellulaires (Walker et al, 2009)

1.1 Les lésions histologiques

Les lésions hémorragiques et œdémateuses sont liées à la dysrégulation de la microcirculation et à l'installation de la réaction inflammatoire. Elles créent une augmentation de la pression hydrostatique interstitielle et des lésions ischémiques qui majorent les destructions cellulaires et les lésions axonales de la phase primaire. L'ischémie persistante malgré l'intégrité des principaux axes artériels constitue le point central de la phase secondaire (Tator et al, 1991, 1997). Elle suscite un œdème cytotoxique qui touche les cellules gliales et les neurones avec pour conséquence le blocage des potentiels d'action (Kakulas et al, 2004). Des altérations du cytosquelette axonal entravent le transport axoplasmique de protéines qui s'accumulent dans l'axone, et des vésicules contenant les neurotransmetteurs susceptibles de provoquer des dégénérescences wallériennes (Jain et al, 2008).

1.2 Le métabolisme glucidique.

L'augmentation de la glycolyse anaérobie aux dépens du métabolisme oxydatif a été bien démontrée sur des modèles de traumatisme cérébral chez le rat (Casey et al, 2008). Confirmée par des études en PET scan au FDG chez l'homme, cette perturbation du métabolisme énergétique ne reste pas confinée au foyer traumatique, mais gagne progressivement l'ensemble du cerveau (Bergsneider et al, 1997) (Figure 3).

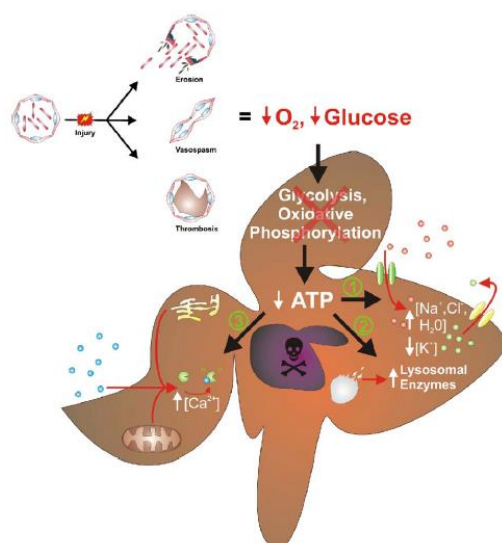


Figure 3. Les troubles du métabolisme glucidique.

L'hypo-oxygénation cérébrale majeure la glycolyse anaérobie aux dépens des phosphorylations oxydatives. L'appauvrissement en ATP qui en résulte (1) perturbe le fonctionnement des pompes ioniques (Na, Cl et K), dérègle l'équilibre ionique et altère la perméabilité membranaire, (2) conduit à la libération des enzymes lysosomiales avec lyse cellulaire (3) entraîne un influx calcique activant les protéases Ca dépendantes (Profyris et al, 2003).

Ce détournement du métabolisme glucidique vers la voie anaérobie épuise les réserves en ATP nécessaires au fonctionnement des pompes Na^+/K^+ et perturbe l'équilibre ionique (Unterberg et al, 2004). L'hypothermie pratiquée en neuroréanimation permet de ralentir le métabolisme énergétique et limiter l'épuisement des stocks en ATP (Laptook et al, 1995 ; McCullough et al, 1999).

1.3 Les troubles de l'équilibre ionique.

Les troubles de l'équilibre ionique, en particulier la dysrégulation des métabolismes sodique et calcique, majorent les lésions cytologiques. Ils conduisent à la mort cellulaire selon un double mécanisme nécrotique et apoptotique. Les voies métaboliques impliquées dans ces pertes cellulaires comprennent la production de radicaux libres, la suractivation des calpaïnes et des récepteurs au glutamate qui conduisent à des lésions mitochondriales (Andriessen 2010).

L'augmentation du Ca^{2+} extracellulaire active également les métalloprotéases de la matrice (MMP) en particulier la MMP-2 et la MMP-9. Constitutionnelles de certaines populations astrocytaires (MMP-2) et des phagocytes (MMP-9), leur surexpression lors de

lésions du SNC, conduit à une destruction du collagène de la membrane basale des endothéliums, dont il résulte une rupture de la barrière hémato-encéphalique et une majoration de la réaction inflammatoire. L'activation de ces MMP contribue également aux pertes neuronales de la lésion secondaire (Piao et al, 2014).

1.4 L'excitotoxicité.

L'élévation brutale de la teneur extracellulaire en glutamate dans les lésions cérébrales traumatiques a été mise en évidence sur des modèles animaux et confirmée chez l'homme (Bullock et al, 1995 ; Yi et al, 2006). Elle conduit à l'excitotoxicité des neurones dont elle perturbe le métabolisme cellulaire. La suractivation par le glutamate des récepteurs NMDA et non-NMDA, associée aux troubles de l'équilibre ionique, augmentent la perméabilité membranaire au Ca^{2+} créant un afflux massif de calcium dans les neurones. L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire active la voie des calpaïnes, protéases à cystéine Ca^{2+} dépendantes, dont il résulte une destruction des membranes cellulaires par protéolyse des spectrines (Buki et al, 1999). Ce phénomène d'excitotoxicité touche les cellules microgliales, les astrocytes de la substance blanche, les oligodendrocytes et la myéline. Il peut conduire à la nécrose ou à l'apoptose selon l'importance de la déplétion en ATP, qui dépend de l'intensité du traumatisme initial et de l'étendue de la lésion primaire (Nicotera et al, 1997).

L'expression par les OPC et la myéline de récepteurs au glutamate distincts explique une sensibilité différente au stress glutamatergique. Le corps cellulaire des OPC exprime en effet les récepteurs AMPA/kainate (Matute et al, 2002, Garcia-Barcina et al, 1990, 1998) tandis que la gaine de myéline exprime plus spécifiquement les récepteurs NMDA (Micu et al, 2006). Cela explique que la gaine de myéline puisse être la cible de l'excitotoxicité au glutamate selon des mécanismes direct et indirect. Le glutamate contenu dans le milieu extracellulaire ou libéré par l'axone en conditions d'ischémie, active les récepteurs NMDA de la myéline dont il déclenche directement la destruction (Micu et al, 2006 ; Stys et al, 2005). Il déclenche également indirectement la destruction de la myéline par la perte des oligodendrocytes en activant les récepteurs AMPA/kainate. L'intérêt des antagonistes du glutamate dans la protection de la myéline a été testé expérimentalement. Les antagonistes du NMDA protégeraient plus efficacement la myéline contre l'afflux calcique que les antagonistes de l'AMPA/kainate. Par

contre, ces derniers protègeraient d'une manière plus significative les oligodendrocytes (Micu et al, 2006).

Les inhibiteurs des récepteurs au glutamate diminuent l'œdème cérébral et l'étendue de la lésion secondaire en conditions expérimentales (Fei et al, 2006). Cela a conduit à proposer l'utilisation de molécules antiglutamatergiques à visée neuroprotectrice dans le traitement des lésions cérébrales et médullaires traumatiques. Le stress glutamatergique fait partie du screening des propriétés neuroprotectrices des molécules-candidates à la neuroprotection en phase préclinique.

1.5 La production de radicaux libres.

La production de radicaux libres porte essentiellement sur les radicaux oxygénés ou ROS, (Reactive Oxygen Species) et les radicaux dérivés du monoxyde d'azote ou RNS (Reactive Nitrogen Species). La participation des ROS semble prépondérante. Leur concentration augmente vers la douzième heure suivant le traumatisme, se maintient environ une semaine pour se normaliser les quatre à cinq semaines suivantes. Les molécules les plus impliquées sont le peroxyde d'hydrogène, le radical superoxyde et le radical hydroxy (Donnelly et al, 2007 ; Xiong et al, 2007). Ces agents oxydants provoquent une peroxydation des lipides membranaires conduisant à la destruction de la membrane des cellules et des mitochondries. Il en résulte une majoration de la dyshoméostasie calcique par augmentation de la perméabilité membranaire au Ca^{2+} , débouchant sur la lyse des cellules gliales, des neurones et des axones (Figure 4).

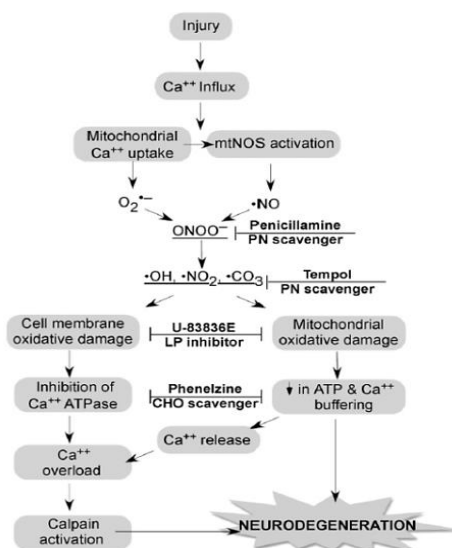


Figure 4. La production de radicaux libres.

La lésion entraîne un influx calcique impliquant les récepteurs au glutamate ou la perturbation des pompes ioniques. L'augmentation de la teneur calcique dans les mitochondries aboutit à la production du radical superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ et de NO dont la combinaison produit le peroxynitrite ONOO⁻. Ce dernier provoque des lésions mitochondriales conduisant à une diminution de la production d'ATP et à une diminution de l'activité des pompes à Ca ATP dépendantes. La surcharge cytosolique en calcium active les calpaïnes qui catalysent les protéines cytosquelettiques (Bains et al, 2012).

Les RNS sont surtout impliqués dans les lésions mitochondriales (Figure n°3). Une molécule particulièrement active est le peroxynitrite, puissant agent oxydant résultant de la réaction entre le radical superoxyde (O_2^-) et le radical oxyde nitreux (NO) (Xiong et al, 2007, Pacher et al, 2007). Le peroxynitrite entraîne expérimentalement une diminution du taux de respiration cellulaire et une augmentation des lésions oxydatives (Singh et al, 2006), deux actions antagonisées par un scavenger du peroxynitrite, la pénicillamine (Singh et al, 2007). Ces résultats expérimentaux montrent l'intérêt des traitements anti-radicaux libres et en particulier antioxydants dans le traitement des lésions traumatiques du SNC à la phase aiguë précoce. Les propriétés neuroprotectrices de molécules-candidates en phase préclinique peuvent être testées *in vitro* sur leurs capacités à prévenir le stress oxydatif en présence de H_2O_2 .

1.6 La rupture de la barrière hémato-encéphalique.

La rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) résulte des lésions de la paroi des capillaires occasionnées par la réaction inflammatoire. Mises en évidence sur des modèles de traumatismes cérébraux, ces lésions pariétales d'origine inflammatoire se retrouvent également à l'étage médullaire. L'augmentation de la perméabilité de la BHE survient à la vingt-quatrième heure suivant le traumatisme et se normalise vers la deuxième semaine (Noble et al, 1989).

La rupture de la BHE est matérialisée par les lésions de l'endothélium des capillaires qui est la cible des produits de sécrétion libérés par les cellules microgliales activées et les cellules immunes recrutées sur le site lésionnel. Elles sécrètent dans le milieu extracellulaires des cytokines inflammatoires comme le $TNF-\alpha$ et l' $IL-1\beta$ (Pineau et al, 2007 ; Schnell et al, 1999), des radicaux libres comme les ROS et le NO, les métalloprotéinases et l'élastase (Donnelly et al, 2007) qui désagrègent les parois capillaires.

L'altération structurelle des parois vasculaires affecte les expansions astrocytaires et les cellules endothéliales. Morphologiquement, on observe des images de vacuolisation des cellules endothéliales responsables de la rupture de la BHE. Les flux de protéines et de solutés à travers la paroi vasculaire vers l'espace extracellulaire génèrent des flux d'eau selon les gradients oncotique et osmotique à l'origine de l'œdème interstitiel vasogénique (Dietrich et al, 1994 ; Unterberg et al, 2004). La rupture de la BHE favorise le recrutement de nouvelles cellules à partir du secteur vasculaire, polynucléaires neutrophiles, lymphocytes et monocytes circulants qui

sécrètent dans l'environnement cellulaire les cytokines inflammatoires à l'origine de l'auto-emballage du processus (Kubes et al, 2000).

1.7 La réaction inflammatoire et immune.

La réaction inflammatoire, en partie générée par la rupture de la BHE, associe l'activation des cellules microgliales et des astrocytes *in situ* au recrutement des lymphocytes et des monocytes circulants. D'une manière ambivalente, elle génère la lésion secondaire et participe au processus cicatriciel préalable à la régénération tissulaire.

La surexpression de cytokines inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α ...) et de molécules favorisant l'adhésion cellulaire comme l'ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) dans le parenchyme (Harting et al, 2008) et le LCS majorent les lésions neuronales occasionnées par la lésion primaire et les mécanismes d'excitotoxicité (Bell et al, 1997 ; Whalen et al, 2000 ; Singhal et al, 2002 ; Chen et al, 2008). Les chémokines comme la MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein), exprimée très précocement par les astrocytes et les cellules microgliales activées, (Yoshimura et al, 1989 ; Glabinski et al, 1996), recrutent des monocytes circulants sur le site lésionnel et amplifient la réaction inflammatoire.

Des agents pharmacologiques comme le Minozac ou la N-Acétylcystéine, qui inhibent l'activation gliale et la production de cytokines inflammatoires, auraient un effet protecteur sur la barrière hémato-encéphalique et réduiraient l'œdème vasogénique. Ils limiteraient également les phénomènes apoptotiques (Lloyd et al, 2008 ; Chen et al, 2008 ; Xiong et al, 2009).

La réaction inflammatoire participe également à la détertion des débris cellulaires et au renouvellement de l'environnement cellulaire indispensables à la reconstitution du parenchyme et de la BHE. C'est pourquoi des souris mutantes pour le TNF- α présentent une augmentation paradoxale du volume lésionnel et une majoration des phénomènes apoptotiques, après traumatisme médullaire (Kim et al, 2001). Certaines parentés structurelles entre le FasL, qui est une voie de signalisation empruntée par l'apoptose, et des cytokines inflammatoires comme le TNF- α suggèrent par ailleurs des liens étroits entre l'apoptose et l'inflammation (Ziebell et al, 2010).

1.8 Les phénomènes de morts cellulaires par nécrose et apoptose.

Les pertes cellulaires par nécrose et apoptose relèvent de deux mécanismes distincts. La nécrose, produite par le traumatisme initial ne requiert pas d'ATP et génère une réaction inflammatoire par le biais des lyses cellulaires. L'apoptose, liée à l'activation de voies métaboliques spécifiques (Fas...), requiert un apport en ATP et ne génère pas de réaction inflammatoire grâce à la phagocytose des fragments cellulaires (Kwon et al, 2004) (Figures 5, 6 et 7).

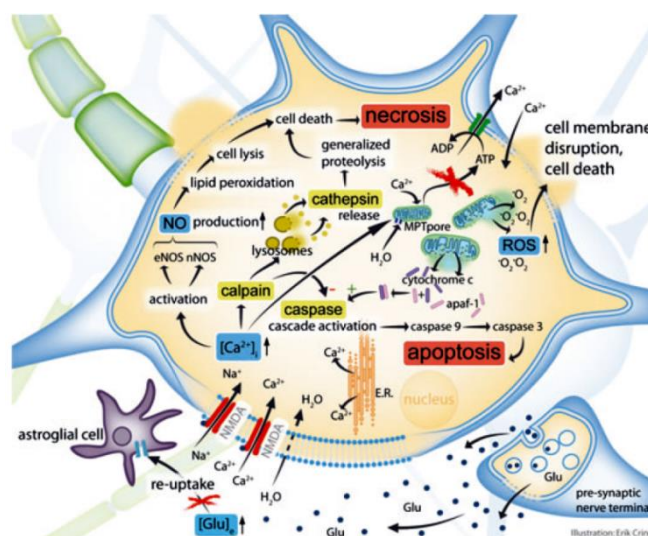


Figure 5. L'influx calcique génère simultanément trois cascades d'événements intracellulaires conduisant à la nécrose ou l'apoptose

(1) La stimulation de la NO Synthase (NOS) augmente la production de NO et conduit à la peroxydation des lipides aboutissant à la nécrose. (2) La stimulation de la calpaïne libère les protéases lysosomiales aboutissant à la nécrose et stimule l'apoptose *via* les caspases. (3) La surcharge de calcium dans les mitochondries augmente la perméabilité des membranes mitochondriales qui laissent sortir les ROS et le cytochrome C. Ce dernier active une voie apoptotique impliquant les caspases (Andriessen et al, 2010).

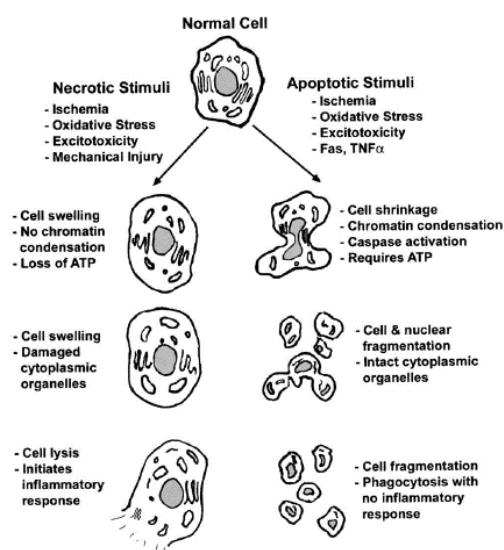


Figure 6. Distinctions schématiques entre les mécanismes nécrotiques et apoptotiques (Kwon et al, 2004)

Les phénomènes de nécrose et d'apoptose prédominent selon le type de population cellulaire. Ainsi, les pertes astrocytaires relèveraient surtout de phénomènes nécrotiques initiés dans les heures suivant le traumatisme par l'œdème cytotoxique (Beattie et al, 2002). Les neurones seraient la cible des mécanismes apoptotiques et nécrotique selon l'importance des déplétions en ATP (Nicotera et al, 1997). Les oligodendrocytes s'engageraient principalement dans des processus apoptotiques (Crowe et al, 1997) impliquant la voie de signalisation Fas. Le ligand Fas (FasL) est une protéine transmembranaire de la famille des TNF (Itoh et al, 1991; Nagata et al, 1995; Suda et al, 1993) dont la concentration dans le LCS reste augmentée plusieurs jours après un traumatisme crânien sévère (Ertel et al, 1997 ; Lenzlinger et al, 2002). Il est exprimé par les astrocytes, les neurones, la microglie activée et les lymphocytes recrutés sur le site lésionnel (Beer et al, 2000, Choi et al, 1999, Grosjean et al, 2007, Martin-Villalba et al, 1999, Qiu et al, 2002). L'interaction entre FasL exprimé par la microglie activée et son récepteur FasR exprimé par les oligodendrocytes, déclencherait l'apoptose des oligodendrocytes par un mécanisme caspase dépendant (Casha et al, 2001, 2007). Nous avons vu que la surexcitation des récepteurs NMDA exprimés par les oligodendrocytes conduisait également à la perte des oligodendrocytes un mécanisme d'excitotoxicité liée au glutamate (Stys et al, 2007).

1.9 La démyélinisation.

Les foyers de démyélinisation après traumatisme cérébral ou médullaire peuvent être dus à la destruction des gaines de myéline, à des anomalies de la remyélinisation ou à la perte des oligodendrocytes. Les destructions oligodendrocytaires, d'origine apoptotique ou excitotoxique, conduisent à des lésions de démyélinisation axonales dont le pic apparaît autour de la 24^{ème} heure suivant le traumatisme chez le rat (Totoiu et al, 2005). Elles laissent en place des axones démyélinisés qui ont été bien identifiés sur les modèles animaux, mais dont l'existence est difficile à démontrer chez l'homme pour des raisons techniques (Kakulas et al, 2004 : Norenberg et al, 2004). Si leur existence se confirme chez l'homme, ces fibres traversant la cavité lésionnelle constitueraient une cible essentielle des traitements régénératifs.

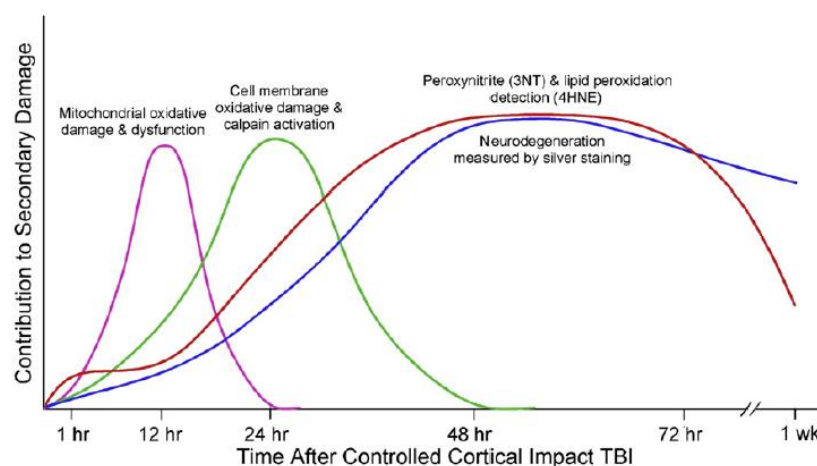


Figure 7. Cinétique des événements métaboliques et cytologiques de la lésion secondaire du traumatisme cérébral (Bains et al, 2012).

2) La cinétique des lésions anatomopathologiques cérébrales

Une série rétrospective récente comportant 52 patients décédés de lésions cérébrales traumatiques et 44 contrôles appariés à l'âge, a permis de caractériser la chronologie des lésions histologiques après traumatisme cérébral. Trois cohortes étaient ainsi constituées selon la survie : (1) 16 patients décédés dans les 2 premières semaines et définissant la phase aiguë (2) 11 patients décédés de 2 semaines à 1 an et définissant la phase subaiguë et (3) 25 patients décédés au-delà d'un an et définissant la phase chronique.

Le suivi des lésions était fondé sur l'évolution de trois critères : (1) l'activation de la microglie, (2) les lésions axonales et (3) les données de l'histologie standard. L'activation de la microglie était détectée par immunomarquage du CR3/43, qui est une $\beta 2$ -intégrine exprimée par les cellules microgliales, et l'immunomarquage du CD68, glycoprotéine lysosomiales révélant l'activité phagocytaire. Le double marquage du CR3/43 et du CD68 signalait donc le phénotype phagocytaire des macrophages et de la microglie. Les lésions axonales étaient étudiées par immunomarquage de l'APP, protéine précurseur de l'amyloïde dont l'accumulation dans l'axone est symptomatique de trouble de la conduction axonale (Johnson et al, 2013).

2.1 La phase aiguë

Dans les 2 premières semaines suivant le traumatisme cérébral, on ne retrouve pas d'activation significative des cellules microgliales dans la substance blanche. Seuls sont retrouvés des îlots de cellules microgliales d'aspect amiboïde. L'immunoréactivité au CR3/43 dans le corps calleux augmente avec l'âge comme dans le lot témoin (Johnson et al, 2013).

Les modifications biochimiques sont précoces. Il existe une augmentation significative de l'immunoréactivité à l'APP, détectée dès la 2^{ème} ou 3^{ème} heure selon les études (Geddes et al, 2004 ; Johnson et al, 2013). Elle révèle l'existence de lésions axonales diffuses qui sont majeures chez 75% des sujets. D'autres études montrent que les dépôts de protéine β -amyloïde ($A\beta$), également caractéristiques des lésions axonales, se constituent dès la phase aiguë du traumatisme, quelle que soit sa sévérité (Johnson et al, 2010). Présents chez 30% des patients à la phase aiguë du traumatisme crânien grave, ils expriment le phénotype $A\beta 42$ de la maladie d'Alzheimer (Horsburgh et al, 2000, Smith et al, 2003). Leur distribution est indépendante des lésions focales. Il s'agit de dépôts dont la répartition diffuse indique qu'ils constituent probablement des lésions séquellaires de l'hypoxie, de l'acidose, de l'œdème et de l'hypoperfusion cérébrale à la phase aiguë (Ikonovic et al, 2004, Smith et al, 2013).

Les modifications de la morphologie cellulaire ne sont perceptibles qu'à partir de la 12^{ème} heure sous la forme de gonflements des axones (Geddes et al, 2004). Leur répartition suggère un mécanisme vasculaire, secondaire à l'hypertension intracrânienne ou à l'ischémie (Johnson et al, 2013).

2.2 La phase subaiguë

Au cours de cette phase qui s'étend de la 3^{ème} semaine à 1 an, on constate une activation des cellules microgliales dont la densité augmente. Les cellules comarquées au CR3/43 et au CD68 ont un corps cellulaire hypertrophié, des processus cellulaires épaissis et raccourcis. Cet aspect amiboïde est retrouvé exclusivement chez les patients indépendamment de l'âge du sujet. Elles se regroupent par paquets dispersés autour des axones lésés ou s'alignent le long des faisceaux de substance blanche. Pour certains, ces modifications apparaîtraient plus précocement entre le 5^{ème} et le 10^{ème} jour (Geddes et al, 2004). Chez les témoins, les cellules comarquées au CR3/43 et au CD68 ont une répartition diffuse. Leur phénotype correspond à celui de cellules gliales activées dont la présence est liée à l'âge et fait appel à des mécanismes complexes encore mal compris (Perry et al, 2010).

Les altérations axonales sont majeures chez 45% des patients et apparaissent plus modérées dans 36% des cas. On retrouve d'une manière spécifique des bulbes de rétraction dispersés dans le corps calleux. Ces bulbes de rétraction constituent l'extrémité dilatée des axones sectionnés. Ils contiennent un réseau microtubulaire désorganisé, inapte à produire de l'axone, et correspondent à des cônes de croissance déstructurés. Expérimentalement, la stabilisation du réseau microtubulaire organisé maintient la formation de cônes de croissance fonctionnels (Erturk et al, 2007).

2.3 La phase chronique

Dans cette étude, l'immunomarquage au CR3/43 diffère quantitativement peu des patients témoins au-delà d'un an. Par contre, sa répartition se modifie par rapport à la phase précédente.

Jusqu'à 8 ans après le traumatisme, l'étude immunohistologique retrouve des cellules microgliales d'aspect amiboïde marquées au CR3/43 et au CD68 sous forme de larges plages dispersées dans l'ensemble du corps calleux, alors qu'elles s'alignaient par paquets le long des faisceaux à la phase précédente. Ces remaniements semblent indépendants de l'âge, du sexe, du mécanisme traumatique et de la cause du décès (Johnson et al, 2013). Chez 28% des patients, ce double marquage au CR3/43 et au CD68 constitue le principal phénotype exprimé par la microglie du corps calleux (Johnson et al, 2004).

L'incidence des lésions axonales diminue, mais l'immunomarquage de l'APP reste significativement augmenté chez 60% des patients par rapport aux témoins. On retrouve les bulbes de rétraction, parfois en grande quantité à côté des îlots de cellules inflammatoires amiboïdes (Johnson et al, 2013). L'existence de ces bulbes de rétraction et des cellules microgliales amiboïdes à la phase tardive témoigne de la persistance d'un processus dégénératif actif associant une réaction inflammatoire à une destruction de l'axone et de la gaine de myéline, à distance du traumatisme initial. La protéine β -amyloïde mise en évidence à distance d'un traumatisme unique, prend l'aspect fibrillaire et la répartition typiques de la maladie d'Alzheimer. Sa présence serait corrélée aux lésions axonales. (Johnson et al, 2012).

L'étude histologique du corps calleux après coloration au Luxol Fast Blue montre une diminution de la densité de la myéline et une désorganisation de sa structure. A tous les temps du suivi, les altérations de la gaine de myéline apparaissent corrélés à l'intensité de la réaction neuro-inflammatoire. Néanmoins, les macrophages impliqués dans cette réaction participent à la phagocytose des débris, mise en évidence en immunohistochimie, par l'existence de fragments marqués à la MBP (myelin basic protein) dans le cytoplasme des cellules CR3/43 (Johnson et al, 2013). La détersion des débris de myéline par les cellules inflammatoires est indispensable à la repousse de l'axone comme nous le verrons plus loin.

Macroscopiquement, ces remaniements histologiques expliqueraient l'atrophie du corps calleux constatée en anatomie macroscopique chez les patients décédés plus d'un an après le traumatisme. Avant ce délai, les variations ne semblent pas significatives dans l'étude de Johnson (Johnson et al, 2013). D'autres études montrent qu'une atrophie cérébrale est significative dès le 6^{ème} mois d'évolution (Farbota et al, 2012 ; Ross et al, 2012). Une étude récente par IRM montre que l'atrophie de la substance blanche après traumatisme unique est un processus évolutif. Elle révèle en effet que le volume du corps calleux continue de diminuer jusqu'à 8 ans après le traumatisme (Tomaiuolo et al, 2012). Des données expérimentales indiquent que ces processus dégénératifs tardifs touchant la substance blanche sont liés à l'entretien de la réaction neuro-inflammatoire. L'inhibition de l'activation microgliale diminue en effet la destruction retardée de la substance blanche et améliorerait la récupération fonctionnelle (Byrnes et al, 2012).

3) L'apport des modèles de lésion médullaire

3.1 Les modifications histologiques

Dans les deux premières semaines suivant le traumatisme, on constate l'installation d'une intense réaction phagocytaire dont la fonction est d'éliminer les débris cellulaires et les produits de dégradation de la myéline, puissants inhibiteurs de la repousse axonale (Donnelly et al, 2007). En marge de la lésion, on assiste à une prolifération et à une hypertrophie des astrocytes. Cette réaction astrocytaire, caractérisée par la surexpression de la GFAP, aboutit à la formation d'une cicatrice astrogliale qui restitue la BHE et rétablit l'équilibre ionique (Herrmann et al, 2008). Elle constitue également une barrière physique et métabolique qui s'oppose à la repousse neuritique.

Au cours de la phase intermédiaire qui s'étend de la 3^{ème} semaine au 6^{ème} mois, la cicatrice se remanie. Le point marquant est le phénomène de repousse neuritique, qui s'observe à plus ou moins précocement selon la nature du faisceau. Sur des modèles de lésion médullaire chez le rat, la repousse des axones du faisceau corticospinal s'étale de la troisième semaine au 8^{ème} mois (Hill et al, 2001).

3.2 Les modifications cytologiques

La contusion médullaire suscite sur le site lésionnel la perte des protéines du cytosquelette responsable du dysfonctionnement axonal, et des lésions de démyélinisation (Holtz et al, 1990, Yu et al, 2000).

3.2.1 Les altérations du cytosquelette axonal

La destruction précoce du cytosquelette des neurones se traduit dans les premières 24 heures par la dégradation de la MAP-2 (microtubule associated protein-2) et par la perte des neurofilaments (NF) (Ward et al, 2014).

La MAP-2 est une protéine présente en grande quantité dans le corps cellulaire et les expansions dendritiques du neurone. Elle stabilise l'architecture microtubulaire et semble indispensable à la neuritogenèse. Sa raréfaction dans la substance blanche traduit la destruction directe des dendrites par la lésion initiale ou par dégénérescence antérograde à partir des corps cellulaires détruits (Ward et al, 2014).

La destruction des NF concerne les formes phosphorylée et non phosphorylée du NF. Cette dernière semble néanmoins plus vulnérable à la protéolyse par les calpaïnes dont on a vu l'implication dans les mécanismes d'excitotoxicité médiée par le glutamate et le Ca^{2+} (Pant et al, 1988 ; Schumacher et al, 1999). Des modèles de lésion médullaire montrent que les pertes de NF s'étendent jusqu'à 5 mm en amont et 5 mm en aval du foyer de contusion chez le rat. Le mécanisme sous-jacent pourrait associer un phénomène de dégénérescence wallérienne consécutif au traumatisme initial et la cascade métabolique de la lésion secondaire (Ward et al, 2014).

3.2.2 Les altérations du fonctionnement axonal

Le NF a pour fonction de maintenir l'organisation structurelle de l'axone, en particulier son diamètre qui conditionne ses caractéristiques fonctionnelles. Sa dégradation aboutit donc à une désorganisation de la structure axonale qui se répercute sur les capacités de conduction électriques et axoplasmiques (Hoffman et al, 1987 ; Liu et al, 2004). Les altérations du transport axoplasmique ont pu être mises en évidence en immunocytochimie par révélation d'un marqueur spécifique des lésions de l'axone, l'APP (Oehmichen et al, 1998). L'APP est une glycoprotéine neuronale véhiculée par transport axoplasmique rapide dont la présence n'est normalement pas détectée dans le tissu sain (Li et al, 1995). Son accumulation est précoce après traumatisme cérébral ou médullaire. Son immunomarquage apparaît dans les fibres dès la 2^{ème} heure et dans les bulbes de rétraction dès la 3^{ème} heure après traumatisme cérébral chez l'homme (McKenzie et al, 1996). L'APP a été corrélée à l'extension de la lésion (Li et al, 1995) et à la sévérité du déficit neurologique d'une contusion médullaire chez le rat (Huang et al, 2007). Son accumulation prédomine à la partie proximale de la lésion médullaire avec un pic de concentration dès le 3^{ème} jour sur le faisceau corticospinal, et d'une manière différée vers le 7^{ème} jour sur les faisceaux ascendants des cordons dorsaux chez le rat (Ward et al, 2014).

3.2.3 Les lésions de la gaine de myéline

La destruction des gaines de myéline, mise en évidence par immunomarquage de la MBP apparaît corrélée à la destruction du cytosquelette axonal et à l'accumulation de la protéine APP. Initiée par le traumatisme, elle continue de se développer dans le site lésionnel et la moelle située en amont de la lésion pour atteindre un maximum au 3^{ème} jour. Elle atteint électivement les voies

descendantes et notamment le tractus corticospinal. Elle affecte à un moindre degré la moelle située en aval de la lésion ainsi que les cordons postérieurs où on observe les premiers signes de remyélinisation dès le 7^{ème} jour chez le rat (Ward et al, 2014).

3.2.4 Les oligodendrocytes et les cellules de Schwann

Six semaines après le traumatisme, des oligodendrocytes et des cellules Schwann colonisent le foyer lésionnel et reconstituent les gaines de myéline. Les axones se regroupent selon le type cellulaire assurant la myélinisation. L'origine des cellules de Schwann est débattue. Elles migreraient le long des racines spinales endommagées ou dériveraient des progéniteurs de cellules gliales résidents (Zawadzka et al, 2010). Il reste néanmoins établi qu'elles ne migrent pas dans le parenchyme sain. Leur présence au contact des axones signifierait donc la myélinisation d'axones en croissance ou la remyélinisation d'axones épargnés par la lésion. Chaque cellule de Schwann ne myélinise qu'un axone, comme dans le système nerveux périphérique, à la différence des oligodendrocytes. Enfin, on retrouve des îlots de myéline sans axone et des axones œdémateux sans gaine de myéline (Ward et al, 2014).

Les modèles de contusion et de compression médullaires expérimentales indiquent une corrélation significative entre l'étendue des lésions des gaines de myéline et l'importance du déficit neurologique (Noble et al, 1989; Fehlings et al, 1995; Basso et al, 1996; Gruner et al, 1996). Il est donc possible qu'une part de la récupération des fonctions neurologiques repose sur la remyélinisation par les oligodendrocytes et les cellules de Schwann, des axones épargnés par la lésion, indépendamment de la neuritogenèse et des phénomènes de repousse collatérale.

C) La persistance de lésions évolutives à distance

La persistance de lésions tissulaires actives à distance d'un traumatisme cérébral ou médullaire même unique est clairement établie. Elle témoigne du caractère évolutif des processus neurotraumatiques et justifie la mise au point de traitements neuroprotecteurs et neurorégénératifs même chez les malades chroniques.

1) La lésion cérébrale

En 1928, HS Martland décrivait le syndrome du boxeur sonné (the punch-drunk syndrome) caractérisé par des troubles moteurs et cognitifs survenant chez d'anciens boxeurs professionnels (Martland 1928). Quelques années plus tard, le syndrome clinique fut corrélé à des données anatomopathologiques et désigné sous le terme de « *dementia pugilistica* » par Millspagh (Millspagh 1937). Ces premières observations suggéraient que des lésions chroniques pouvaient évoluer au sein de la substance blanche cérébrale à distance d'épisodes traumatiques répétés, notion qui avait été déjà proposée par Strich en 1956 (Strich et al, 1956). Retrouvé dans d'autres populations de patients, il est actuellement désigné sous le terme d'encéphalopathie traumatique chronique (ECT).

Des données épidémiologiques et anatomopathologiques plus récentes montrent qu'un traumatisme cérébral unique même de gravité modérée peut générer ces lésions évolutives tardives (Molgaard et al, 1990 ; Johnson et al, 2013). Certains auteurs ont avancé qu'un traumatisme cérébral pourrait constituer, par ces lésions persistantes, un facteur de risque de démence, mais ce dernier point reste débattu (Graves et al, 1990 ; Mortimer et al, 1991 ; O'Meara et al, 1997 ; Salib et al, 1997 ; Schofield et al, 1997 ; Flemminger et al, 2003).

Sur le plan anatomopathologique, les remaniements de la substance blanche constatés dans l'ECT comprennent essentiellement des foyers de dégénérescence et de raréfaction de la myéline au sein de réactions gliales (Corsellis et al, 1973 ; Omalu et al, 2005, 2011 ; McKee et al, 2009, 2013). Une étude portant sur 35 cérébrolésés en état végétatif décédés à distance du traumatisme, retrouve des lésions de dégénérescence wallérienne dans 71% des cas. Associées à l'activation de la microglie, elles apparaissent comme la conséquence de lésions axonales diffuses. Des inclusions de myéline dans le cytoplasme des cellules microgliales et des macrophages traduisent la détersion des gaines de myéline par les cellules phagocytaires au sein d'une réaction neuro-inflammatoire qui persiste dans la substance blanche plusieurs années après le traumatisme (Adams et al, 2000). Cette réaction se traduit par une augmentation de la densité cellulaire et la présence de cellules microgliales dont l'aspect amiboïde a été évoqué plus haut.

Des observations récentes mettent en évidence des dégénérescences neurofibrillaires intra-axonales associées à la protéine Tau (tubule associated unit), protéine qui module la stabilité

du squelette microtubulaire axonal (Goldstein et al, 2012, McKee et al, 2013). Leur apparition dès la phase aiguë du traumatisme cérébral et leur persistance à la phase chronique ont fait suggérer leur implication dans la physiopathologie de l'ECT (Johnson et al, 2013). Leur distribution élective autour des vaisseaux sur une série de 4 patients atteints d'ECT, évoquerait un mécanisme vasculaire (Geddes et al, 1999), mais cette observation demande à être confirmée par des études de plus grande ampleur.

Les dépôts de protéine A β caractérisant les lésions axonales dès la phase aiguë du traumatisme (Johnson et al, 2010), se retrouvent plusieurs années après un traumatisme unique, modéré à sévère. L'accumulation d'APP également symptomatique de la dégradation des axones suit les pertes de substance blanche et l'atrophie du corps calleux. Les lésions axonales tardives diffèrent de celles observées à la phase aiguë, notamment par l'aspect granulaire assez spécifique des bulbes de rétractation à l'extrémité des axones (Johnson et al, 2013).

Il est difficile de préciser si la réaction inflammatoire est la cause ou la conséquence des dégradations axonales, des dégénérescences neurofibrillaires et de l'accumulation de la protéine A β (Smith et al, 2013). Elle reste néanmoins le point central des lésions chroniques de la substance blanche. On observe au sein de cette réaction inflammatoire des cellules microgliales activées exprimant l'IL-1 α , au contact d'expansions neuritiques dystrophiques et de neurones exprimant l'APP (Griffith et al, 1994). Par ailleurs, la protéine A β produite par l'inflammation agirait en retour comme un agent pro-inflammatoire activant la microglie. Elle stimule la production de ROS et de TNF- α par les cellules microgliales activées, et entretient par ce biais la cascade oxydative et la neurotoxicité. (Qin et al, 2002).

2) La lésion médullaire

La phase chronique qui commence chez l'homme au 6^{ème} mois et dure la vie du patient, se caractérise sur le plan clinique par la stagnation des signes neurologiques. Sur le plan histologique, la lésion peut se stabiliser ou évoluer vers la constitution d'une formation kystique centromédullaire avec myélomalacie chez environ 30% des patients (Rowland et al, 2008).

Des études expérimentales menées sur des modèles de contusion médullaire chez le rongeur et le primate montrent que des remaniements dégénératifs de la substance blanche

perdurent plusieurs mois après le traumatisme, confirmant les constatations faites à l'étage encéphalique (Crowe et al, 1997; Liu et al, 1997; Grossman et al, 2001). Les modèles de compression médullaire, qui reproduiraient plus fidèlement les lésions d'hypoxie et d'ischémie de la pathologie humaine, montrent que la perte des neurones qui est évaluée à 44% au 1^{er} jour passe à 81% à un mois (Huang et al, 2007).

La persistance de lésions évolutives de la substance blanche et les pertes neuronales différées justifient le développement de traitements neuroprotecteurs même à la phase chronique du traumatisme.

II) La réparation de la substance blanche et ses obstacles

L'expérience historique de Ramon y Cajal, qui obtint une repousse axonale après avoir greffé un neurone central dans un nerf périphérique, démontrait clairement que l'incapacité du neurone central à repousser ne provenait pas du neurone mais des caractéristiques de l'environnement cellulaire (Ramon y Cajal, 1928 ; Tello, 1911). Dans les années 80, S. David montra qu'un neurone central pouvait régénérer son axone à travers un segment de nerf sciatique greffé dans la moelle (David 1981). Plus récemment, M Schwab montra que l'axone de neurones sensitifs pouvait régénérer dans un fragment de nerf sciatique mais pas dans un fragment de nerf optique (Schwab et al, 1985), confirmant ainsi l'influence de facteurs inhibiteurs locaux.

Outre la repousse de l'axone, la régénération de la substance blanche nécessite le guidage de l'axone en croissance, la formation de nouvelles synapses et le recrutement de cellules compétentes pour reconstituer la gaine de myéline. En réalité, l'inhibition du milieu extracellulaire s'exerce sur tous ces aspects de la régénération.

Le système nerveux central n'est pour autant pas une structure figée. Une de ses propriétés remarquables est son étonnante capacité à remodeler en permanence son organisation structurelle dans des situations physiologiques courantes que sont la mémoire et l'apprentissage. Des études en imagerie fonctionnelle mettent évidence que des expériences sensorielles suscitent continuellement la destruction et la formation de connexions synaptiques pour former de nouveaux circuits (Zito et al, 2002 ; Zuo et al, 2005). Par ailleurs, lorsqu'on pratique expérimentalement une lésion sur le névraxe d'un mammifère adulte, des phénomènes de repousse axonale et de

synaptogenèse se mettent en route. Par contre, ils restent trop limités chez l'homme pour recréer ou restituer les circuits neuronaux de nature à restaurer la fonction, comme c'est le cas dans le système nerveux périphérique, dans la période embryonnaire et chez certains vertébrés adultes.

A) Les exemples de régénération spontanée

Les oiseaux et les mammifères au cours de leur développement (Clearwaters 1954 ; Hasan et al, 1993 ; Iwashita et al, 1994) et les vertébrés inférieurs comme les poissons téléostéens (Anderson et al, 1986) et les urodèles jusqu'à l'âge adulte, conservent la capacité de régénérer des axones fonctionnels dans le système nerveux central. La conservation à l'âge adulte de cette capacité neurorégénérative chez les anamniotes apparaît liée à des propriétés du microenvironnement neuronal spécifiques de ce taxon : le comportement des cellules gliales et des cellules souches neurales, l'intervention des facteurs de croissance, les constituants de la matrice extracellulaire et la participation des enzymes intervenant dans leur renouvellement. Les mécanismes permettant d'expliquer comment la capacité du SNC à se régénérer s'est perdue au cours de l'évolution n'est toujours pas comprise.

1) Chez le zebrafish

Les mécanismes cytologiques et moléculaires de la neurorégénération spontanée ont été très étudiés chez le zebrafish. L'atout de ce modèle est qu'il offre à la fois un large éventail de mutations et la facilité exceptionnelle de pouvoir interpréter leurs traductions phénotypiques grâce à la transparence des stades larvaires. Par ailleurs, les différentes voies de signalisation impliquées dans la croissance et le guidage de l'axone semblent très similaires à celles constatées chez les mammifères, même si localement, la réaction astrogliale est minime et l'environnement cellulaire propice à la croissance de l'axone comme nous le verrons plus loin.

Les expérimentations chez le zebrafish mettent donc en évidence des capacités de régénération surprenante de la substance blanche sous-tendues par des mécanismes spécifiques. Ainsi, lorsque dans cette espèce, on sectionne un nerf optique, l'axone des cellules ganglionnaires rétiniennes traverse le chiasma et atteint le toit optique dès le 8^{ème} jour. Au 42^{ème} jour, la projection sur le cortex visuel s'est établie selon une rétinitopie rigoureuse qu'il n'est pas possible de distinguer du sujet sain (Becker et al, 2014). La qualité de cette repousse adaptée

n'est pas liée une réaction inflammatoire modérée. Elle est aussi importante que chez les mammifères et il existe localement une activation macrophagique et microgliale particulièrement intense. L'élément discriminant réside en fait dans l'absence de surexpression de CSPG constatée chez les mammifères (Becker et al, 2002).

Cette régénération histologique de la substance blanche est également fonctionnelle. Ainsi, lorsqu'on pratique une section complète de la moelle spinale, l'animal récupère en totalité de sa paralysie post-traumatique au 42^{ème} jour (Dias et al, 2012, Van Raamsdonk v1998). L'absence de récupération après mise en place d'un obstacle intraspinal à la repousse axonale, confirme que la récupération motrice est bien supportée par la croissance axonale et non par la mise en jeu des centres générateurs de mouvements. On retrouve encore localement une intense activation des macrophages et de la microglie. De manière remarquable, les cellules épendymogliales, qui bordent le canal central de la moelle spinale, établissent un pont entre les deux tranches de section médullaire, dont une fonction pourrait être de guider la croissance des axones à travers la cavité lésionnelle (Becker et al, 1997). Par ailleurs ces cellules épendymogliales génèrent des cellules progénitrices neurales qui ne produisent pas de cellules de type astrocytaire contrairement à ce qui est constaté chez les mammifères. Cela contribue à expliquer l'absence de cicatrice gliale, dont le rôle inhibiteur sur la repousse axonale est majeur chez les mammifères adultes.

Les capacités régénératrices du zebrafish ne sont pas liées à l'absence des inhibiteurs de la croissance axonale associés à la myéline mis en évidence chez les mammifères. Nogo (Abdesselem et al, 2009) et MAG (Lehmann et al, 2004) ont en effet été identifiés dans cette espèce. Ils présentent néanmoins des propriétés spécifiques. En effet, des deux domaines inhibiteurs amino-Nogo et Nogo66 de Nogo, le premier est manquant et le second ne montre aucune activité inhibitrice sur le cône de croissance *in vitro* (Abdesselem et al, 2009).

Les oligodendrocytes du zebrafish montrent des spécificités particulièrement intéressantes. Ils expriment sur le site lésionnel des molécules de reconnaissance cellulaire comme les contactines (Schweitzer et al, 2007) et la molécule L1 (Bernhardt et al, 1996) et P0 (Schweitzer et al, 2003) qui stimulent la croissance axonale. Il est intéressant de noter que chez les mammifères, ces protéines membranaires appartenant à la superfamille des

immunoglobulines, sont exclusivement exprimées par les cellules de Schwann. Cela tendrait à montrer que les oligodendrocytes du zebrafish ont les mêmes molécules de reconnaissance cellulaires que les cellules myélinisantes du système nerveux périphérique mammalien dont la régénération est possible (Jeserich et al, 1990 ; Bernhardt et al, 1996 ; Schweitzer et al, 2003).

Les neurones du SNC du zebrafish sont intrinsèquement plus aptes à l'axonogenèse que ne le sont leurs homologues chez les mammifères. Cette aptitude a été attribuée à la surexpression par l'axone de certaines molécules impliquées dans les mécanismes de régénérescence et de croissance cellulaires comme le GAP-43 (Kusik et al, 2010), les protéines L1 (Becker et al, 2004) et l' α 1-tubuline (Veldman et al, 2010), qui sont exprimées au cours du développement chez les mammifères. De plus, l'axone en croissance du zebrafish présente une capacité spécifique à atteindre sa cible après de longues distances. Des expériences de mutations géniques ont permis de démontrer ici l'implication de molécules de reconnaissance comme robo-2. On observe ainsi, après section médullaire, une repousse axonale anarchique chez des poissons mutants pour robo-2 (Wyatt et al, 2010).

Par ailleurs, les axones du zebrafish adulte sont sensibles aux agents chemorépulseurs de la matrice extracellulaire comme la téncasine-R, les CSPG et les éphrines, qui sont impliqués dans le guidage des axones et l'organisation topique de leurs projections corticales. La téncasine-R qui engaine le tractus optique constitue une barrière à la formation de fibres collatérales ectopiques ; les CSPG sont surexprimées par des noyaux diencephaliques que le tractus optique traverse sans faire relais au cours du développement ; les éphrines jouent un rôle fondamental dans l'organisation rétinotopique de la régénération des projections optiques chez l'adulte (Becker v2000).

2) Chez les Amphibiens

Chez les urodèles, la moelle et le cerveau gardent la capacité de se régénérer jusqu'à l'âge adulte. Chez les anoues, la moelle spinale perd cette capacité à la métamorphose, tandis que des zones de neurogenèse persistent dans des régions circonscrites de l'encéphale chez l'adulte.

2.1 La régénération de la moelle spinale

Après section complète de la moelle spinale chez un urodèle, l'axolotl adulte, les deux moignons de section médullaire se rétractent et s'éloignent l'un de l'autre pour constituer un espace mort. La cavité est ensuite progressivement comblée par des cellules d'aspect mésenchymateux recrutées à partir des deux tranches de section. Ces cellules résultent d'une transformation épithéliomésenchymateuse des épendymocytes qui n'expriment plus la laminine et les cytokératines et se mettent à exprimer deux autres constituants de la matrice extracellulaire : la vimentine et la fibronectine. Vers la quatrième semaine suivant le traumatisme médullaire, le canal central de la moelle spinal s'est complètement reconstitué et des axones nouvellement myélinisés sont observés dans le site lésionnel. Les cellules épithéliomésenchymateuses reprennent un phénotype épithélial et ré-expriment les cytokératines 8 et 18, tandis que l'expression de la vimentine et de la fibronectine disparaît (O'Hara et al, 1992, Chernoff et al, 1996).

Ce phénomène, appelé réponse épendymaire, est un point crucial de la régénération neurale. Observé chez toutes les espèces capables de régénérer leur moelle spinale à l'âge adulte, il se substitue à la réaction astrogliale observée chez les mammifères. Il pourrait correspondre à la conservation par l'épendyme des caractéristiques embryonnaires d'un neuroépithélium. Cette hypothèse est étayée par la structure histologique de la moelle spinale des amphibiens qui conserve une disposition primitive. Ainsi, les épendymocytes gardent un aspect de glie radiaire sous la forme de fins prolongements cytoplasmiques appelé processus épendymaires, étendus du canal central de la moelle spinale jusqu'à la pie mère où ils produisent la glia limitans (Schonbach et al, 1969 ; Roots et al, 1986 ; Holder et al, 1990). Chez tous les Vertébrés supérieurs, cette glie radiaire disparaît et l'épendyme n'exprime les cytokératines 8 et 18 qu'au niveau des tanocytes (Kasper et al, 1991).

Au cours de ce processus de régénération, la croissance des axones ne se fait pas d'une manière anarchique. On observe que les axones en croissance restent au contact des expansions radiaires des épendymocytes qui pourraient avoir un rôle de guide (Singer et al, 1979). Parallèlement, l'expression de molécules comme la ténascine ou le PSA-NCAM, impliquées dans les mécanismes d'adhérence et de migration cellulaires se modifie. Ainsi, la ténascine, qui

module chez l'embryon les interactions entre la cellule et la matrice extracellulaire, n'est plus exprimée par les épendymocytes chez l'adulte. Après lésion médullaire, on observe une surexpression de ténascine par les épendymocytes notamment aux zones de contact entre leurs prolongements radiaires et les cônes de croissance axonale (Caubit et al, 1994). On constate également une surexpression par les cellules épendymaires et les axones en croissance du PSA-NCAM, isoforme embryonnaire du NCAM (Caubit et al, 1993). Cela laisse suspecter l'implication de ces molécules dans la croissance et le guidage axonal, d'autant que leur expression décline en fin de processus régénératif.

La réaction épendymaire a été mise en parallèle avec la réaction astrocytaire des mammifères pour expliquer l'absence de réaction astrogliale chez les urodèles (Chernoff et al, 1996). Chez les urodèles, il n'y a pas cet afflux de cellules astrocytaires GFAP+ et de cellules fibroblastiques d'origine méningée, ni l'accumulation de CSPG inhibant la croissance des axones retrouvés chez les mammifères. Il est intéressant de noter que les cellules qui expriment le GFAP chez les urodèles sont en fait les épendymocytes, l'existence même d'astrocytes fibreux étant discutée chez les amphibiens adultes. Topographiquement, l'extrémité distale des prolongements épendymaires exprime la GFAP tandis que le corps cellulaire, au contact de la lumière du canal, exprime les cytokératines. Au cours de la transformation mésenchymateuse des épendymocytes, on constate une variation inverse entre l'extinction de l'expression de la GFAP et la surexpression de la vimentine. Cela a conduit à suspecter l'existence d'une corrélation entre l'expression de la vimentine par les épendymocytes et les capacités de régénération, mais cela n'a pas été clairement établi (Godsave et al, 1986).

Au cours des processus lésionnel et régénératif, la matrice extracellulaire est remaniée, avec notamment une destruction de la glia limitans et un remodelage de la trame collagène des leptoméniges auquel participent les métalloprotéinases de la matrice (MMP). Ces protéases interviennent à la fois dans la rupture de la barrière hémato-encéphalique au cours de la lésion secondaire, et dans la phase de cicatrisation (Werb et al, 1997). L'activité lytique de ces protéases sur les composants de la matrice extracellulaire comme les collagènes et les CSPG, nécessite la présence de Zinc et de Calcium. Les cellules épendymaires activées par la lésion auraient chez les urodèles la capacité de recapter les ions Ca^{2+} du milieu extracellulaire, protégeant les neurones et les oligodendrocytes contre des lésions secondaires surajoutées médiées par le Ca^{2+} (Chernoff et

al, 2003). Chez les mammifères, on observe au contraire que les astrocytes activés propagent les pics de concentration cytosolique en Ca^{2+} aux astrocytes et aux neurones au contact, diffusant ainsi de proche en proche cette toxicité liée au Ca^{2+} (Nedergaard et al, 1994).

En conditions physiologiques chez l'adulte, l'activité lytique des métalloprotéases sur les composants de la matrice extracellulaire est antagonisée par l'inhibiteur tissulaire des MMP-1 (TIMP-1) (Matrisian et al, 1990 ; Birkedal et al, 1993). Après lésion traumatique de la moelle, l'activité des MMP abondamment sécrétées par les épendymocytes activés, augmente entre la 2^{ème} et la 4^{ème} semaine et décline vers la 8^{ème} semaine. Parallèlement, l'expression du TIMP-1 s'interrompt au cours de la transformation épithéliomésenchymateuse des épendymocytes (Chernoff et al, 2000).

La plupart des inhibiteurs associés à la myéline isolés chez les mammifères se retrouvent chez les amphibiens capables de reconstituer leur substance blanche, à l'exception de Nogo (Wanner 1995 ; Lang et al, 1995 ; Becker et al, 1999). Chez les anoures, la myéline devient non permissive à période de la métamorphose. A ce moment, la capacité régénérative de la moelle disparaît, et l'administration d'un inhibiteur de Nogo (IN-1) favorise de manière significative la repousse axonale comme c'est le cas chez les mammifères (Lang et al, 1995). La ténascine -R et le MAG sont également surexprimés dans le site lésionnel, mais la rapidité des mécanismes de détersion rend l'environnement cellulaire local plus favorable à la repousse de l'axone (Becker et al, 1999).

Les pertes cellulaires peuvent être compensées par des cellules souches résidentes ou par un mécanisme de dédifférenciation. Des études *in vivo* indiquent que les cellules épendymaires ont la capacité de se dédifférencier. Leur disposition évoque, nous l'avons signalé, des similitudes avec le neuroépithélium embryonnaire. On constate d'ailleurs que celles recrutées sur le site lésionnel surexpriment la nestine qui est une protéine cytosquelettique caractéristique des progéniteurs neuraux (Chernoff et al, 1996). Il est par contre curieux de constater que les cellules souches neurales obtenues à partir de moelle spinale d'urodèles ne se différencient jamais en neurones, sur les modèles *in vitro* ou *in vivo* après transplantation sur un site de lésion médullaire (Benraiss et al, 1997).

Les éléments qui déclenchent ou orientent vers la neurorégénération chez les urodèles restent imparfaitement élucidés. L'implication de certains facteurs neurotrophiques est probable. Il est ici intéressant de noter une surexpression précoce du Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) par les épendymocytes après lésion médullaire (Zhang et al, 2000). Or il a été établi *in vitro* que la prolifération cellulaire est proportionnelle au taux de FGF-2. Cette corrélation a été confirmée par des études *in vivo* montrant que l'administration de FGF-2 entraîne la prolifération des épendymocytes (Ferretti et al, 2003). Au cours de la régénération de la moelle spinale des urodèles, on constate une expression séquentielle des récepteurs au FGF-2 (FGFR) au cours du temps : un premier pic de FGFR2 serait responsable de l'effet mitogène du FGF-2, un second pic de FGFR4 interviendrait dans la différenciation cellulaire (Turner et al, 2010). Chez les mammifères, le rôle du FGF-2 sur la régénération est inverse. Il constitue un facteur déclenchant de la réaction astrocytaire, et sa surexpression après lésion du SNC accentue la formation de la cicatrice gliale (Smith et al, 2001). En conclusion, le FGF-2 enclenche chez les urodèles un processus réparateur dont la cible est la cellule épendymaire, tandis qu'il enclenche chez les mammifères un processus cicatriciel dont la cible est l'astrocyte.

2.2 La régénération de l'encéphale

Certains amphibiens montrent à l'âge adulte une capacité surprenante à reconstituer intégralement un tissu cérébral fonctionnel après destruction ou ablation expérimentale de zones étendues du cerveau. Ainsi chez l'axolotl, dans un délai de 12 à 15 semaines suivant l'excision du tiers moyen d'un hémisphère, il n'est plus possible de distinguer l'hémisphère lésé de l'hémisphère sain. L'immunomarquage de coupes sériées de l'encéphale au BrdU montre une prolifération cellulaire dans la zone subventriculaire et des courants de migration cellulaire centrifuges dans tout l'encéphale. Il existe néanmoins une migration préférentielle vers le site lésionnel où elles expriment à environ 15 jours le NeuN, témoignant d'une différenciation en neurones matures. Des expériences de destructions concomitantes du tractus olfactif tendent à montrer que ce dernier est impliqué dans l'activation de la zone subventriculaire (Maden et al, 2013).

Tous les vertébrés adultes gardent la capacité à produire de nouveaux neurones et de nouvelles cellules gliales dans des régions bien délimitées de l'encéphale appelées gîtes à cellules

souches. Chez les poissons (Birse et al., 1980; Raymond et al, 1983; Zupanc et al, 1999), les amphibiens (Polenov et al, 1993), les reptiles (Lopez-Garcia et al., 1988; Font et al., 2001; Garcia-Verdugo et al, 2002) et les oiseaux (Paton et al, 1984; Ling et al, 1997), les cellules de la glie radiaire persistent chez l'adulte sous la forme de cellules épendymogliales situées sous l'épendyme, dans la paroi des ventricules (Polenov et al., 1972; Lopez-Garcia et al., 1988). Chez les anoues adultes, on retrouve également des neurones marqués au BrdU dans le thalamus, l'hypothalamus et le tectum optique (Simmons et al, 2008). Elles génèrent tout au long de la vie, de nouveaux neurones qui migrent dans le télencéphale (Perez-Canellas et al, 1997).

Des expériences consistant à réaliser une lésion cérébrale puis à suivre par immunohistochimie la prolifération et la migration cellulaires mettent en évidence le recrutement de cellules souches neurales sur le site lésionnel à partir de ces niches à cellules souches. L'existence de migrations cellulaires constatées également à distance du site lésionnel a fait suggérer l'implication de facteurs diffusibles libérés dans le sang ou le LCS (Yoshino et al, 2004 ; Del Grande et al, 1990 ; Minelli et al, 1990 ; Franceschini et al, 1992 ; Filoni et al, 1995).

Dans les espèces où la régénération tissulaire ne se fait pas, la migration des progéniteurs neuraux sur le site lésionnel pourrait être restreinte par la nature non permissive de l'environnement cellulaire. Chez les urodèles où ces mécanismes de réparation sont opérants, les cellules épendymaires produisent au cours de la régénération des métalloprotéases dont le rôle pourrait être de libérer la cellule de sa gangue de matrice extracellulaire en vue de sa migration (Chernoff et al, 2000 ; Endo et al, 2007).

La critique que l'on peut formuler à l'encontre de ces études est leur limitation à l'aspect morphologique et mécanistique de la réparation tissulaire. Or le problème posé par la réparation de la substance blanche chez les mammifères est qu'elle n'aboutit pas à la récupération des fonctions neurologiques perdues. Même si l'architecture tissulaire semble s'être reconstituée *ad integrum*, il reste donc en suspens la question du recouvrement fonctionnel, probablement difficile à mettre en évidence chez les amphibiens compte tenu des fonctions cognitives limitées supportées par l'encéphale et de leur faible implication dans les comportements moteurs.

3) Au cours de la période néonatale chez les mammifères et l'homme

L'étude des mécanismes de la neuroréparation est techniquement plus difficile dans les espèces euthériennes où toute la gestation est intra-utérine. C'est pourquoi les capacités neurorégénératrices des mammifères ont été tout particulièrement étudiées chez les marsupiaux, en particulier l'opossum dont l'embryon est facilement accessible et analysable.

3.1 Chez les marsupiaux

A la naissance, le stade de développement de l'opossum correspond au 14^{ème} jour de gestation chez la souris. Dans cette espèce, la moelle peut se régénérer intégralement jusqu'à 7 jours après la naissance et certains neurones centraux gardent la capacité de repousse axonale jusqu'à 4 semaines suivant le terme. Compte tenu du caractère inachevé du développement à la naissance chez les marsupiaux, les exemples de régénération de la moelle spinale après section expérimentale au cours de la période néonatale pourraient théoriquement correspondre à la simple poursuite des phénomènes développementaux physiologiques. Il s'agit en réalité de véritables phénomènes de repousse axonale permettant la restitution quasi-complète des fonctions motrices et sensorielles (Wang et al, 1998a et b).

Quatorze jours après la naissance, les capacités de neuroréparation se réduisent brutalement. Cette transition vers un état non-permissif sur la repousse axonale coïncide précisément avec le moment où la MBP commence à s'exprimer, c'est-à-dire au début de la myélinisation (Ghooray et al, 1993). Sur des préparations de moelle isolée d'opossums de plus de 14 jours, l'administration d'anticorps IN-1 restitue le potentiel de repousse axonale (Varga et al, 1995). L'absence de myéline ne suffit néanmoins pas à expliquer les capacités neurorégénératrices du sujet au cours de l'ontogenèse. Des souris mutantes pour MAG ne réparent pas mieux leur substance blanche que le phénotype sauvage (Bartsch et al, 1996). Par ailleurs, chez le mouton, la moelle spinale devient incapable de se régénérer bien avant le début de la myélinisation (Meuli-Simmen et al, 1996). L'expression de protéines inhibitrices comme Nogo et de leurs récepteurs comme NgR ne permettent pas non plus expliquer à eux seuls la perte des facultés neurorégénératrices dans la mesure où ils sont exprimés très précocement au cours du développement, quand la moelle peut encore se régénérer (O'Neill et al, 2002). Après lésion

du système nerveux central chez l'opossum, il existe une phase de prolifération cellulaire dont le type et l'implication dans la régénération ne sont pas encore bien précisés (Terman et al, 2000).

3.2 Chez l'homme

Chez l'homme, des neurones sont continuellement produits en grand nombre à partir de cellules de la zone subventriculaire exprimant des protéines de la glie radiaire comme la vimentine. La ZSV est donc également chez l'homme une source de progéniteurs neuraux (Weissman et al, 2014). Par contre l'intervention des niches à cellules souches dans la réparation de lésions cérébrales reste controversée chez l'homme.

Dans une série autopsique portant sur 9 enfants atteints de leucomalacie périventriculaire, Haynes constate une augmentation significative de l'expression de la doublecortine (DCX) dans la substance blanche et la ZSV voisines des foyers lésionnels. L'expression de ce marqueur de prolifération et de migration neuroblastiques (Brown et al, 2003) suggère l'existence d'un recrutement de neuroblastes vers le site lésionnel. En revanche, le Ki67 n'est pas significativement augmenté dans la ZSV des patients par rapport aux contrôles. On ne met donc pas en évidence une activation de la ZSV, mais ce dernier point doit être modulé compte tenu de ce que les sujets témoins étaient tous décédés d'une hypoxie cérébrale (Haynes et al, 2011).

Dans une autre série autopsique portant sur des enfants âgés de 3 semaines à 10 ans décédés d'un traumatisme crânien, Taylor ne montre pas de recrutement cellulaire sur le site lésionnel, par immunomarquage du DCX. Mais ce résultat doit être interprété avec prudence compte tenu du court délai d'observation, tous les patients étant décédés dans les heures suivant le traumatisme (Taylor 2013).

B) La régénération de la substance blanche chez les mammifères et l'homme adultes.

1) Les cellules souches neurales

Dans son étude princeps publiée en 1971, Rakic décrit les cellules de la glie radiaire comme des cellules astrocytaires spécialisées dérivées du neuroépithélium, dont la fonction est de guider mécaniquement la migration des neurones nouvellement formés au cours du

développement (Rakic et al, 1971). Il a été plus tard établi que ces cellules présentent des divisions asymétriques produisant de nouveaux neurones non seulement au cours du développement mais également chez l'adulte (Malatesta et al, 2000; Miyata et al, 2001; Noctor et al, 2001). Par la suite, l'existence de cellules souches neurales multipotentes dans la couche épendymaire a été démontrée chez les mammifères adultes (Doetsch et al, 1999; Alvarez-Buylla et al, 2002).

1.1 Les niches à cellules souches dans le cerveau adulte

Chez l'adulte, il existe essentiellement deux régions du cerveau appelées niches à cellules souches, où la neurogenèse est active : la zone subventriculaire (ZSV) où sont produits les neurones olfactifs (Altman, 1969; Lois et al, 1996), et le gyrus denté de l'hippocampe (GD) où sont produits les neurones granulaires (Altman et al, 1965; Kaplan et al, 1977; Cameron et al, 1993). Ces régions bénéficient d'un environnement cellulaire particulier, favorable à la neurogenèse, qualifié de niche neurovasculaire.

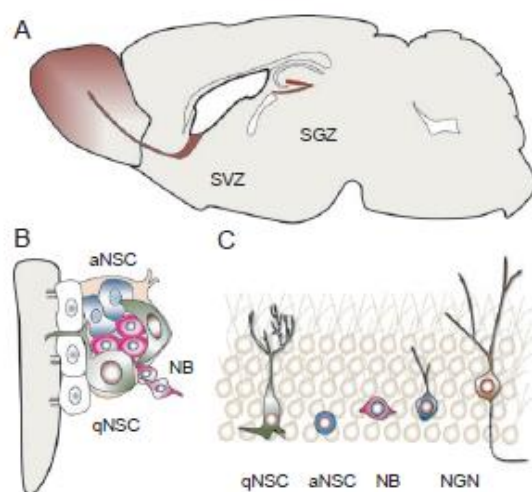


Figure 8. Les niches à cellules souches chez les rongeurs

La zone subventriculaire (SVZ) et la zone subgranulaire (SGZ) du gyrus denté de l'hippocampe constituent les deux principales niches à cellules souches chez l'adulte. Les cellules souches neurales quiescentes (qNSC) de la SVZ sont au contact de la lumière ventriculaire et partagent des caractéristiques phénotypiques communes aux astrocytes et aux épendymocytes. Leur activation physiologique (aNSC) donne naissance à des neuroblastes qui migrent vers le bulbe olfactif. Les NSC de la SGZ sont semblables aux cellules de la glie radiaire et génèrent des neuroblastes puis des neurones (Ma et al, 2009).

Dans ces niches neurovasculaires, les cellules souches sont au contact de vaisseaux dont l'endothélium sécrète des facteurs neurotrophiques comme le FGF-2 qui stimulent la prolifération cellulaire et la différenciation neuronale (Shen et al, 2004). Elles sécrètent elles-mêmes localement des facteurs mitogènes, des facteurs de croissance et des facteurs neurotrophiques qui stimulent également la prolifération et la survie cellulaires et déterminent le type de différenciation cellulaire (Zhao et al, 2008). Les cellules souches se différencient en neurones, oligodendrocytes, astrocytes et macrophages selon la nature de l'environnement cellulaire (Noctor et al, 2002, Wu et al, 2005 ; Gage et al, 2000). Dans la ZSV, les neurones naissent de cellules précurseurs exprimant la nestine, le GFAP et la Vimentine (Doetsch et al, 1997), phénotype astrocytaire indiquant une lignée commune avec la glie radiaire embryonnaire (Alvarez-Buylla et al, 2001) et pour lequel une parenté avec les cellules épendymogliales des amphibiens doit être évoquée.

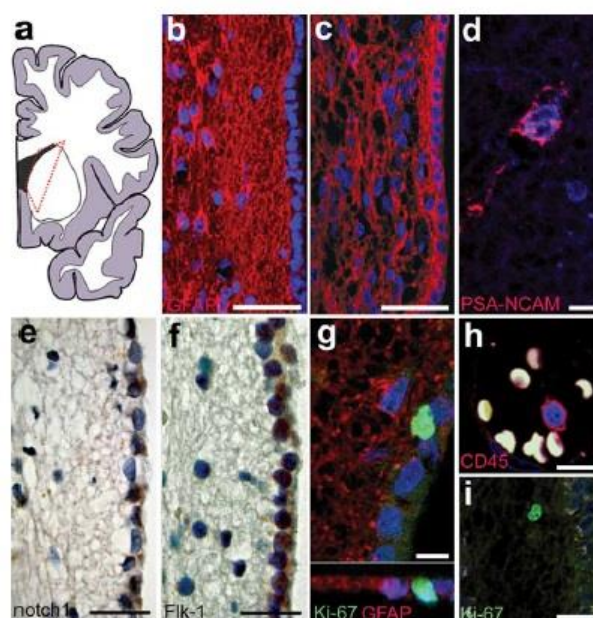


Figure 9. La zone subventriculaire chez l'homme.

La zone subventriculaire est située à la paroi latérale du ventricule latéral. d : l'immunomarquage du PSA-NCAM met en évidence les cellules en migration. e, f : l'immunomarquage de Notch-1 et Flk-1 met en évidence la différenciation neuronale. g : l'immunomarquage du Ki67 permet de montrer de l'activité prolifératrice (Macas et al, 2006).

La fonction physiologique de ces niches à cellules souches reste débattue. Plusieurs milliers de neurones migrent quotidiennement de la ZSV vers le bulbe olfactif selon un courant

migratoire appelé « rostral migratory stream » (RMS) (Lois and Alvarez-Buylla, 1994). Ces nouveaux neurones permettraient aux circuits neuronaux de se remanier selon les signaux olfactifs de l'environnement (Frazier-Cierpial et al, 1989; Corotto et al, 1994) et seraient nécessaires à la discrimination des odeurs (Gheusi et al, 2000). Dans le DG de l'hippocampe, l'afflux de nouveaux neurones participerait à la plasticité neuronale indispensable aux processus de mémorisation (Barnea et al, 1994; Kempermann et al, 1997; Gould et al, 1999a). Ces réservoirs à cellules souches seraient donc essentiellement impliqués dans la plasticité des circuits neuronaux existants, leur apportant de nouveaux neurones et de nouvelles synapses nécessaires à leur fonctionnement (Kirsche et al, 1983).

Les capillaires des niches à cellules souches jouent un rôle majeur dans la survie, la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales. La zone subventriculaire contient un riche plexus vasculaire au contact desquels se placent les chaînes de neuroblastes. Des cellules souches exprimant la GFAP sont accolées à la laminine entourant l'endothélium vasculaire et aux fractones, fines expansions de la lame basale à distance des vaisseaux et contenant de la laminine (Shen et al, 2008). Certaines cellules souches, mêlées aux cellules épendymaires, connectent la paroi ventriculaire aux capillaires sous-jacents par leurs prolongements. Elles expriment à leur surface l' $\alpha 6 \beta 1$ intégrine qui permet leur amarrage à la laminine exprimée par les cellules endothéliales et rentrant dans la composition des fractones. On constate *in vivo* que les cellules souches prolifèrent au contact des vaisseaux. Le blocage de ces $\beta 1$ intégrines par un anticorps spécifique aboutit à une dispersion des cellules souches à distance des vaisseaux mais paradoxalement à une augmentation leurs capacités prolifératives. Cela indique que l'ancrage des cellules souches à la paroi des capillaires impliquant la liaison de la laminine à son récepteur l' $\alpha 6 \beta 1$ intégrine, intervient dans la différenciation et la prolifération cellulaires (Shen et al, 2008).

Les cellules souches neurales sont au contact de la matrice extracellulaire dont on a supposé que le rôle pourrait être de retenir les facteurs de croissance. Les cellules endothéliales des capillaires sont impliquées dans la survie et le destin des cellules souche de la ZSV et de l'hippocampe (Palmer et al, 2000) par la sécrétion dans la matrice de facteurs solubles qui stimulent la prolifération des cellules souches *in vivo* et la neurogenèse *in vitro* (Shen et al, 2004). La rétention de ces facteurs de croissance par la matrice extracellulaire pourrait moduler dans le

temps leur action sur les cellules cibles en régulant la concentration de leur forme libre dans le liquide extracellulaire.

Dans la ZSV et le GD, une sous-population d'astrocytes exprimant la GFAP (cellules de type B) sont des cellules souches neurales (Doetsch et al, 2003 ; Ahn et al, 2005 ; Doetsch et al, 1999 ; Garcia et al, 2004 ; Imura et al, 2003 ; Laywell et al, 2000 ; Sanai et al, 2004). Ces cellules souches donnent par division des cellules de type C appelées « transit-amplifying type C cells » ou TAC qui donnent des neuroblastes (cellules de type A) (Doetsch et al, 1999). Ces neuroblastes migrent ensuite en formant des chaînes de migration cellulaire le long de la ZSV vers le bulbe olfactif où ils se différencient en interneurones (Lledo et al, 2008).

Une corrélation a été fortement suspectée entre l'angiogenèse et la neurogenèse. De nouveaux neurones sont en effet régulièrement générés au contact des vaisseaux dans des sites angiogéniques de l'hippocampe (Palmer et al, 2000), probablement sous l'effet des facteurs solubles sécrétés par les cellules endothéliales (Shen et al, 2004). Ce phénomène est également constaté dans la ZSV où on met en évidence un riche plexus vasculaire au sein duquel on retrouve en abondance des cellules souches astrocytaires et des TAC. Les contacts vasculaires se font en des endroits très particuliers, dépourvus d'expansion astrocytaires ou de péricytes, et où les cellules sont au contact direct de la laminine de la lame basale. Les cellules en division sont au contact de vaisseaux, essentiellement des capillaires dont l'orientation suit la direction des migrations neuroblastiques. Ces vaisseaux sont entourés d'une lame basale riche en une laminine très hétérogène, d'où partent les ramifications appelées fractones jusqu'à la paroi épendymaire du ventricule (Mercier et al, 2002 ; Shen et al, 2008).

La ZSV et le GD de l'hippocampe sont des niches fonctionnellement distinctes. Dans la ZSV, la neurogenèse n'est pas associée à une angiogenèse active, contrairement à ce qui a été observé dans le GD de l'hippocampe où on observe une importante activité mitotique au sein des cellules endothéliales (Palmer et al, 2000). De plus, dans le GD de l'hippocampe, on ne retrouve pas ces zones de la paroi vasculaire dépourvues d'expansions astrocytaires comme dans la ZSV (Shen et al, 2008).

Les cellules endothéliales sécrètent des facteurs diffusibles comme le VEGF, FGF2, IGF1, PEDF, BDNF, qui impactent sur les précurseurs neuraux (Biro et al, 1994 ; Jin et al, 2002 ;

Leventhal et al., 1999; Ramirez-Castillejo et al., 2006; Shen et al., 2004). Ces facteurs se lient probablement à la lame basale des vaisseaux et aux fractones (Mercier et al, 2002 ; Kerever et al, 2007) qui établissent des ponts entre ces derniers et la paroi ventriculaire. Ces constituants de la matrice extracellulaire représentent donc d'importants sites d'intégration de facteurs diffusés à partir du sang, des péricytes et des cellules endothéliales, de l'épendyme et du LCS, et également des neurones. Cela est d'ailleurs étayé par des expériences où le blocage des β 1intégrines, récepteurs des laminines, perturbent l'adhésion et la prolifération des progéniteurs neuraux dans ces niches vasculaires (Shen et al, 2008).

L'interface neurovasculaire au sein des niches à cellules souches représente une cible potentielle des traitements neurorégénérateurs.

1.2 Les cellules souches dans la moelle spinale

La moelle spinale est dépourvue de glie radiaire chez l'adulte. Néanmoins, les cellules épendymaires constituent chez l'adulte une source de cellules souches (Johansson et al, 1999). Trois jours après section expérimentale des cordons dorsaux de la moelle spinale chez la souris, on constate une prolifération des cellules épendymaires qui migrent dans le site lésionnel où elles se différencient presque exclusivement en astrocytes.

Les astrocytes dérivés de l'épendyme élaborent le tissu cicatriciel mais se distinguent topographiquement, moléculairement et fonctionnellement des astrocytes résidents. Ils se concentrent au centre de la lésion tandis que les astrocytes résidents circonscrivent la périphérie du site lésionnel. Ils n'expriment pratiquement pas le GFAP comme les astrocytes résidents. Ils produisent des facteurs neurotrophiques comme le ciliary neurotrophic factor (CNTF), l'hépatocyte growth factor (HGF) et l'insuline growth factor-1 (IGF-1) qui réduisent les pertes neuronales en inhibant l'apoptose Caspase-3 dépendante (Sabelstrom et al, 2013). Après lésion médullaire chez le rat, des cellules dont le phénotype évoque la glie radiaire, sont produites à partir d'astrocytes subpiaux. Elles se répartissent au sein de la substance blanche endommagée où elles participeraient à la reconstruction tissulaire sur le site lésionnel mais leur rôle précis reste à préciser (Shibuya et al, 2003).

1.3 Les facteurs moléculaires du recrutement cellulaire

Les glycoprotéines de la matrice extracellulaire apportent aux cellules souches neurales les conditions micro-environnementales qui déterminent leur devenir au cours du développement et tout au long de l'existence post-natale. Dans les niches à cellules souches, elles favorisent leur survie, orientent leur différenciation et interviennent dans la migration des cellules filles (Sobeih et al, 2002).

1.3.1 Les laminines

Les laminines sont un des principaux constituants de la glia limitans située à la partie superficielle du névraxe, de la membrane basale entourant les vaisseaux du système nerveux central (Erickson et al, 2000) et des fractones. Elles sont également exprimées dans la zone ventriculaire du cerveau au cours de l'ontogenèse (Campos et al, 2004).

In vitro, elles stimulent la prolifération, la migration et la différenciation des cellules souches neurales (Drago et al, 1991). Les dystroglycanes et les intégrines constituent les récepteurs membranaires des laminines. *In vivo*, des mutations portant sur les enzymes assurant la glycosylation des dystroglycanes génèrent des discontinuités de la membrane basale responsables d'anomalies de migration des neurones avec des ectopies neuronales corticales (Yoshida et al, 2001). Lorsqu'on inactive les $\beta 1$ -intégrines exprimées par les cellules de la glie radiaire, leur prolongement apical se détache de la pie mère. Il en résulte des migrations neuronales anormales responsables de troubles de la lamination au sein du néocortex cérébral (Grauss-Porta et al, 2001). Chez l'adulte, l'intégrité des laminines et des $\beta 1$ -intégrines est indispensable à la voie de migration rostrale des neuroblastes qui part de la ZSV vers le bulbe olfactif (Belvindrah et al, 2007).

1.3.2 Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des protéines hautement exprimées par les cellules souches neurales dans les niches neurovasculaires où elles modulent l'action des facteurs de croissance (Kwok 2012 ; Mercier 2012). Leur action s'effectue selon plusieurs mécanismes. En fixant les facteurs de croissance, les protéoglycanes de la matrice extracellulaire régulent leur biodisponibilité, limitent leur dégradation enzymatique, génèrent des gradients de concentration

et agissent comme corécepteurs. Cette fixation dépend de leur degré de sulfatation et par conséquent des sulfatases de la matrice extracellulaire. Les protéoglycanes régulent les mécanismes d'adhésion et de migration cellulaires en interagissant avec les protéines membranaires ou avec les autres composants de la matrice extracellulaire comme les intégrines, les laminines et les collagènes (Kwok et al, 2012). Les deux familles de protéoglycanes les plus impliquées dans la neuroréparation sont les Héparane Sulfate Protéoglycanes (HSPG) et les Chondroïtine Sulfate Protéoglycanes (CSPG).

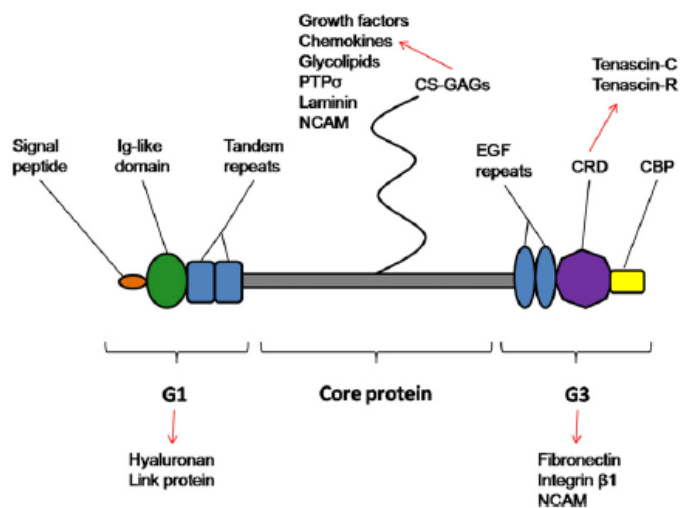


Figure 10. Représentation schématique d'une CSPG et de ses sites d'interaction.

La structure moléculaire comprend une trame protéique sur laquelle s'attachent les GAG, et deux extrémités constituée de différents domaines (G1 à G3). Ces derniers ainsi que les GAG sont des sites de fixation de molécules actives (Bartus et al, 2011).

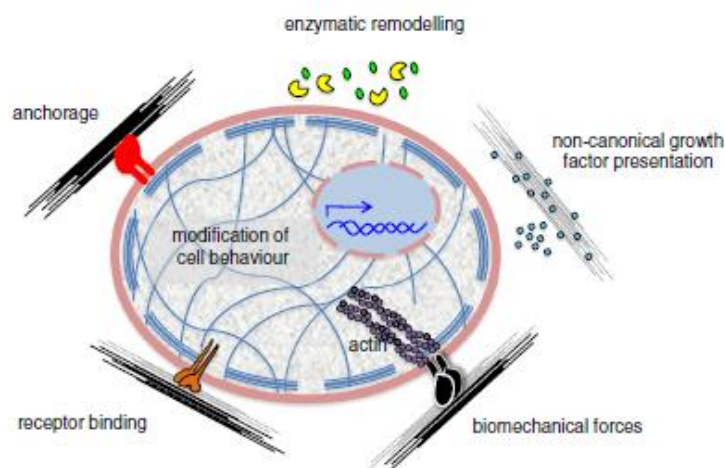


Figure 11. Régulation du comportement cellulaire par les CSPG de la matrice extracellulaire. Fixation sur des récepteurs de la surface cellulaire activant des voies de signalisation cellulaire ou déterminant l'adhérence cellulaire ; Fixation de facteurs de croissance régulant leur biodisponibilité ; Elles constituent un environnement cellulaire dynamique remodelé en permanence par les actions enzymatiques (Gattazzo et al, 2014).

Les HSPGs activent les voies de signalisation de facteurs mitogènes comme le FGF-2 et la BMP-4 en stabilisant la fixation du ligand à son récepteur (Goodger et al, 2008 ; Kraushaar et al, 2012). Elles exercent donc une action stimulatrice sur la prolifération des cellules souches. Il existe en fait plusieurs types moléculaires de HSPG.

Le Perlécane (HSPG2), hautement exprimé par la lame basale du neuroépithélium et des vaisseaux sanguins (Mongiat et al, 2003), module la prolifération et la différenciation cellulaires en régulant la biodisponibilité de facteurs neurotrophiques comme le FGF-2, le vascular endothelial growth factor (VEGF) (Fujita et al, 2010) et le glial cell line-derived neurotrophic (GDNF) (Ai et al, 2007). Il se lie également à la thrombospondine dont il module l'activité (Praillet et al, 1998). Le Perlécane agit en fixant la molécule active selon une affinité qui dépend de son degré de sulfatation, de sorte que le destin des cellules souches neurales dans les niches neurovasculaires dépendrait indirectement de l'activité des sulfatases de la matrice extracellulaire (Bulow et al, 2004 ; Wade et al, 2014). Au cours du développement, la sulfatation des HSPG augmente l'expression du morphogène Sonic hedgehog par le neuroépithélium et oriente la différenciation des cellules neurales vers la lignée oligodendrocytaire aux dépens de la lignée neuronale (Danesin et al, 2006). Des souris mutantes pour le Perlécane, présentent un effondrement de la voie de signalisation Shh (Giros et al, 2007).

Cette régulation de la biodisponibilité des molécules actives par fixation aux HSPG se retrouve dans la neuroréparation, où on observe que la sulfatation des HSPGs majore la formation de la cicatrice gliale et stimule la formation des CSPG (Bradebury et al, 2002).

Les CSPGs, richement exprimées par les NSC, stimulent la prolifération cellulaire médiée par le FGF-2 et potentialisent la différenciation cellulaire induite par l'EGF (Sirko et al, 2010). Leur activité biologique est également conditionnée par leur degré de sulfatation (Ishii et al, 2008).

Une CSPG particulièrement intéressante, le neural-glial antigen 2 (NG2) ou CSPG4 est utilisée comme marqueur des progéniteurs d'oligodendrocytes (OPC). Le NG2 peut se présenter sous deux formes, transmembranaire et libre. La forme transmembranaire, hautement exprimée par les OPC et les capillaires cérébraux (Levine et al, 1996), comporte un noyau protéique intramembranaire et un ectodomaine extracellulaire. La forme libre, sécrétée dans la matrice extracellulaire par les cellules exprimant le NG2, correspond à l'ectodomaine de la forme transmembranaire (Nishiyama et al, 1995).

Après lésion du SNC, on constate une prolifération de cellules exprimant le NG2 sur le site lésionnel. Elles correspondent à des OPC mais également à des cellules méningées et à des macrophages (Levine et al, 1994). Le NG2 a pour effet de stimuler la prolifération et la migration des OPC (Fukushi et al, 2004). Le mode d'action impliquerait la formation de complexes moléculaires avec le récepteur α du platelet-derived growth factor (PDGFR α) (Kucharova et al, 2010), le récepteur au FGF-2 et l' α 3 β 1 intégrine (Fukushi et al, 2004).

1.3.3 Les ténascines

Les ténascines sont des glycoprotéines impliquées dans la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales. La ténascine C, surtout exprimée dans les régions de neurogenèse active, oriente les cellules souches neurales vers la différenciation gliale (Bartsch et al, 1992).

Le rôle de la ténascine R est complexe. Son domaine FN6-8 (Fibronectin type III homologous domains 6-8) inhibe la prolifération des cellules souches neurales et favorise leur différenciation astrocytaire tandis que son domaine EGFL (epidermal growth factor-like) stimule

la différenciation neuronale sans intervenir sur la prolifération cellulaire. Ces effets sont médiés par les $\beta 1$ -intégrines (Liao et al, 2008) et des récepteurs membranaires de la famille des contactines, gangliosides acétylés modulant l'activité des intégrines.

Leur action modulée par l'activité neuronale (Saghateljan et al, 2004) a fait suggérer l'implication des ténascines dans le recrutement de neurones de phénotype adapté aux pertes neuronales. Des lésions ischémiques du cerveau adulte stimulent en effet le recrutement sur le site lésionnel de neurones exprimant le phénotype des cellules détruites. Ce phénotype pourrait être déterminé par un mécanisme dépendant de l'activité des régions cibles (Arvidsson et al, 2002).

1.3.4 La reeline

La reeline est une autre glycoprotéine de la matrice extracellulaire également impliquée dans la migration des neurones et les phénomènes d'adhésion intercellulaire. Elle stimule la motilité cellulaire, inhibe l'adhésion des cellules médiée par les $\beta 1$ -intégrines et permettrait aux neurones de se détacher de la glie radiaire à la fin de leur migration (Dulabon et al, 2000).

Elle se fixe sur les $\beta 1$ -intégrines et sur deux récepteurs aux lipoprotéines, l'ApoER2 et le VLDLR, exprimés par les neurones en migration et les cellules de la glie radiaire (Dulabon et al, 2000 ; D'Arcangelo et al, 1999 ; Luque et al, 2003). Elle pourrait interagir avec la protéine APP (Young-Pearse et al, 2007) et les thrombospondines qui se fixent également sur l'ApoER2 et le VLDLR (Blake et al, 2008).

2) La croissance et le guidage de l'axone

2.1 L'inhibition du cône de croissance

Lorsqu'on sectionne expérimentalement un axone du système nerveux périphérique, l'extrémité sectionnée constitue un cône de croissance, formation d'aspect spiculé soutenue par une structure microtubulaire impliquée dans la croissance et le guidage de l'axone (Huber et al, 2003). Dans les mêmes conditions, l'axone du système nerveux central développe une formation ovalaire appelée bulbe de rétractation dépourvu de capacité régénérative. (Ramon y Cajal, 1928, Li et al, 1995; Hill et al, 2001). Ces bulbes de rétractation se distinguent des cônes de croissance

par l'existence d'un réseau de microtubules anarchique contrastant avec structure microtubulaire organisée des cônes de croissance.

L'organisation structurelle du cône de croissance indispensable à sa fonction régénératrice peut être modulée par des facteurs environnementaux. Des études *in vitro* et *in vivo* montrent que le cône de croissance peut être converti en bulbe de rétractation, en le soumettant à l'action de facteurs antimitotiques comme le nocodazole qui dépolymérise la tubuline. Inversement, la stabilisation de la structure microtubulaire du cône de croissance par administration de paclitaxel (Taxol) empêche la formation du bulbe de rétractation et stimule les capacités régénératives de l'axone. *In vitro*, le taxol inhibe également la formation de bulbes de rétractation sur des cultures primaires de neurones dans un milieu contenant de la myéline d'origine centrale (Erturk et al, 2007).

Ces travaux expérimentaux confirment les données recueillies par Ramon y Cajal en 1928. Ils indiquent que le neurone central garde sa capacité de croissance axonale, et que celle-ci résulte d'une interaction entre le neurone et un système de signalisation supporté par l'environnement neuronal. Les acteurs de ce système de signalisation responsables du caractère non permissif de la matrice extracellulaire sur la repousse des axones comprennent les inhibiteurs dérivés de la myéline, les constituants de la cicatrice gliale et les facteurs diffusibles sécrétés par les cellules mésenchymateuses.

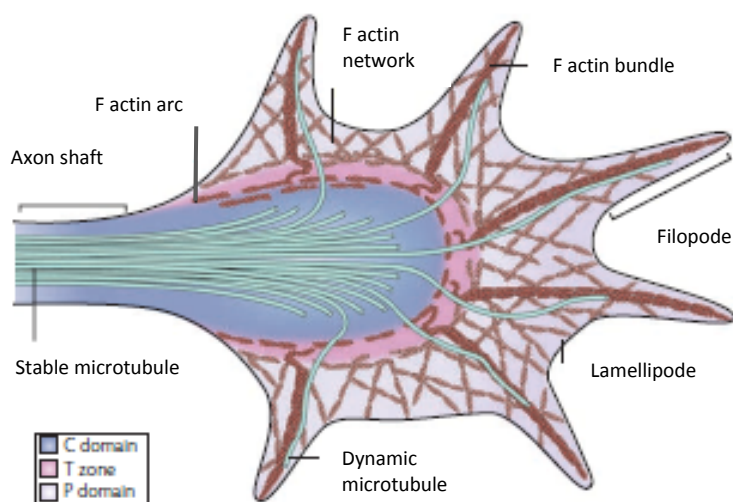


Figure 12. La structure du cône de croissance.

Le cône de croissance présente des prolongements digitiformes appelés filopodes reliés par des voiles membranaires appelés lamellipodes. Sa structure cytosquelettique comporte trois domaines fonctionnels. Le domaine périphérique P comprend les filopodes soutenus par un microfilament d'actine-F, et les lamellipodes soutenus par un réticulum d'actine-F. Le domaine central C contient un axe microtubulaire stable issu de l'axone. Le domaine de transition T, qui s'interface entre les deux précédents, est une structure contractile constituée d'actomyosine, perpendiculaire à l'axe des filopodes. Chaque filopode explore l'environnement extracellulaire par l'intermédiaire d'un axe microtubulaire dynamique « pionnier » (Lowery et al, 2009).

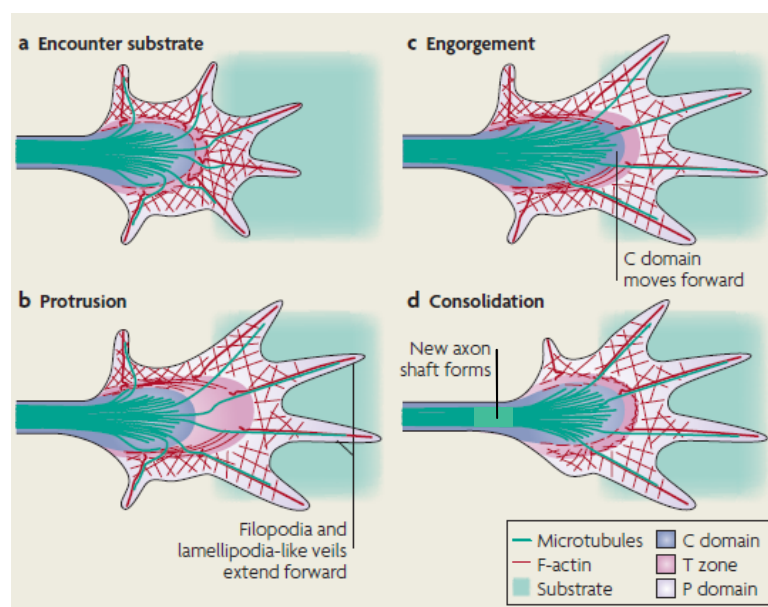


Figure 13. Les 3 étapes de la croissance axonale.

La croissance du cône de croissance est déclenchée par un support adhésif ou un agent chémo-attractif. La protrusion se caractérise par l'extension rapide des filopodes et des lamellipodes. Au cours de l'engorgement, le domaine central, les filopodes et les lamellipodes sont envahis par des microtubules qui apportent les organites cellulaires. Au cours de la consolidation, la contraction de l'actomyosine du domaine T compacte les microtubules nouvellement formés tandis que les filaments d'actine-F se dépolymérisent au niveau de la partie rétrécie du cône de croissance (Lowery 2009).

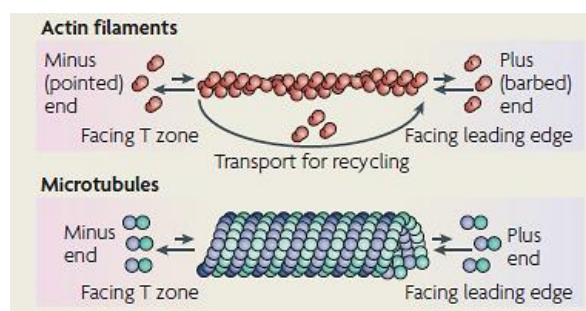


Figure 14. La dynamique cytosquelettique.

Les filaments d'actine et les microtubules sont des structures polymériques polarisées dont la dynamique dépend de la charge énergétique des monomères.

Au cours de la croissance du filopode, l'ATP-actine est ajoutée à son extrémité distale. Après hydrolyse de l'ATP, l'actine-ADP se détache de l'extrémité proximale.

Un mécanisme analogue affecte les microtubules. Les dimères de tubuline-GTP sont ajoutés à leur extrémité distale tandis que l'hydrolyse du GTP provoque le détachement des dimères de tubuline-GDP à leur extrémité proximale. Des protéines comme la MAP1B se lient au microtubule et le stabilisent (Lowery et al, 2009).

2.2 Les inhibiteurs associés à la myéline

Les inhibiteurs dérivés de la myéline sont les premiers inhibiteurs de la croissance axonale à avoir été identifiés. Ils sont pour la plupart des protéines membranaires exprimées par les oligodendrocytes matures et la myéline du système nerveux central. La caractérisation biochimique de Nogo permet dans un premier temps de produire des anticorps dont l'administration après lésion médullaire chez le rat permet d'obtenir une régénération axonale (Caroni et al, 1988). Deux autres molécules furent ensuite identifiées, Mag et OMgp.

2.2.1 Nogo

La protéine Nogo est le premier inhibiteur dérivé de la myéline à avoir été isolé puis cloné (Chen et al, 2000 ; GrandPre et al, 2000 ; Prinjha et al, 2000). Nogo fait partie de la famille des réticulons, qui regroupe des protéines associées au réticulum endoplasmique. Elle existe sous trois isoformes, Nogo-A, Nogo-B et Nogo-C, résultant de l'épissage alternatif d'un ARNm primaire. La mieux caractérisée est Nogo-A. Très fortement exprimée par les oligodendrocytes et la myéline, l'analyse de sa séquence et l'étude de sa topologie révèlent deux domaines inhibiteurs : Nogo-66 et amino-Nogo. La topologie de Nogo-A reste discutée, mais l'essentiel de la molécule se situerait dans le réticulum endoplasmique. Seule une fraction de la protéine, Nogo-66, serait présente à la surface de la cellule et se fixerait au récepteur (Voeltz et al, 2006,

GrandPre et al, 2000). Après destruction de la myéline ou des oligodendrocytes, les deux domaines, Nogo-66 et amino-Nogo, sont libérés dans l'environnement extracellulaire où ils sont exposés au contact des neurones (Filbin et al, 2003).

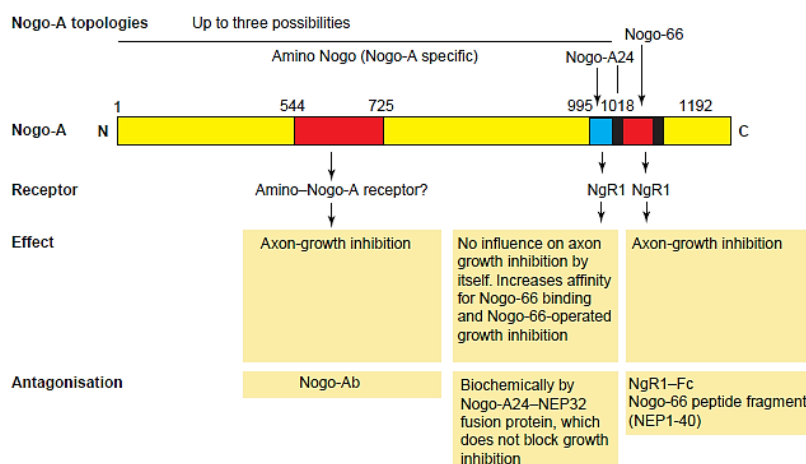


Figure 15. Structure moléculaire de Nogo, sites de fixation, effets biologiques.

L'étude pharmacologique de Nogo-A sur des modèles de lésions médullaire a donné des résultats très contradictoires et discutés. En effet, contrairement à ce qu'on pouvait attendre, aucune repousse axonale au-delà du site lésionnel n'a été constatée sur des souris mutantes pour Nogo-A (Zheng et al, 2003 ; Lee et al, 2009). Par contre, l'utilisation d'anticorps anti Nogo aurait permis une repousse neuritique significative et amélioré le recouvrement fonctionnel sur des modèles de lésions médullaires chez le rat (Liebscher et al, 2005). Il est donc actuellement difficile d'extrapoler ces résultats chez l'homme.

2.2.2 MAG

Par la suite, d'autres inhibiteurs de la pousse neuritique dérivés de la myéline ont été isolés, parmi lesquels la MAG (Myelin Associate Glycoprotein). Il s'agit d'une protéine transmembranaire exprimée par les oligodendrocytes et les cellules de Schwann où elle est superficielle (Trapp et al, 1988). MAG fait partie de la superfamille des immunoglobulines (Ig) et contient 5 domaines Ig extracellulaires. Lors de destruction de la gaine de myéline, elle pourrait être libérée dans le milieu extracellulaire sous la forme de fragments solubles (Tang et al, 2001).

Il est intéressant de noter que la MAG stimule la croissance axonale au cours de l'embryogenèse et la période néonatale. L'effet de la molécule sur la neuritogenèse s'inverserait au moment de la naissance (Johnson et al, 1989 ; De Bellard et al, 1996 ; Turnley et al, 1998). Le moment à partir duquel la MAG inhibe la croissance neuritique sur des modèles *in vitro* coïncide d'ailleurs avec le moment où les progéniteurs neuraux perdent la faculté de se régénérer spontanément *in vivo* (Cai et al, 2001).

2.2.3 OMgp

L'OMgp (oligodendrocyte myelin glycoprotein) est une glycosyl phosphatidyl inositol protein ou (GPI)-protéine membranaire. Elle est exprimée par les oligodendrocytes situés à proximité des nœuds de Ranvier et par plusieurs variétés de neurones (Habib et al, 1998). Tout comme MAG et Nogo, OMgp inhibe la croissance neuritique en induisant la rétraction du cône de croissance. Son rôle physiologique chez l'adulte, suggéré par la topographie particulière des oligodendrocytes qui l'expriment, serait d'inhiber la formation d'expansions neuritiques collatérales aux étranglements de Ranvier (Huang et al, 2005).

2.2.4 Mécanismes d'action

Le mécanisme d'action de ces inhibiteurs dérivés de la myéline a été d'abord élucidé grâce à l'identification du récepteur de Nogo, appelé NgR1 (Fournier et al, 2001). Par la suite, il a été démontré que d'autres inhibiteurs dérivés de la myéline, en particulier MAG et OMgp, activaient NgR1. NgR1 étant dépourvu de domaine intracytoplasmique, la transduction du signal suscité par la fixation du ligand requiert la constitution de complexes membranaires unissant NgR1 à d'autres récepteurs comme P75 ou TROY, protéines apparentées aux récepteurs du TNF (Wong et al, 2002 ; Park et al, 2005).

La voie de signalisation intracellulaire mise en jeu par la fixation de Nogo sur NgR1 comprend une cascade de protéines kinases intervenant toutes dans la régulation du cytosquelette cellulaire : ROCK, Lim et cofiline (McKerracher et al, 2006). L'activation de ROCK, enzyme kinase associée à RhoA, stimule une chaîne de phosphorylations enzymatiques aboutissant *in fine* à la déstructuration des filaments d'actine responsable du collapsus du cône de croissance et à la constitution de cônes dystrophiques (Kaplan et al, 2003). Des études *in vitro* basées sur la

délétion du gène codant pour NgR1, le récepteur de Nogo66, ont été réalisées pour confirmer ce mécanisme d'action. En réalité, la délétion de NgR1 contrecarre peu l'inhibition de Nogo sur la croissance axonale et conduit à suggérer l'intervention de récepteurs supplémentaires.

Des expérimentations sur des cultures de neurones ont ainsi montré que d'autres récepteurs comme le récepteur PirB (paired immunoglobulin-like receptorB) présentent une grande affinité pour les ligands Nogo, MAG et OMgp. Ainsi, le blocage de PirB inhibe partiellement l'activité de Nogo66, de MAG, d'OMgp et de la myéline, tandis que le blocage combiné de PirB et NgR bloque radicalement l'effet de la myéline sur la croissance axonale *in vitro* (Atwal et al, 2008).

Il est intéressant de constater que NgR1 et PirB sont aussi impliqués dans les phénomènes de plasticité neuronale. La délétion des gènes codant pour PirB ou NgR allonge de 1 à 6 mois la période critique pour la dominance oculaire chez la souris. Ces résultats d'études menées sur les périodes critiques suggèrent que l'activation de NgR1 par Nogo, MAG et OMgp consolide les circuits neuronaux modulés par l'expérience (McGee et al, 2005). La réponse inhibitrice sur la croissance axonale médiée par Nogo reste complexe et mal connue.

L'intervention des intégrines dans la voie de signalisation activée par Nogo-A a été récemment mise en évidence. Ainsi, l'activation des $\beta 1$ -intégrines, exprimées par le cône de croissance, antagonise l'inhibition exercée par Amino-Nogo sur la croissance neuritique. Il en résulte que l'inhibition de la repousse axonale par Amino-Nogo pourrait s'exercer via une inhibition de la voie de signalisation médiée par les $\beta 1$ -intégrines (Hu et al, 2008). Par ailleurs, d'autres intégrines sensibles à Amino-Nogo, largement exprimées dans le cerveau adulte, sont retrouvées dans le cône de croissance de l'axone. Il est intéressant de noter que la voie de signalisation impliquant les $\beta 1$ -intégrines est une de celles empruntées par certaines TSR dont la SCO-Spondine.

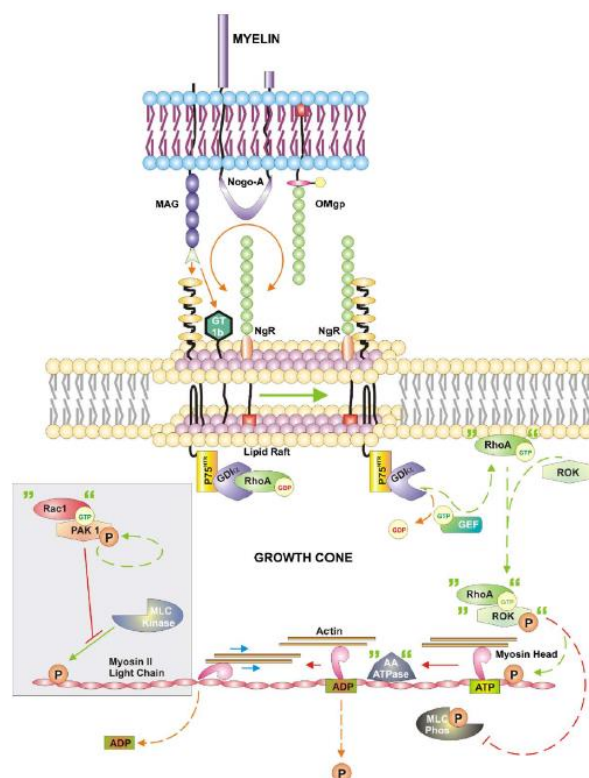


Figure 16. Mécanisme d'action des MAI. Collapsus du cône de croissance.

Le MAI se fixe sur son récepteur NgR et active le domaine intracellulaire de NgR, P75NRT. Ce dernier active RhoA qui se fixe sur la membrane plasmique et active la Rho-kinase ROK. ROK active à son tour des ATPases qui hydrolysent la myosine-ATP du domaine de transition et l'actine-ATP des filopodes. Il en résulte une rétraction du cône de croissance et des filopodes (Profyris et al, 2003).

2.3 La matrice extracellulaire et la cicatrice gliale

Les inhibiteurs dérivés de la myéline ne suffisent pas à expliquer seuls l'incapacité de la substance blanche à se régénérer. En effet, lorsqu'on transplante des neurones adultes dans de la substance blanche normale ou lésée, on peut observer des images de régénérescence axonale de bonne qualité (Davies et al, 1997, 1999). Cela suggère la participation d'autres facteurs inhibiteurs comme les glycoprotéines de matrice extracellulaire exprimées par la cicatrice gliale.

Certaines de ces molécules sont également exprimées par le système nerveux périphérique, où elles n'empêchent pas la repousse des fibres nerveuses. Les mécanismes régulant la régénération de la substance blanche ne peuvent donc pas non plus s'expliquer par la simple interaction entre le neurone et des molécules qui inhiberaient ou stimuleraient la repousse

axonale. Il apparaît en réalité, que les composants de la matrice extracellulaire orientent l'axone vers la formation d'un cône de croissance fonctionnel ou une structure dystrophique non opérationnelle selon le type de neurone et selon les modifications moléculaires de l'environnement cellulaire liées à l'âge et au contexte lésionnel (Condic et al, 2002).

Le rôle de la réaction gliale sur la régénération n'est pas univoque. Les cellules microgliales, les astrocytes, les précurseurs oligodendrogliaux et les cellules méningées recrutées sur le site lésionnel, isolent le foyer de contusion, le débarrassent des débris cellulaires et limitent son extension. Les astrocytes activés participent à la reconstitution de la barrière hémato-encéphalique. Certains types d'astrocytes favoriseraient même la repousse axonale (Faulkner et al, 2004).

2.3.1 Les CSPG

Les CSPG constituent une famille de glycoprotéines de la matrice extracellulaire, regroupant les aggrécanes, les brévicanes, les neurocanes, les phosphacanes et le NG2, impliquées dans les processus de croissance, d'adhésion et de migration cellulaires chez l'embryon et l'adulte (Rhodes et al, 2004). Elles sont exprimées les astrocytes activés et les précurseurs d'oligodendrocytes recrutés sur le site lésionnel notamment là où la barrière hémato-encéphalique est rompue (Jones et al, 2003). Certaines molécules stimulent, d'autres inhibent la croissance neuritique. L'expression des deux types de molécules augmente sur le site lésionnel, mais chez l'adulte, celle des CSPG inhibitrices prédomine largement (Jones et al, 2003, McKeon et al, 1991).

Leur structure comprend une charpente protéique sur laquelle sont greffées de manière spécifique des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) qui supportent les fonctions inhibitrices exercées par la molécule (Gilbert et al, 2005). Ainsi, *in vitro* et *in vivo*, le traitement par une chondroïtinase ABC, enzyme qui clive la protéine de ses chaînes GAG, antagonise l'inhibition exercée par la CSPG sur la neuritogenèse (Zuo et al, 1998). Le rôle inhibiteur de certaines CSPG comme le NG2 pourrait néanmoins être exercé par le cœur protéique de la molécule (Ughrin et al, 2003). Il est intéressant de noter que contrairement à la molécule NG2, les cellules gliales exprimant le NG2, notamment les OPC, favorisent la croissance de l'axone (Yang et al, 2006).

Le mode d'action des CSPG n'est pas clairement établi. L'inhibition peut résulter de la mise en route de voies de signalisation, de compétition avec des molécules stimulant la repousse ou de la constitution d'une barrière mécanique. Les CSPG empruntent les voies de signalisation de Rho-ROCK (Monnier et al, 2003) et de la protéine kinase C (PKC) (Sivasankaran et al, 2004). L'existence de voies de signalisation communes aux inhibiteurs dérivés de la myéline (MAI) suggère des interactions dont il peut résulter un effet additionnel ou compétitif. Ainsi, la phosphorylation Ca dépendante du récepteur à l'EGF active l'inhibition des CSPG et des MAI (Koprivica et al, 2005). Inversement, la CSPG transforme l'effet attractif de Sema5A en un effet répulsif (Kantor et al, 2004).

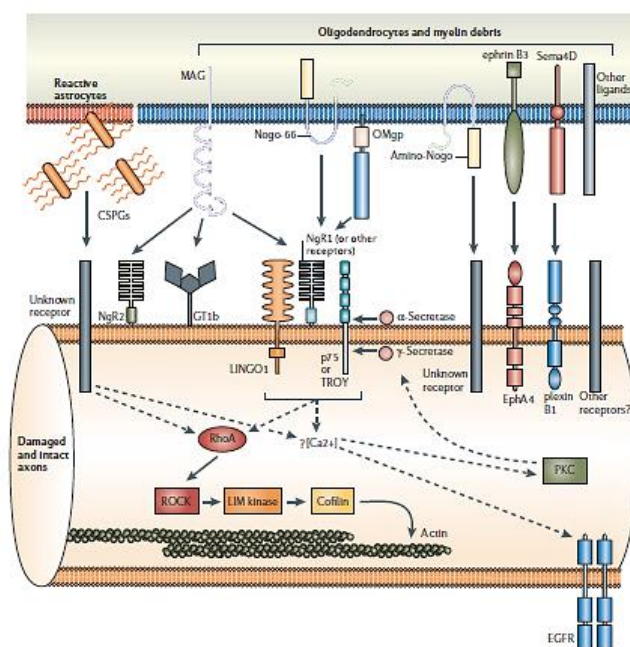


Figure 17. Mode d'action des CSPG. Interaction avec les MAI.

L'inhibition de la croissance axonale par les CSPG et les astrocytes activés partage des voies de signalisation communes aux MAI, en particulier RhoA et le calcium intracellulaire. RhoA met en route une cascade métabolique aboutissant à la déphosphorylation de l'actine-ATP. Le calcium activerait le récepteur de l'EGF (EGFR) et la protéine kinase C (PKC) qui activerait P75NRT, domaine intracellulaire de NgR (Yiu et al, 2006).

2.3.2 Les laminines

Les laminines, sont des molécules trimériques résultant de l'assemblage de trois sous-unités α , β et γ . Elles sont des constituants de la membrane basale et de la matrice extracellulaire. Peu exprimées dans le système nerveux central, elles sont très abondantes dans le système

nerveux périphérique (Luckenbill-Edds et al, 1997). Surexprimées par les astrocytes lors de lésion médullaire ou cérébrale, elles circonscrivent le foyer lésionnel et participent à la cicatrice gliale (Giftochristos et al, 1988 ; Risling et al, 1993 ; Liesi et al, 1985 ; Stichel et al, 1994).

Au cours du développement, certaines laminines, en particulier la laminine- $\gamma 1$, stimulent la croissance de l'axone (Calof et al, 1985) selon un mécanisme impliquant les $\beta 1$ -intégrines (Tomaselli et al, 1990). D'autres isoformes, notamment la laminine-s et la lamine 11, exprimées par la lame basale synaptique, stoppent la croissance neuritique (Patton et al, 1997). Elles sont également impliquées dans le guidage de l'axone en croissance et les migrations neuronales (Chen et al, 2009).

2.3.3 Facteurs sécrétés par les fibroblastes et les cellules méningées

Certains composants de la matrice extracellulaire qui guident la migration de l'axone et régulent la synaptogenèse au cours du développement, sont réprimés lorsque la mise en place des faisceaux de substance blanche s'achève. Chez l'adulte, ils régulent la plasticité neuronale et stabilisent les connections synaptiques.

Au cours du processus de cicatrisation, ces ligands inhibiteurs sont surexprimés par les cellules gliales et les fibroblastes recrutés sur le site lésionnel (Qiu et al, 2000). Leur interaction avec les récepteurs exprimés par le cône de croissance des axones contribue à l'inhibition exercée par la cicatrice gliale sur la régénération axonale (Fournier et al, 2001).

2.3.3.1 Les sémaphorines

La sémaphorine 3A (Sema3A) est exprimée par les fibroblastes méningés et les motoneurones de la moelle spinale (Pasterkamp et al, 1998). Dans le foyer lésionnel, la Sema3A libérée par les fibroblastes se fixe aux CSPG. Le complexe Sema3A-CSPG ainsi constitué se lie à un corécepteur membranaire unissant la Plexine (Plex), la Neuropilin1 (NP-1) et la protéine d'adhésion cellulaire L1 (L1CAM) exprimée par le cône de croissance et stoppe la repousse de l'axone (Pasterkamp et al, 1999).

L'activation du complexe NP-1/Plex par la sémaphorine3A inhibe deux GTPases impliquées dans l'assemblage des filaments d'actine, Rac1 et RhoA. Leur inhibition conduit à la

l'activation d'une protéine dépolymérisante du filament d'actine, la cofiline (Aizawa et al, 2001) dont il résulte une désorganisation des filaments d'actine structurant la trame cytosquelettique des filipodes et des lamellipodes avec morphologiquement, un collapsus du cône de croissance qui devient dystrophique. Plus généralement, ces altérations du cytosquelette perturbent les propriétés d'adhésion et de motilité cellulaires, ainsi que le transport axoplasmique (Ramakers et al, 2002).

Les mécanismes d'action des sémaphorines relèvent d'une grande complexité pour des raisons liées à la machinerie et à l'environnement cellulaires. Leurs effets sur le cytosquelette varient selon la population neuronale, la nature et la position du récepteur à la surface cellulaire, les voies de signalisation activées (RhoA ou Rac1). Ils peuvent être modulés par d'autres ligands (Ephrine, Nérine, Slit...) agissant sur les mêmes voies de signalisation ou sur des voies convergentes (RhoA, Rac1, CDC42). L'action finale sur le métabolisme microtubulaire repose également sur la nature de l'effecteur cytosquelettique (Myosine II, Cofiline, Formine, Arp2/3...) impacté par les différentes voies de signalisation (Lowery et al, 2009).

Les protéoglycanes de l'environnement cellulaire modulent l'action des sémaphorines ainsi que celle d'autres signaux guidant la croissance de l'axone. Les domaines thrombospondin-repeat (TSR) contenues dans Sema5A, ont la propriété d'interagir avec les chaînes GAG des CSPG et des HSPG de la matrice extracellulaire. Des études *in vivo* sur des embryons de rats montrent que le sens du signal exercé par Sema5A sur le guidage de l'axone en croissance est déterminé par la nature de la protéoglycane. Au cours du développement, l'interaction de Sema5A avec les HSPG résulte en un signal attractif sur l'axone, tandis que celle avec les CSPG convertit Sema5A en un signal inhibiteur (Kantor et al, 2004). Ce dispositif participe à l'organisation fasciculaire de la substance blanche au cours du développement. Dans le site lésionnel, il contribue à expliquer l'inhibition de l'axonogenèse par les CSPG d'origine astrocytaire selon un mécanisme impliquant les sémaphorines.

L'action des sémaphorines sur le cône de croissance est également modulée par les neurotrophines. Par exemple, le BDNF sensibilise le cône de croissance à l'action de la Sema3A, tandis que le NGF augmente sa résistance (Dontchev et al, 2002) en se fixant sur le P75 qui bloque la voie de signalisation RhoA (Hubert et al, 2003).

2.3.3.2 Les éphrines

Les éphrines sont des protéines réparties en deux sous-classes, les Ephrines A et B. Elles se lient à des récepteurs membranaires appartenant également à deux sous-classes, les EphA et les EphB, qui sont des récepteurs tyrosine kinase (RTK). Attachées elles-mêmes à la membrane cellulaire, leur interaction avec leurs récepteurs nécessite une interaction cellulaire. L'effet du complexe ligand-récepteur est bidirectionnel, s'exerçant à la fois sur la cellule présentant le ligand Ephrine et sur la cellule cible exprimant le récepteur Eph.

Au cours du développement, l'EphrineB2 et B3, EphA4 et EphB2 sont des signaux de migration cellulaire et de guidage axonal intervenant dans la structuration des réseaux neuronaux. L'EphrineB3 participe au le guidage des axones constituant le faisceau corticospinal au cours de l'ontogenèse (Flanagan et al, 1998 ; Holder et al, 1998 ; McLaughlin et al, 1999).

Sur le site lésionnel, elles sont impliquées dans le rétablissement de la barrière hémato-encéphalique et exercent un effet répulsif sur le guidage de l'axone en croissance. L'EphrineB2 et son récepteur EphB2 sont normalement exprimés par les astrocytes et les fibroblastes méningés (Miranda et al, 1999). On constate une surexpression d'EphrineB2 par les astrocytes activés et une surexpression de son récepteur EphB2 par les fibroblastes méningés recrutés sur le site lésionnel. L'interaction de ces deux populations cellulaires conduit à l'élaboration d'une nouvelle la lame basale (Bundesen et al, 2003) indispensable au rétablissement de la barrière hémato-encéphalique.

Parallèlement, la surexpression d'EphA3 par les astrocytes activés contribue à expliquer l'effet inhibiteur de la cicatrice gliale sur la croissance axonale (Irizarry-Ramirez et al, 2005). L'EphA7 surexprimé par les astrocytes activés est un régulateur de l'apoptose chez le rat (Figuera et al, 2006).

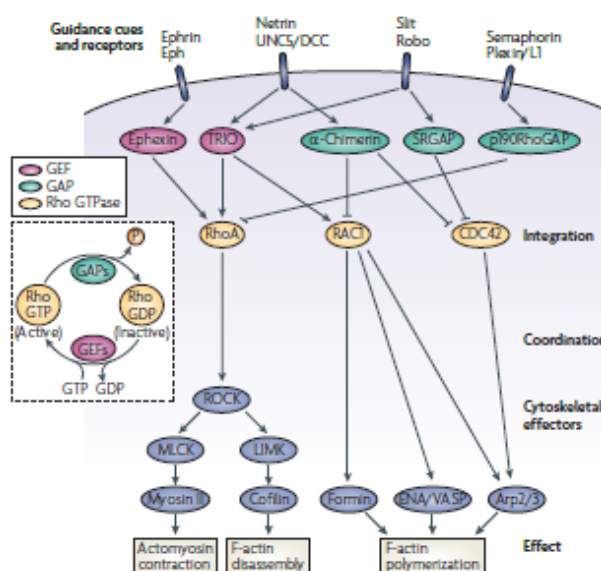


Figure 18. Intervention des GTPases RhoA, rac1 et CDC42, dans la régulation du fonctionnement du cône de croissance.

Les signaux de guidage axonal activent des molécules comme les GEF ou les GAPs qui respectivement activent ou inhibent de petites GTPases de la famille Rho. Les GTPases (RhoA, RAC1, et CDC42) activées par fixation de GTP modulent l'activité des effecteurs cytosquelettiques : contraction de l'actomyosine du domaine T du cône, polymérisation ou dépolymérisation de l'actine-F des filopodes (Lowery et al, 2009).

In vitro, l'éphrineB3 exerce une forte inhibition sur la croissance neuritique impliquant le récepteur EphA4 (Benson et al, 2005). Fortement exprimés par les oligodendrocytes et la myéline du système nerveux central (Benson et al, 2005), l'éphrineB3 complète probablement l'action des inhibiteurs dérivés de la myéline sur la repousse de l'axone dans le foyer lésionnel, d'autant plus que son récepteur, EphA4, qui se lie également à éphrineB2, est surexprimé par l'axone des neurones axotomisés (Fabes et al, 2006).

2.3.4 Nétrines et slits

Les nétrines et les slits constituent des signaux répulsifs ou attractifs pour la croissance et le guidage axonal selon le type de récepteurs exprimé par le cône de croissance et la nature de l'environnement cellulaire. Leur structure glycoprotéique contient des sites de liaison pour les HSPG et les β 1-intégrines. (Bradford et al, 2009).

Les nétrines sont des protéines dont la séquence en acides aminés présente les apparentes aux laminines (Huber et al, 2003). Elles sont exprimées par les cellules de la floor plate au cours

de l'ontogenèse et agissent différemment sur le cône de croissance selon la nature de la population neuronale et le type de récepteur exprimé par l'axone. Ainsi, l'effet chémoattractif de la nétrine-1 est médié par les récepteurs Dcc (Chan et al, 1996) et son effet répulsif par les récepteurs Unc-5 (Keleman et al, 2001).

Les molécules slit sont également sécrétées par les cellules gliales de la ligne médiane du système nerveux central en développement (Ypsilanti et al, 2010 ; Itoh et al, 1998). Leur liaison aux récepteurs axonaux Robo1 et Robo2 constitue un puissant signal répulsif pour l'axone (Ypsilanti et al, 2010).

Le signal de guidage axonal exercé par les nétrines et les slit semble fondamental dans la mise en place des fibres commissurales et dans la fasciculation, la décussation des fibres de la ligne médiane s'opérant grâce à l'expression successive par l'axone de récepteurs aux nétrines puis aux slit. Ainsi, des souris mutantes pour le Dcc ou la nétrine-1 présentent une agénésie complète du corps calleux (Barallobre et al, 2005). Des souris mutantes pour slit1 et slit2 présentent des anomalies portant sur la mise place du faisceau corticospinal et du corps calleux (Bagri et al, 2002).

L'environnement cellulaire module l'activité de ces molécules. L'effet répulsif des molécules slit impliquant Robo1 et Robo2 apparaît potentialisé par les HSPG de la cicatrice gliale (Hu et al, 2001). Les effets de la nétrine-1 impliquant les récepteurs DCC et ceux des molécules slit sont modulés par les autres molécules de guidage envisagées précédemment, les voies de signalisation comprennent ici encore l'activation de RhoA, rac-1 et CDC42. L'effet de la nétrine-1 dépend du taux d'AMPc dans le cône de croissance et de la concentration en Ca^{2+} extracellulaire. La fixation de la nétrine-1 sur le DCC est attractive lorsque l'AMPc est abondante et devient répulsive lors de raréfaction de l'AMPc. Ces effets sont bloqués par un épuisement en Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire (Ming et al, 1997), ce dernier étant un activateur de RhoA (Singh et al, 2006). A noter que l'effet de la nétrine-1 sur le guidage axonal est également modulé par l'entrée du Ca^{2+} générée par l'activité électrique de l'axone (Ming et al, 1997).

2.3.5 Les protéines thrombospondines type-1 repeat (TSR)

Certaines protéines de la matrice extracellulaire présentant des motifs thrombospondin type-1 repeat (TSR) agissent sur la croissance axonale et la synaptogenèse. Elles interviennent au cours de la morphogenèse du système nerveux central et au cours de la neuroréparation. Elles constituent une famille de protéines complexes regroupant la thrombospondine-1, la F-Spondine et la SCO-spondine (Meinzel et al, 2008).

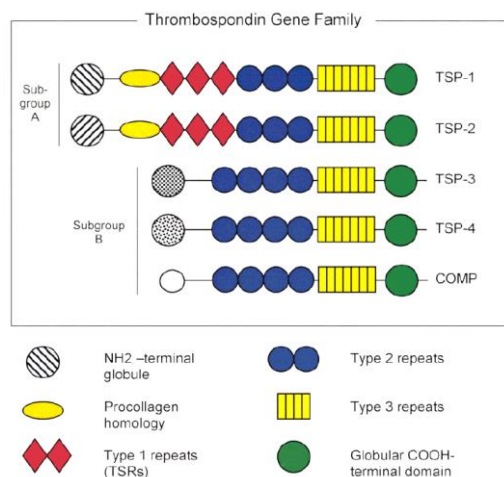


Figure 19. Organisation des gènes codant pour les thrombospondines (Adams et al, 2000).

Une des mieux étudiées est la thrombospondine-1 (TSP-1). Sécrétée par les astrocytes, elle stimule *in vitro* la croissance neuritique (Neugebauer et al, 1991) et la migration des OPC (Scott-Drew et al, 1997) selon un mécanisme impliquant les β 1-intégrines (Tomaselli et al, 1990). Elle est surexprimée sur le site lésionnel où elle stimule la croissance neuritique (Hoffmann et al, 1999). Leur étude sera plus précisément abordée plus loin.

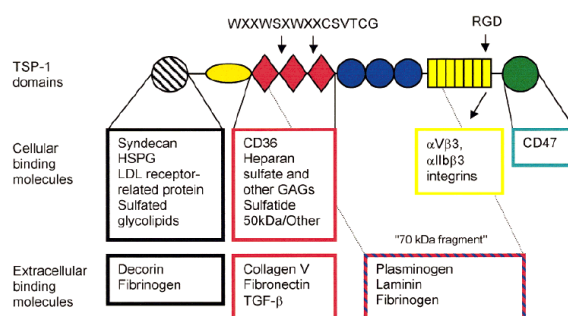


Figure 20. Sites d'interaction des TSP avec différents ligands de la matrice extracellulaire (Adams et al, 2000).

Sécritée par les cellules de la floor plate, la F-Spondine stimule la croissance des axones commissuraux mais inhibe celle des motoneurones. La structure de la molécule comprend 6 motifs TSR et un motif reeline. Sa fixation sur le récepteur 2 de l'Apolipoprotéine E (ApoEr2) modulerait la formation de protéine A β à travers une interaction avec l'APP exprimée à la surface cellulaire (Hoe et al, 2005).

La SCO spondine est sécrétée par les cellules épendymaires de l'organe subcommissural situé à la partie rostrale de l'aqueduc du cerveau chez tous les vertébrés au cours du développement (Gobron et al, 1996). Certains motifs TSR de la molécule stimulent *in vitro* la croissance neuritique selon un mécanisme également médié par les β 1-intégrines (Bamdad et al, 2004). Elle serait impliquée dans le développement des faisceaux de substance blanche et dans la mise en place de la commissure épithalamique (Hoyo-Becerra et al, 2010). Cette molécule sera plus amplement décrite par la suite.

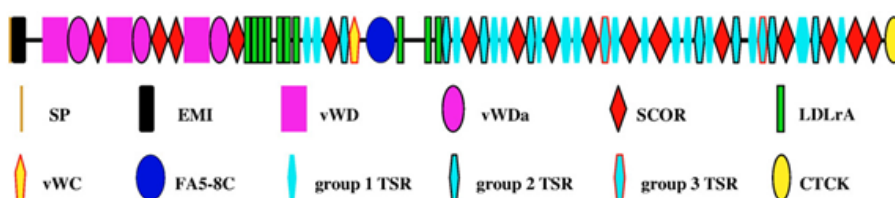


Figure 21. La structure de la SCO-spondine.

La SCO-spondine est une glycoprotéine d'environ 500 kDa présentant un arrangement unique de motifs. Elle est constituée de 26 motifs « thrombospondin type 1 repeat » (TSR), neuf répétitions de type A du récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDLR α), deux domaines ressemblant au facteur de croissance épidermique (EGF-like), trois motifs de type D du facteur von Willebrand (vWD) en NH₂-terminal et un motif riche en cystéines (CTCK) en COOH-terminal (Meiniel et al, 2007).

3) La synaptogenèse

3.1 Les CSPG

Les CSPG sont fortement impliquées dans la régulation de la plasticité du système nerveux central. A la fin de leur développement, lorsque les faisceaux ont atteint leurs cibles et lorsque les connexions sont établies, la matrice extracellulaire constitue autour des neurones des maillages périneuraux denses (perineural net) enveloppant les réseaux synaptiques de la moelle et du cerveau (figure 22). Ils assureraient la constance de l'architecture tissulaire des réseaux neuronaux (Margolis et al, 1993) et stabiliseraient les synapses (Celio et al, 1994). Au cours de la

maturation du cerveau, des modifications graduelles de la matrice protéique et des chaînes de glycosaminoglycane modifient successivement les propriétés physiologiques des CSPG (Nandini et al, 2006). La surexpression des CSPG au sein de ces maillages périneuraux correspondrait à la diminution de la plasticité synaptique constatée à la fin des périodes critiques (Bush et al, 2007).

Après lésion du système nerveux central, les astrocytes activés et les OPC surexpriment les CSPG comme les neurocanes, les phosphacanes et le versicanes (Rhodes et al, 2004), composants de la cicatrice gliale qui inhibent la neuritogenèse et la synaptogenèse. L'administration locale de chondroïtinase ABC après lésion de la substance blanche cérébrale ou médullaire stimule la repousse axonale et la formation de nouvelles synapses. Le rôle exercé par les CSPG n'est cependant pas univoque. En effet, une lésion expérimentale du cortex entorhinal, suscite une surexpression de la phosphacane au cours de la phase de synaptogenèse. L'absence de colocalisation avec la GFAP tend à montrer que la phosphacane n'est pas produite par les astrocytes. Ces résultats montrent que certaines CSPG ont un effet favorable sur la synaptogenèse sur des modèles expérimentaux (Harris et al, 2011).

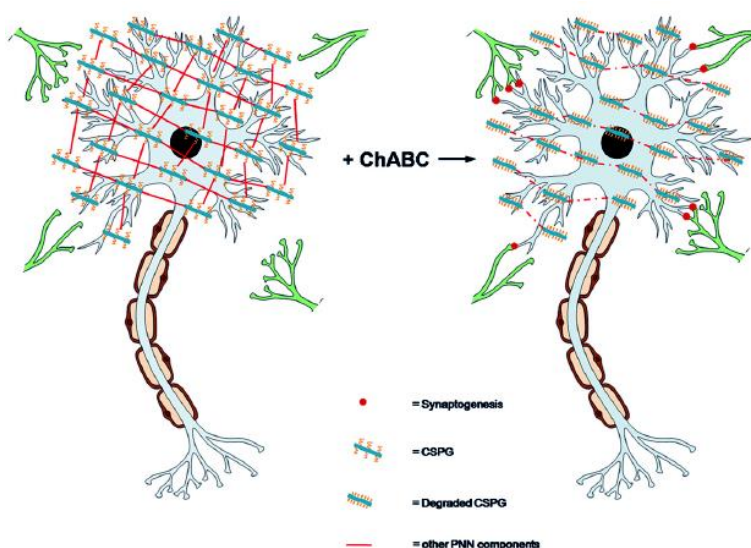


Figure 22. Le rôle des CSPG dans la stabilisation des réseaux synaptiques. Les CSPG constituent autour des arborisations dendritiques une structure réticulaire périneurale (perineuronal net ou PNN) qui stabilise les synapses et limite leur plasticité. Le traitement par chondroïtinases sur ces PNN libère les terminaisons dendritiques et favorise la synaptogenèse (Bartus et al, 2012).

3.2 La reeline

La reeline favorise la formation des arborisations dendritiques (Niu et al, 2008), et la synaptogenèse (Pujadas et al, 2010). Elle stimule la plasticité synaptique chez l'adulte en se fixant sur deux récepteurs, l'ApoER2 et le VLDLR (Weeber et al, 2002).

3.3 Les thrombospondines

Au cours du développement, les thrombospondines 1 et 2 sont sécrétées par les astrocytes immatures. Elles stimulent la synaptogenèse *in vitro* et *in vivo*. Des cellules ganglionnaires rétiniennes cultivées dans un milieu appauvri en TSP-2 ne développent pas de connexions synaptiques. On retrouve alors des structures pré et post-synaptiques dissociées les unes de autres. Il est néanmoins difficile de préciser si les TSP-1 et 2 stabilisent des synapses existantes comme le fait la laminine $\alpha 4$ (Patton et al, 2001), ou si elles augmentent la formation de nouvelles synapses (Christopherson et al, 2005). Le taux de TSP dans le système nerveux central est régulé au cours du développement et semble corrélé à l'aptitude à former de nouvelles synapses (Ullian et al, 2001). Il diminue ainsi à la fin de l'ontogenèse cérébrale, augmente dans la période postnatale pour devenir quasi-indétectable chez l'adulte (Iruela-Arispe et al, 1993).

Dans le cerveau adulte, la TSP-1 et la TSP-2 sont surtout exprimées par les astrocytes et la microglie activés (Lin et al, 2003). Leur expression augmente après lésion du cortex (Chamak et al, 1994) ou de la moelle (Benton et al, 2008). *In vitro*, le traitement par la TSP-1 d'une culture de neurones hippocampiques appauvrie en astrocytes stimule la formation de synapses excitatrices (Hughes et al, 2010). *In vivo*, la synaptogenèse diminue de manière significative chez des souris mutantes pour TSP-1/2 par rapport au phénotype sauvage après lésion du système nerveux central (Liauw et al, 2008). Pour certains, ces résultats pourraient expliquer la néoformation fréquente de synapses aberrantes qu'on peut mettre en évidence au contact des cicatrices gliales. Cela pourrait également expliquer pourquoi les axones en croissance forment de nouvelles synapses et stoppent leur croissance quand ils arrivent au contact d'astrocytes activés (Liuzzi et al, 1987).

Le mécanisme d'action des TSP dans la synaptogenèse reste partiellement élucidé mais pourrait faire intervenir deux voies de signalisation. D'une part, la TSP-1 active le TGF- $\beta 1$

(Shultz-Cherry et al, 1993), facteur de croissance dont on constate la surexpression après lésion cérébrale (Makwana et al, 2007). En outre, l'implication du TGF- β 1 dans la synaptogenèse centrale est fortement suggérée par son action dans le système nerveux périphérique où sa sécrétion par les cellules de Schwann, stimule la synaptogenèse (Packard et al, 2003). D'autre part, le récepteur α 2 δ 1 à la gabapentine a été identifié comme un des récepteurs des TSP impliqués dans la formation de synapses excitatrices du système nerveux central. Au cours de ce processus, le domaine WWF-A de l' α 2 δ 1 interagit avec les séquences EGF like Repeats communes à toutes les TSP (Eroglu et al, 2009), séquences également identifiées dans la structure moléculaire des intégrines (Wilkins et al, 1996). Le récepteur α 2 δ 1 serait impliquée dans la synaptogenèse au cours du développement et dans la réparation des lésions du système nerveux central.

4) La myélinisation

4.1 Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes proviennent des cellules progénitrices des oligodendrocytes (OPC), une population cellulaire hétérogène dont le point commun est d'exprimer un protéoglycane transmembranaire, le NG2. Ces cellules NG2, expriment également des récepteurs au glutamate et établissent de manière transitoire des connexions synaptiques avec des axones non myélinisés situés dans leur voisinage (Bergles et al, 2010). Par ailleurs, certaines populations de cellules NG2 génèrent des potentiels d'action (Karadottir et al, 2008). Cela confirme l'idée selon laquelle la myélinisation peut être modulée par l'activité neuronale.

L'oligodendrocyte enveloppe l'axone d'une gaine de myéline compacte résultant de l'enroulement d'une extension de sa propre membrane plasmique autour de l'axe axonal. Les modifications morphologiques de l'oligodendrocyte au cours de cet enroulement font appel à des voies de signalisation indépendantes de celles impliquées dans la maturation du progéniteur oligodendrocytaire (Buttery et al, 1999). Le mécanisme cellulaire de l'expansion cytoplasmique semble activé par le FGF-2 et la protéine kinase C (Yong et al, 1994) dont le substrat pourrait être la cadhérine-N (Paynes et al, 1993). La laminine- α 2 intervient également à ce niveau en interagissant avec la α 6 β 1 intégrine exprimée par l'oligodendrocyte (Buttery et al, 1999).

Des protéines structurales comme la proteolipid protein (PLP) et la myelin basic protein (MBP) contribuent à la compaction de la gaine de myéline du système nerveux central. La gaine de myéline présente des interruptions disposées régulièrement le long de l'axone appelées nœuds de Ranvier où sont générés les potentiels d'actions. Ces nœuds de Ranvier sont des sites fonctionnellement spécialisés où l'axone s'interface avec les cellules gliales par des protéines d'adhésion cellulaire.

Il existe une interaction fonctionnelle entre l'axone et l'oligodendrocyte. Des souris mutantes n'exprimant pas la MBP présentent des axones plus fins que le type sauvage avec des anomalies portant sur la phosphorylation des neurofilaments constituant le cytosquelette axonal. (Brady et al, 1999). La myelin associated glycoprotein (MAG) serait un des signaux de cette interaction glio-axonale. Ainsi, des souris mutantes pour le MAG ont des axones correctement myélinisés mais dont le calibre est anormalement petit et dont les neurofilaments sont anormalement espacés les uns des autres (Yin et al, 1998). Dans le système nerveux périphérique, l'axone contrôle la myélinisation par la sécrétion de plusieurs facteurs de croissance. Ainsi, la neuréguline-1 (NRG1) sécrétée par l'axone régule la différenciation des cellules de Schwann (Nave et al, 2006) et l'épaisseur de la gaine de myéline (Michailov et al, 2004) en se fixant sur le récepteur à l'EGF (ErbB). Dans le système nerveux central, l'axone ne serait pas indispensable à la différenciation des oligodendrocytes et à la constitution de la gaine de myéline. La myélinisation ne requiert pas l'interaction NRG1/ErbB, même si la surexpression de NRG1 par l'axone conduit à des phénomènes d'hyper-myélinisation (Brinkmann et al, 2008). Les facteurs de croissance comme l'IGF-1 qui stimulent la myélinogenèse, ne sont pas sécrétés par l'axone (Carson et al, 1993). De plus, les oligodendrocytes en culture peuvent myéliniser des axones fixés chimiquement (Rosenberg et al, 2008).

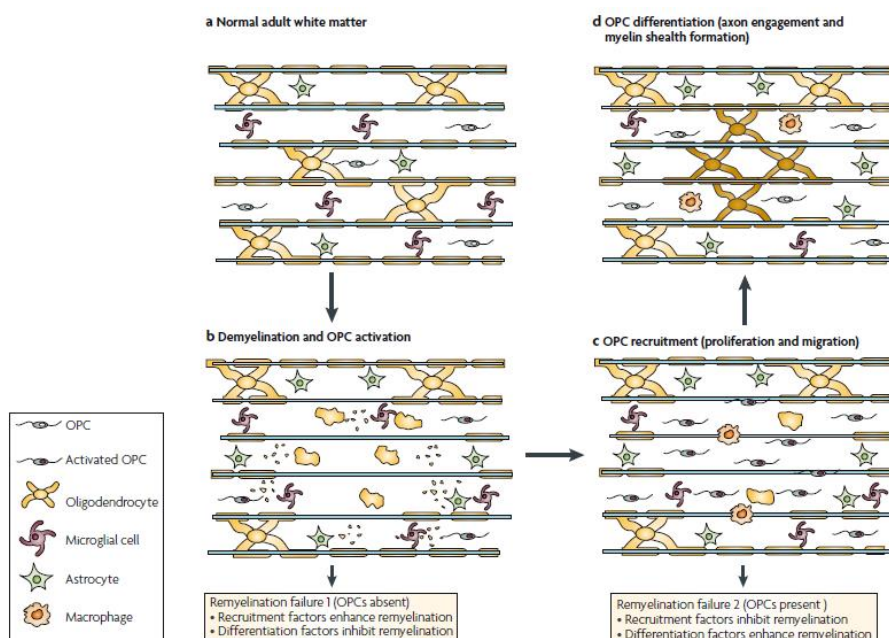


Figure 23. Les phases de la remyélinisation.

Au cours de la démyélinisation, il s'associe la destruction de la gaine de myéline et la perte des oligodendrocytes. Les facteurs mitogènes et pro-inflammatoires sécrétés par la microglie et les astrocytes stimulent la prolifération et la migration des OPC sur le site lésionnel. Parallèlement les macrophages assurent la déterction des débris de myéline. Par la suite, les OPC se différencient en oligodendrocytes selon un mécanisme impliquant l'axone. L'échec de la remyélinisation peut résulter d'un échec dans le recrutement ou la différenciation des OPC. Dans le premier cas, le traitement doit apporter un facteur de recrutement cellulaire, dans le second, il doit apporter un facteur de différenciation. Les deux modalités thérapeutiques sont antagonistes (Franklin et al, 2008).

4.2 Les intégrines

Les intégrines constituent une famille de récepteurs membranaires hétérodimériques résultant de l'assemblage de deux sous-unités α et β , impliquées dans les mécanismes d'adhésion intercellulaire ou avec la matrice extracellulaire. Certaines sont impliquées dans la myélinisation. *In vivo*, des souris mutantes pour les $\beta 1$ intégrines montrent une réduction de la myélinisation des axones dans la moelle spinale et le nerf optique sans qu'il soit observé de troubles de la lignée oligodendrocytaire. *In vitro*, les $\beta 1$ -intégrines sont exprimées par les oligodendrocytes et sont indispensables à la formation de la gaine de myéline. Cette action emprunte la voie de signalisation AKT, protéine kinase B dont on a déjà vu l'activité anti-apoptotique (Barros et al, 2009). Un des ligands des $\beta 1$ -intégrines impliqués dans la myélinisation pourrait être la laminine- $\alpha 2$ dont la déficience chez l'homme est à l'origine de troubles de la myélinisation (Vainzof et al, 1995). Ces effets sont indépendants de la survie ou de la prolifération des oligodendrocytes. Des

études montrent que des intégrines bien distinctes, comme l' $\alpha 6 \beta 1$ -intégrine, stimulent la survie des oligodendrocytes *in vitro* (Benninger et al, 2006).

4.3 La ténascine-R

Dans le système nerveux central, les oligodendrocytes dérivent de cellules progénitrices (OPC) qui résident essentiellement dans la zone ventriculaire ventrale et l'éminence ganglionnaire. Leur maturation est précédée d'une phase de prolifération et puis de migration régulées par les ténascines (TN). Il en existe plusieurs isoformes dotées de fonctions différentes.

Ainsi, la TN-R, naturellement exprimée par les oligodendrocytes et leurs précurseurs, est sécrétée dans la matrice extracellulaire. Elle est surexprimée par le système nerveux central dans le foyer lésionnel (Fuss et al, 1993). Elle active la différenciation des OPC en oligodendrocytes matures. La TN-C, exprimée par les OPC inhibe cette différenciation (Fuss et al, 1993, Czopka et al, 2009). *In vitro*, TN-C et TN-R inhibent la myélinisation (Garcion et al, 2004). *In vivo*, la surexpression de la TN-R dans des lésions du système nerveux central impacterait moins sur la myélinisation que sur la synaptogenèse. Sa surexpression par les filets périneuronaux constituerait une barrière limitant la croissance des neurones et le remodelage synaptique (Deckner et al, 2000 ; Apostolova et al, 2006).

C) La plasticité de la substance blanche ou plasticité myélinique

La plus part des oligodendrocytes sont acquis au cours de la période post-natale précoce. Chez l'adulte, les OPC continuent néanmoins de générer tout au long de l'existence, de nouveaux oligodendrocytes. En enveloppant les axones amyéliniques d'une gaine de myéline, ces nouveaux oligodendrocytes modifient les capacités fonctionnelles des fibres. Ils participent au renouvellement des oligodendrocytes morts et aux remaniements de la gaine myéline existante.

La capacité proliférative des OPC n'est pas uniforme dans le système nerveux central. Elle est significativement plus importante dans la substance blanche que dans la substance grise (Dimou et al, 2008). De plus ces capacités prolifératives diminuent avec l'âge (Young et al, 2013).

Le degré de myélinisation de la substance blanche varie selon la topographie. Ainsi certaines régions de substance blanche restent essentiellement constituées d'axones non

myélinisés chez l'adulte. Il s'agit notamment du corps calleux et plus généralement de faisceaux reliant les aires associatives (Sturrock et al, 1980). L'amélioration des performances cognitives supportées par ces régions pourraient être dues à la stimulation des processus de myélinisation par l'activité. La myéline ainsi formée au cours de l'âge adulte a des caractéristiques structurales différentes de la myéline synthétisée au cours du développement. Ainsi, on a pu démontrer que dans le nerf optique dont la majorité des axones est myélinisée au cours du développement, les nouveaux oligodendrocytes remanient la gaine de myéline en intercalant des segments à distance internodale plus courte au cours de la vie adulte. Nogo-A et le récepteur ErbB3 seraient impliqués ces modifications fonctionnelles de l'oligodendrocyte liée à l'âge (Chong et al, 2012, Makinodan et al, 2012). Une étude récente confirme l'idée que la remyélinisation est phénomène dynamique. Après lésion de la substance blanche médullaire chez la souris, la myéline d'abord mise en place est fine avec des distances internodales courtes comme au cours de la sénescence. Mais après environ 6 mois, la myéline produite par les oligodendrocytes recouvre des caractéristiques physiologiques avec une distance internodale normale (Powers et al, 2012).

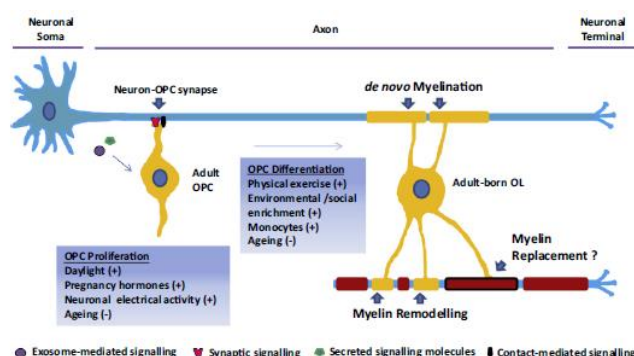


Figure 24. La plasticité de la substance blanche chez l'adulte.

La plasticité myélinique repose sur le renouvellement constant de la population oligodendrocytaire et des gaines de myéline. Cette myélinisation opérée par de nouveaux oligodendrocytes peut porter sur des axones jusqu'alors non myélinisés, s'intégrer à la réparation de gaines de myéline altérées ou au remodelage de gaines de myéline non lésées (Wang et al, 2014)

Les altérations cognitives liées à l'âge ont été corrélées à une dégénérescence de la substance blanche avec une diminution de la quantité de myéline touchant préférentiellement les fibres associatives plus que les fibres de projection, et particulièrement la partie antérieure du corps calleux. Cet appauvrissement en myéline résulte chez l'homme d'un déséquilibre entre la production et la perte des oligodendrocytes au cours de la sénescence. Il est intéressant de

constater que chez les rongeurs, ce phénomène de pertes de myéline n'existe pas et que la proportion d'axones myélinisés dans le corps calleux augmente tout au cours de la vie (Nunez et al, 2000). Chez le singe Rhésus, la substance blanche du cerveau antérieur diminue de 12% au cours de la sénescence (Wisco et al, 2008) avec paradoxalement une augmentation du nombre d'oligodendrocytes de 20 à 50 % dans le cortex préfrontal. Par contre, les gaines de myéline produites sont plus fines, les distances internodales plus courtes avec une myéline structurellement altérée (Peters et al, 2004). Ces troubles fonctionnels des oligodendrocytes au cours de la sénescence pourraient également expliquer les pertes axonales avec l'âge, l'oligodendrocyte étant indispensable à la survie de l'axone (Kassmann et al, 2007). Des expériences de transplantation cellulaire entre animaux d'âges différents montrent que ces altérations fonctionnelles des oligodendrocytes sont intrinsèques à la cellule et ne dépendent pas de l'environnement cellulaire (Chari et al, 2003).

Certains facteurs environnementaux à l'origine de la plasticité myélinique ont été identifiés (figure 24). L'intervention du rythme circadien a été suggérée par la forte expression du gène Cyclin D1 par les OPC. Il existe des différences liées au sexe. La densité d'oligodendrocytes dans le corps calleux, le fornix et la moelle est de 20 à 40% plus faible chez la femelle dans l'ensemble des espèces de rongeurs étudiées. Cette différence persiste toute la vie. Par contre, le renouvellement des oligodendrocytes et de la myéline est deux fois plus important chez la femelle, avec une plus grande activité proliférative et des mécanismes apoptotiques plus importants chez la femelle qui surexprime la μ -calpaïne. Ces phénomènes sont l'effet direct des stéroïdes hormonaux (Cerghet et al, 2006). Au cours de la gestation, la synthèse de Prolactine augmente l'activité proliférative des OPC et la synthèse de myéline (Cregg et al, 2007). Le rôle de l'activité motrice et cognitive semble fondamental. L'activité motrice volontaire augmente la prolifération des OPC et la production d'oligodendrocytes dans la moelle spinale de souris adultes (Krityakiarana et al, 2010), et stimule la différenciation des OPC en oligodendrocytes dans le cortex cérébral (Simon et al, 2011). Dans la période juvénile, les sollicitations de l'environnement stimulent la production d'oligodendrocytes et la myélinisation en activant le cortex (Sanchez et al, 1998, Juraska et al, 1988). La déprivation sociale au cours de la période critique étendue de P21 à P35 chez la souris entraîne une hypomyélinisation de la région préfrontale, des altérations morphologiques des oligodendrocytes et des anomalies de la

myéline avec notamment une gaine plus fine et des segments internodaux plus courts. Ces effets sont réversibles après réintégration sociale y compris chez l'adulte (Liu et al, 2012). Le récepteur ErbB3 serait impliqué dans l'influence du milieu environnemental sur le développement des oligodendrocytes et l'épaisseur de la gaine de myéline (Makinodan et al, 2012). Ces constatations se retrouvent également chez le jeune adulte mais d'une manière différente selon les régions cérébrales. Ainsi, la socialisation augmente la population oligodendrocytaire dans la substance noire mais semble sans effet sur le corps calleux chez la souris adulte (Liu et al, 2012). Le rôle de l'apprentissage et de l'entraînement moteurs a été étudié chez les musiciens professionnels. Le volume de la partie antérieure du corps calleux est significativement plus important dans cette population par rapport à des sujets témoins appariés à l'âge (Schlaug et al, 1995). Ces observations se retrouvent chez le sujet âgé (Boyke et al, 2008) mais pas chez la femme (Lee et al, 2003). L'effet de l'entraînement à des tâches cognitives et motrices comme la lecture sur la myélinisation de la capsule interne et du corps calleux chez l'enfant (Gebauer et al, 2012) et l'adulte (Pelphrey et al, 2003) a été démontré par des études par imagerie en tenseur de diffusion.

Le substratum anatomique de cette plasticité myélinique réside dans le couplage entre le neurone et l'oligodendrocyte. La prolifération des OPC, la production d'oligodendrocytes et la myélinisation de l'axone sont en effet modulées par l'activité neuronale (Barres et al, 1993, Demerens et al, 1996) grâce à l'existence de connexions synaptiques entre l'axone et l'oligodendrocyte (Bergles et al, 2000 ; Ziskin et al, 2007). Expérimentalement, la stimulation électrique du cortex moteur favorise la production d'OPC dans le faisceau corticospinal (Li 2010). Sur le plan biochimique, le glutamate libéré par le neurone glutamatergique dans la fente synaptique active les récepteurs AMPA/Kaïnate exprimés par l'OPC et entraîne l'entrée de Ca dans la cellule (Bergles et al, 2000). L'influx calcique dans les oligodendrocytes active la tyrosine kinase Fyn qui stimule la transcription de la MBP, un des principaux constituants de la gaine de myéline (Wake et al, 2011).

L'activité neuronale peut également stimuler la myélinisation par la sécrétion de facteurs de croissance comme le PDGF- α , le FGF-2, ou la neuréguline-1 (Mitew et al, 2013). Ainsi, la neuréguline-1 sécrétée par l'axone stimule la prolifération des OPC en se liant à son récepteur ErbB exprimée par l'OPC. En revanche, en présence de laminine-2a, le complexe neuréguline-1/ErbB stimule la différenciation en oligodendrocytes matures en se liant à l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$.

exprimée par l'OPC : la neuréguline-1 devient un signal de différenciation cellulaire (Colognato et al, 2002).

Ces couplages entre le neurone et l'oligodendrocyte permettent d'orienter la myélinisation selon l'activité des fibres nerveuses et la nature de l'environnement cellulaire.

III) Les approches thérapeutiques

Nous avons vu que la physiopathologie des lésions traumatiques de la substance blanche repose sur des mécanismes métaboliques et cellulaires complexes, interférents et évolutifs. Il en découle une extrême disparité des cibles thérapeutiques potentielles, chacune offrant une fenêtre d'action spécifique. Cela explique l'extrême disparité des axes de recherches visant à mettre au point un traitement pour protéger ou réparer la substance blanche (figures 25 et 26).

A) Les approches pharmacologiques ou moléculaires

Les approches pharmacologiques se distinguent selon leur cible d'action en traitements neuroprotecteurs et neurorégénérateurs. Les premiers visent à protéger les neurones et la myéline contre les lésions secondaires, les seconds visent à promouvoir la repousse axonale, la myélinisation et la synaptogenèse pour reconstituer de nouveaux circuits fonctionnels. Les différents traitements modulent la réaction inflammatoire, apportent des facteurs de croissance ou bloquent les inhibiteurs endogènes.

1) La neuroprotection

L'objectif des traitements neuroprotecteurs est de limiter les dommages cellulaires liés à la lésion secondaire. Nous citerons les principaux modes d'action.

1.1 Les agents anti-apoptotiques

L'intérêt de la **minocycline** dans la neuroprotection a été démontré chez les rongeurs dans l'ischémie cérébrale focale, l'hypoxie néonatale, et les lésions traumatiques de la moelle et du cerveau (Yong et al, 2004). Elle neutralise l'action des ROS, diminue la synthèse de NO et inhibe la synthèse et l'action des métalloprotéases (Ryan et al, 2001 ; Brundula et al, 2002). Dans des modèles d'hémorragie intracérébrale et de lésion médullaire, la minocycline diminue la réaction

inflammatoire en limitant l'activation des cellules microgliales (Wells et al, 2003) et réduit les pertes neuronales et oligodendrocytaires par nécrose et apoptose (Arvin et al, 2002). Le mécanisme d'action anti-apoptotique passe par une stabilisation de la membrane mitochondriale. Une étude de phase II n'a montré aucune efficacité à la phase aiguë du traumatisme médullaire (Casha et al, 2012). Par contre, une réduction des lésions de la substance blanche cérébrale a été rapportée par une étude clinique portant sur la sclérose en plaques (Metz et al, 2004).

1.2 Les inhibiteurs de l'excitotoxicité et de l'inflammation

L'objectif des neuroprotecteurs est ici de bloquer les cascades métaboliques initiées par l'influx calcique et la libération de glutamate. Les inhibiteurs des canaux calciques comme la **nimodipine** améliorent la perfusion tissulaire après lésion médullaire chez le rat mais n'ont apporté aucun bénéfice chez l'homme (Pointillart et al, 2000). La **gacyclidine**, un antagoniste du récepteur NMDA au glutamate, a permis de diminuer l'extension de la lésion secondaire chez le rat en réduisant l'influx calcique, mais son administration à la phase aiguë du traumatisme médullaire chez l'homme n'a montré aucune efficacité avec un recul d'un an (Lepeintre et al, 2004 ; Fehlings et al, 2005).

L'utilisation de la **méthylprédnisolone** a été motivée par ses propriétés anti-inflammatoires et neuroprotectrices. Elle réduit la peroxydation des lipides induite par les radicaux libres, améliore l'excitabilité et la conductibilité des neurones sur des modèles de lésion médullaire. Quatre essais cliniques successifs, NASCIS I à IV, ont montré que les risques d'infection et de myopathies contrebalançaient une amélioration neurologique par ailleurs très discutée après lésion médullaire. L'administration d'anticorps dirigés contre les molécules d'adhésion cellulaire portées par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages activés a été également testée. On constate une amélioration de la récupération motrice, une réduction des troubles végétatifs et des douleurs allodyniques dans un modèle de lésion médullaire chez le rat (Gris et al, 2004).

L'effet antioxydant et stabilisateur de membrane du **thyrotropin releasing hormone** (TRH) a conduit à en tester les propriétés dans la lésion médullaire. Le TRH améliore la perfusion tissulaire sur des modèles expérimentaux de lésion médullaire. A la phase aiguë du traumatisme médullaire chez l'homme, son bénéfice serait significatif lors de lésion incomplète.

La **citicoline** est une substance proactive qui libère la cytidine et la choline. Ces deux molécules traversent la barrière hémato-encéphalique et s'incorporent aux phospholipides de la membrane plasmique. Sur des modèles de traumatisme cérébral chez le rat, elle limite les pertes neuronales, diminue le volume de la contusion et améliore la récupération neurologique (Demsey et al, 2003).

2) La neurorégénération : axonogenèse et synaptogenèse

2.1 Le blocage des inhibiteurs associés à la myéline

Les inhibiteurs associés à la myéline constituent les premiers inhibiteurs biologiques de la repousse axonale à avoir été identifiés. Ils ont donc logiquement constitué la cible privilégiée des traitements neurorégénérateurs.

Des **anticorps IN-1** dirigés contre Nogo-A stimulent l'axonogenèse et la formation de pousses collatérales sur des essais animaux. Son administration intrathécale chez le rat, stimule la repousse de fibres corticospinales et améliore significativement les performances motrices par rapport aux placebo (Bregman et al, 1995). Des études en IRM fonctionnelle montrent également la repousse d'afférences extéroceptives avec des reconnections appropriées (Liedscher et al, 2005). Leur administration après lésion médullaire cervicale sur des primates améliore la récupération motrice et en particulier la dextérité manuelle (Freund et al, 2006). Des études de cinétique chez le rat ont montré que la fenêtre d'administration est limitée aux deux premières semaines suivant le traumatisme (Gonzenbach et al, 2012). Une étude de phase I réalisée sur 52 patients atteints de lésion médullaire cervicale ou thoracique à la phase aiguë ne montre pas d'effet secondaire (Zorner et al, 2010). Une étude de phase III lancée en 2006 par l'entreprise Novartis devrait s'achever cette année. Les résultats portant sur l'efficacité de cette thérapie ne sont donc pas encore publiés.

Les inhibiteurs de la repousse axonale associés à la myéline, Nogo, MAG et OMgp, empruntent tous la même voie de signalisation Rho-ROCK. Rho représente donc une autre cible thérapeutique logique et intéressante. Son inhibition par la **céthrine**, analogue de synthèse de la C3 transférase, stimule la repousse neuritique *in vitro* (Jalink et al, 1994). Chez le rat, la céthrine favorise la régénération du tractus corticospinal et améliore les fonctions locomotrices après lésion médullaire (Dergham et al, 2002). Son administration par application topique (épidurale) à

la phase aiguë d'une lésion médullaire cervicale ou thoracique complète (ASIA A) a été testée en essai de phase I/IIa sur 48 patients. Une amélioration significative a été constatée chez 66% des patients atteints de lésion cervicale dont le score ASIA était de C ou D à 1 an (Felhings et al, 2011). Un essai de phase III est envisagé.

Les gangliosides sont des glycolipides membranaires retrouvés en grande quantité dans le système nerveux central. *In vitro*, ils stimulent la neuritogenèse (Ferrari et al, 1983). *In vivo*, ils limitent le processus de dégénérescence axonale antérograde et améliorent les performances comportementales des animaux après lésion cérébrale (Gorio et al, 1984). Un ganglioside, le **GM-1**, a été testé chez 34 patients lésés médullaires à la phase aiguë, associé ou non à la méthylprédnisolone. Une étude multicentrique portant sur 797 patients (Sygen GM-1 study) n'a montré aucune amélioration significative (Chinnock et al, 2005).

2.2 Le blocage des inhibiteurs associés à la cicatrice gliale

Nous avons vu que les CSPG de la cicatrice gliale constituent autour du site lésionnel, une barrière mécanique et métabolique à la repousse axonale. L'obstacle métabolique est essentiellement supporté par les chaînes de glycosaminoglycanes (GAG). La matrice protéique intervient probablement par ses liaisons fortes avec les molécules de la matrice extracellulaire comme la laminine et la fibronectine et avec les molécules d'adhésion cellulaires exprimées par les cellules neurales (Yiu et al, 2006).

Des enzymes clivant les GAG de la matrice protéique ont été testées pour leur double action mécanique et métabolique. La **chondroïtinase ABC** est une enzyme bactérienne qui détache les GAG du cœur protéique de la CSPG. Elle a été testée sur des modèles de lésion médullaire chez le rat dans l'hypothèse que la destruction des CSPG rendrait l'environnement cellulaire plus permissif à la croissance axonale. Chez le rat, la chondroïtinase ABC stimule la croissance axonale, la formation de repousse collatérales et la récupération motrice sur des modèles de contusions médullaires thoraciques (Bradbury et al, 2002 ; Barritt et al, 2006). Des résultats prometteurs ont été obtenus sur des modèles animaux en combinant la Chondroïtinase ABC et la neurotrophine NT-3, facteur de croissance appartenant à la famille du NGF, qui stimule la croissance axonale et la synaptogenèse (García-Alías et al, 2011). Aucun essai n'a encore été mené chez l'homme.

2.3 Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance régulent la survie des neurones et des oligodendrocytes, la croissance neuritique, la synaptogenèse et le fonctionnement synaptique au cours du développement. Ils persistent chez l'adulte dans certaines régions du cerveau comme l'hippocampe et le bulbe olfactif où la plasticité neuronale reste importante (Maisonpierre et al, 1990). Leur administration intrathécale ou intravasculaire soulève le problème de l'imperméabilité de la barrière hémato-encéphalique ou hémato-médullaire. A ce titre, les thérapies géniques et cellulaires semblent mieux adaptées pour délivrer dans le tissu cible la molécule thérapeutique (Jain et al, 2008).

Le BDNF, les FGF, le GDNF le NGF et le NT-3 ont été testés sur des lésions médullaires et cérébrales expérimentales. Après lésion médullaire chez le rat, la repousse axonale porte sur des faisceaux différents selon la molécule utilisée. Ainsi le NGF stimule la croissance des fibres coeruleospinales (Tuszinski et al, 1996), le NT-3 celle des fibres corticospinales (Grill et al, 1997) le BDNF celles des fibres rubrospinales, réticulospinales et proprioceptives (Bregman et al, 1997 ; Kwon et al, 2002). Le **FGF** est un facteur de croissance stimulant la synaptogenèse et l'axonogenèse (Mason et al, 2007). Il a été testé sur une série prospective de 49 patients lésés médullaires. Son administration *in situ* à 10 semaines puis par voie intrathécale à 6 mois améliore à 24 mois les scores ASIA moteur et sensitif (Wu et al, 2011).

B) Les approches cellulaires

Les thérapies cellulaires visent à restituer les neurones et les oligodendrocytes détruits, selon deux modalités parfois combinées : (1) remplacer directement les cellules perdues ; (2) rendre permissif le milieu cellulaire pour favoriser la reconstitution des réseaux neuronaux. Les deux approches de la thérapie cellulaire comprennent la transplantation cellulaire (thérapie exogène) et l'activation des cellules résidentes (thérapie endogène). A noter que ces deux approches sont convergentes puisque les cellules transplantées produisent localement des facteurs de croissance qui stimulent les cellules résidentes.

La remyélinisation représente l'objectif crucial des thérapies cellulaires. Chaque phase de la remyélinisation constitue une cible thérapeutique : (1) la prolifération des OPC activée par des

facteurs de croissance comme le PDGF (Woodruff et al, 2004) ou le FGF-2 (Zhou et al, 2006) sécrétés par les cellules astrogliales activées ; (2) le recrutement des OPC dans le site lésionnel stimulé par les facteurs chémo-attractifs sécrétés par les cellules astrogliales activées ; (3) la différenciation des OPC en oligodendrocyte déclenchée par le contact avec l'axone démyélinisé. Le FGF-2 inhibe cette phase de différenciation (Zhou et al, 2006).

Les techniques de transplantations cellulaires restituent les oligodendrocytes perdus en apportant des OPC (Groves et al, 1993), des cellules de Schwann (Blakemore et al, 1985), des cellules olfactives engainantes (Franklin et al, 1993), ou des cellules souches neurales (Hammang et al, 1997). Ces traitements sont fondés sur l'hypothèse que le défaut de myélinisation résulterait d'un trouble du recrutement ou de la différenciation des OPC.

Le bien-fondé de ces thérapies cellulaires a été critiqué par certains auteurs, pour lesquels le défaut de myélinisation ne serait pas lié à une raréfaction des oligodendrocytes dont le nombre serait suffisant pour assurer la remyélinisation. L'environnement cellulaire non permissif expliquerait l'échec de ces thérapies, les cellules transplantées y étant exposées de la même manière que les oligodendrocytes endogènes (Franklin et al, 2008).

Nous avons vu que la réaction immune est délétère dans les lésions traumatiques du SNC. Aussi, la déplétion macrophagique limite-t-elle l'extension des lésions de la substance blanche dans certains modèles animaux (Popovitch et al, 1999). D'autres expérimentations ont pourtant montré qu'on pouvait orienter l'activation des macrophages vers des phénotypes favorables à la réparation du SNC. Ainsi, des **macrophages activés** d'une manière contrôlée dans le tissu cutané ou le système nerveux périphérique, produisent des facteurs de croissance comme le BDNF, réduisent la sécrétion de TNF- α et neutralisent le glutamate après transplantation dans une lésion du système nerveux central (Bomstein et al, 2003). Des résultats favorables obtenus sur des lésions médullaires chez le rat ont conduit au lancement d'un essai de phase I incluant 8 patients en 2000. Un essai de phase II organisé par la suite a été interrompu pour des problèmes de financement.

Des essais de thérapie cellulaire, actuellement lancées chez l'homme par des firmes nord-américaines, utilisent des **cellules souches**. Le matériel utilisé comprend des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse autologues (DaVinci Biosciences, Costa Mesa, CA et

TCA Cellular Therapy, Covington, LA), et des cellules souches neurales adultes hétérologues d'origine cérébrale (StemCells, Newark, CA). Ces études sont fondées sur des résultats intéressants obtenus sur des modèles animaux de lésions cérébrales et médullaires, ischémiques et traumatiques. Le mécanisme d'action reste difficile à comprendre. Il est improbable que des cellules souches mésenchymateuses se différencient dans la substance blanche vers un phénotype neural. Leur destin apparaît en fait très tributaire de l'environnement cellulaire où elles sont implantées. Des expérimentations chez le rat montrent ainsi que des cellules souches neurales transplantées dans une moelle saine ou lésée se différencient en cellules gliales ou restent indifférenciées, tandis que celles transplantées dans des régions électives de l'encéphale comme l'hippocampe, se différencient principalement en neurones (Cao et al, 2001 ; Shihabuddin et al, 2000). Notre incapacité à maîtriser chez l'hôte le destin des cellules souches transplantées et la prédominance de leur différenciation gliale constituent les écueils des thérapies cellulaires. L'amélioration fonctionnelle après traumatisme cérébral ou médullaire expérimental n'est donc pas liée à la restitution des pertes cellulaires. Les cellules souches créent vraisemblablement un environnement cellulaire favorable à la régénération par la sécrétion de cytokines et de facteurs neurotrophes comme le NGF, le BDNF ou le GDNF (Lu et al, 2003 ; Parr et al, 2007).

Les thérapies endogènes utilisent des facteurs de croissance pour stimuler la production de myéline par les cellules résidentes. Les difficultés auxquelles se heurtent ces thérapies sont liées au fait que les facteurs de croissance utilisés agissent à différentes phases du processus de remyélinisation avec parfois des effets opposés. Ainsi le FGF-2 et le PDGF stimulent la prolifération et la migration des OPC mais inhibent les deux dernières étapes de leur différenciation en oligodendrocytes (Zhou et al, 2006 ; Wang et al, 2007).

Les facteurs neurotrophes exercent sur la croissance axonale des actions spécifiques, qui varient selon le type de population cellulaire et leur niveau d'activité (Miller et al, 2001). En pratique, deux facteurs neurotrophes ont été testés chez l'homme avec des résultats présentés comme significatifs : (1) le NGF dans la maladie d'Alzheimer, par transplantation intracérébrale de fibroblastes autologues modifiés génétiquement pour exprimer le NGF (Tuszinski et al, 2005) ; et (2) le FGF acide administré par voie topique après laminectomie puis intrathécale à 3 mois d'intervalle sur une série non contrôlée de 60 patients lésés médullaires à la phase chronique (Wu et al, 2008).

Strategy	General target	Potential agents	Expected outcome
Neuroprotection	Apoptotic regulators	Calpeptin, SNJ1945, Ca ²⁺ channel blockers, Bcl-2 activators, cytochrome c blockers, minocycline	Prevent secondary apoptotic induction
	Excitotoxic regulators	GluR inhibitors (Agmatine, MK801), GABA agonists (pregnenolone, glutamine synthetase, baclofen, benzodiazepines)	Increase synaptic activation threshold
	Trophic regulators	Adhesion modifiers, hormone therapy (ACTH, estrogen, testosterone, melanotropin, GH), monosialic ganglioside, growth factors (NGF, BDNF, NT-3, NT-4, FGF, GDNF)	Restore general homeostasis, neural growth stimulator, enhance pro-survival glial activation, promotes intracellular survival cascades
	Anti-inflammatories	COX-2 inhibitors, MP, selective lymphocyte/macrophage activation, reduces prostaglandin production	Reduce natural killer/macrophage related toxicity,
Axonal regeneration	Axonal trophism	Neurotransmitter treatment (Serotonin, clonidine, tizanidine, CPG stimulation, FES/FNS), protein kinase modulation, Chondroitinase, Nogo inhibitors, Nogo receptor blocker, soluble LINGO-1 (LINGO-1-Fc)	Promotes axonal extension and synaptic reconnection
	Glial trophism	FGF, GDNF, VEGF, estrogen, GH	Promotes glial survival/proliferation and thus neuronal/neurite survival
	Glial inhibitors	Nogo inhibitors, Nogo receptor antagonists, anti-inflammatory med's (for microglia)	Prevents inhibitory scar formation, allows axonal regrowth through injury area
	Forced-use training	Constraint-induce therapy, Forced-use training	Potentiates axonal activation by mechanically reducing activation threshold of synapses
Stem cell therapy	Adult	BMSCs, fat cells, dermal cells, olfactory ensheathing cells	Potentiates remyelination of axons, glial repopulation, growth factor production
	Embryonic	Human (from in vitro fertilization), cloned	Glial and neuronal repopulation possible (with directed growth factor administration prior to/ immediately following transplantation)
Other	Allografts	Schwann cell autografts, allografts	Axonal recapitulation; glial cell repopulation
	Tetracycline	Unclear	Possible anti-inflammatory activities

Figure 25 : Axes de recherche dans le traitement des lésions médullaires traumatiques : cibles et mécanismes d'action (Varma et al, 2013)

Agent/sponsor	Mechanism of action
AL-208/Allon therapeutics	Activity-dependent neurotrophic factor
Anatibant (XY2405)/Xytis	Bradykinin B ₂ receptor antagonist
Citicoline/National Institute of Child Health and Human Development, USA	An endogenous compound, which is used orally or parenterally for getting more choline into the brain when the requirements are high
Darbepoetin alfa (Amgen's Aranesp®)/University of Alberta	Effect is mediated through the activation of epoetin receptors whose activation prevents the exocytosis of glutamate, a known neurocytotoxin, into CSF
Recombinant human erythropoietin/Medical College of Wisconsin	Multiple mechanisms of neuroprotective effect: antiapoptotic and reduction of cerebral edema
Ketamine/University of Arkansas	Ketamine, an intravenous anesthetic, has possible neuroprotective effect
KN 38-7271/KeyNeurotek AG	A cannabinoid receptor agonist
NNZ-2566/ Neuren Pharmaceuticals	This is a small molecule analog of Glypromate® (Glycine-Proline-Glutamate, derived from IGF-1)
Oxycyte/Synthetic Blood International Inc.	A second-generation PFC that increases oxygen levels in damaged brain
Progesterone intravenous/NIND	Reduction of brain swelling and damage after blunt TBI
Rivastigmine/Novartis	ChE inhibitor approved for the treatment of Alzheimer's disease, now tested for the treatment of cognitive deficits resulting from TBI
Stem cell transplantation/University of Texas	Autologous bone marrow derived stem cells for TBI in children

NIND, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, USA.

Figure 26 : Axes de recherche dans le traitement des lésions cérébrales traumatiques : cibles et mécanismes d'action (d'après Jain et al, 2008).

C) Le NX210

Le NX210 est un peptide de 12 acides aminés dont la séquence dérive de la SCO-spondine, protéine TSR impliquée dans l'ontogenèse cérébrale et médullaire. Notre travail expérimental avait pour objectif d'évaluer les propriétés neuroréparatrices et neurorégénératrices de cette molécule.

1) La SCO-Spondine

1.1 La Sécrétion

La SCO-spondine est sécrétée par l'organe subcommissural, différenciation de l'épendyme située sous la glande pinéale, à la jonction entre le diencéphale et le mésencéphale. Au cours de l'ontogenèse cérébrale, l'ensemble de l'épendyme sécrète de nombreux morphogènes impliqués dans la croissance et le guidage de l'axone (Sarnat et al, 1992 ; Wagner et al, 1990). Au cours de la période néonatale chez l'homme, cette fonction sécrétoire se restreint considérablement, et ne persiste qu'à la partie rostrale de la face dorsale de l'aqueduc du mésencéphale pour constituer l'organe subcommissural. L'utilisation d'anticorps dirigés contre la fibre de Reissner a permis de marquer l'OSC chez tous les vertébrés explorés sauf les singes anthropoïdes adultes (Rodriguez et al, 1984) et l'homme y compris le fœtus (Rodriguez et al, 1990).

Sur le plan histologique, l'OSC est constitué d'une couche de cellules épendymaires dont le pôle apical est au contact avec le liquide cérébrospinal (LCS) et dont le pôle basal entretient des rapports étroits avec les capillaires sanguins sous-jacents ou vaisseaux hypendymaires. A la différence des autres organes circumventriculaires du cerveau dont il fait partie, l'organe subcommissural est le seul doté d'une barrière hémato-encéphalique (Leonhardt et al, 1980 ; Meiniel et al, 1996). Les cellules épendymaires sont par endroits séparées des vaisseaux sanguins par une couche de cellules hypendymaires d'importance variable selon les espèces, ayant les mêmes caractères sécrétoires (Krabbe 1925, 1933). Entremêlées de cellules gliales et de vaisseaux sanguins, les cellules hypendymaires sont retrouvées jusque dans la commissure épithalamique (Meiniel et al, 1996). Les cellules épendymaires et hypendymaires ont une même origine gliale mais n'expriment ni la GFAP ni la protéine S100. Ce phénotype les apparente à des

épendymocytes particuliers de la face ventrale du tube neural qui constituent la plaque ventrale ou floor plate (Sarnat et al, 1992), et interviennent dans la régionalisation ventrale du SNC. Ils guident la migration et la différenciation des neurones selon le plan ventrodorsal.

L'activité de synthèse de l'OSC est précoce au cours de l'ontogenèse cérébrale. Elle débute vers 2,5 jours chez le poulet et la plupart des espèces de vertébrés étudiées (Didier et al, 1992, Naumann et al, 1987). L'activité sécrétoire des épendymocytes et des hypendymocytes s'effectue par leur pôle basal qui est au contact des capillaires sanguins. Elle s'effectue également par le pôle apical des cellules épendymaires vers la cavité ventriculaire où le produit de sécrétion forme au contact du LCS, des agrégats fibrillaires appelés fibres de Reissner. L'utilisation d'anticorps polyclonaux (Karoumi et al, 1990) puis monoclonaux (Meiniel et al, 1988b, Duchier-Liris et al, 1991) dirigés contre les protéines de l'OSC et la fibre de Reissner a permis de caractériser cette sécrétion et montrer qu'elle est identique aux pôles apical et basal des cellules.

1.2 La structure moléculaire

La SCO-spondine est une glycoprotéine d'origine cérébrale de 5 146 acides aminés initialement isolée chez les bovins (Gobron et al, 1996). Son nom fait référence à sa sécrétion par l'organe subcommissural (SCO) et à son appartenance à la superfamille des Thrombospondines qui regroupe des protéines exprimées dans le système nerveux des Vertébrés.

Son gène, localisé sur le chromosome 4, est exclusivement exprimé par l'OSC (Meiniel 1995). Des expériences de Northern-blot ont montré qu'il faisait l'objet d'une régulation complexe débouchant sur l'existence de transcrits de tailles différentes (Creveaux et al, 1997). Il en résulte que la SCO-spondine existe sous plusieurs isoformes expliquant la variabilité structurelle et fonctionnelle de la molécule (Meiniel et al, 2001). La principale isoforme de la SCO-spondine partage des domaines communs avec des protéines de la matrice extracellulaire impliquées dans des voies de signalisation cellulaire. Ainsi, la SCO-spondine compte 26 domaines "thrombospondine type 1 repeats" (TSR), 9 domaines low density lipoprotein receptor LDLr type A repeats (LDLRA), 2 domaines epidermal growth factor like (EGF-like), 2 répétitions de type D du facteur Von Willebrand (vWFD) en NH2 terminal et un motif riche en cystéines (CTCK) en COOH terminal.

Les domaines TSR contenus dans la molécule apparaissent particulièrement abondants, comparativement aux autres molécules de la famille des thrombospondines. Ils contribueraient pour une très large part à expliquer les fonctions biologiques de la molécule. De fortes homologies ont été constatées avec les domaines TSR des TSP-1 et TSP-2, impliquées dans les interactions protéiques et les mécanismes adhésion cellulaires, dans la migration des cellules des crêtes neurales (Sage et al, 2001) et la croissance neuritique (Neugebauer et al, 1991). Ces TSR sont également retrouvés dans les F-Spondine-1 et 2 et les mindine-1 et 2 sécrétées précocement par les cellules du floor plate (Klar et al, 1992 ; Higashijima et al, 1997) et dans les sémaphorines-5a et 5b (Adams et al, 1996). Toutes ces molécules sont impliquées dans le guidage de l'axone en croissance. Par ailleurs, les motifs TSR de la SCO-spondine constituent des sites de liaison avec les glycosaminoglycanes et les facteurs de croissance, ce qui confirme la participation de cette molécule aux processus développementaux médiés par les protéoglycanes et les facteurs de croissance (Gobron et al, 1996 ; Meiniel et al, 2001).

Les motifs LDLRA de la SCO-spondine sont retrouvés dans les composants actifs de la matrice extracellulaire, comme les protéines C6-C9 du complément. Egalement exprimés par les neurones de l'hippocampe, ces récepteurs LDLRA sont impliqués dans la synaptogenèse et la plasticité synaptique (Mulder 2007). Transitoirement surexprimés par les oligodendrocytes au cours de la période de myélinogenèse qui suit la naissance, les LDLRA semblent indispensables à la formation de la gaine de myéline (Zhao, 2007).

Les domaines EGF-like, également retrouvés dans la TSP-1 et la TSP-2 (Meiniel 2001), sont présents dans la partie extracellulaire de protéines impliquées dans les mécanismes d'adhésion cellulaire comme les laminines (Mayer et al, 1993).

1.3 Propriétés biologiques de la SCO-Spondine et de ses peptides dérivés

Des expérimentations *in vitro* portant sur des cultures primaires de neurones corticaux et spinaux ont d'abord montré que la fibre de Reissner favorisait la survie et l'agrégation des neurones (Monnerie et al, 1995), stimulait la pousse neuritique et la fasciculation. L'obtention de ces résultats en l'absence de cellules gliales montre que le complexe moléculaire agit directement sur les neurones (Monnerie et al, 1997).

Par la suite, des peptides furent synthétisés et testés dans les mêmes conditions que la fibre de Reissner, sur des cultures primaires de neurones corticaux et spinaux. Chacun reprenait la séquence d'acides aminés des motifs TSR, LDLRA ou celle d'un site liant les glycosaminoglycanes. Seule la séquence TSR de la SCO-spondine a permis de reproduire les effets de la fibre de Reissner, à l'exception l'agrégation des neurones spinaux qu'elle inhibait (Monnerie et al, 1998).

Des lignées cellulaires neuronales ont ensuite été testées pour reproduire et analyser avec une meilleure reproductibilité les phénomènes de pousse neuritique et d'agrégation cellulaire observés sur les cultures primaires. La lignée B 104, issue du clonage d'un neuroblastome du système nerveux central de rat, permet de reproduire fidèlement les effets observés sur les cultures primaires : la stimulation de la survie cellulaire, la modification des contacts entre les neurones avec formation d'agrégats cellulaires, la stimulation de la croissance neuritique et la fasciculation (El Bitar et al, 1999, 2001).

2) Le NX210

2.1 Caractérisation chimique

Le NX210 est un duodécapeptide dont la séquence (WSGWSSCSRSCG) contient les acides aminés les mieux conservés du motif TSR de la SCO-spondine.

La séquence WSXWS est un site d'interactions protéiques retrouvé dans le motif Fibronectin Type III Repeat (FNIII) de plusieurs facteurs de croissance et de différenciation cellulaires (Patthy 1990). Ces domaines FNIII sont également inclus dans la séquence de nombreuses glycoprotéines de la matrice extracellulaire et des protéines membranaires notamment le récepteur à l'interleukine-2. Le rôle fonctionnel de ces domaines est fondamental. Une mutation de la séquence FNIII dans le récepteur à bloque la signalisation transmembranaire médiée par l'interleukine-2. Par ailleurs, certains mécanismes d'adhésion et de signalisation cellulaires résultent d'une interaction entre le FNIII et les β 1 intégrines (Chi-Rosso et al, 1997).

2.2 Propriétés biologiques

Agrégats cellulaires et neuritogenèse

Le NX210 a été testé *in vitro* sur des cultures primaires de neurones embryonnaires du cortex et de la moelle spinale de Poulet dans un milieu privé de sérum. Dans les cinq jours suivant l'ensemencement sur un substrat recouvert de NX210, on observe la formation d'agrégats cellulaires connectés par des processus neuritiques nombreux et regroupés en faisceaux. Par ailleurs, ces agrégats cellulaires adhèrent fortement au substrat. Par rapport aux cultures témoins, les agrégats sont 9 fois plus nombreux, et les prolongements neuritiques significativement plus longs et plus nombreux. Sur des cultures de neurones spinaux, le NX210 n'induit pas la formation d'agrégats cellulaires. Les cellules restent dispersées dans le milieu, connectées par un important réseau constitué par les processus neuritiques.

Des expérimentations reprenant les mêmes types cellulaires mais avec une faible densité de cellules permet de démontrer que la stimulation de la neuritogenèse n'était pas liée à la formation des agrégats cellulaires.

Pour s'assurer que ces effets ne résultaient pas simplement des propriétés chimiques des acides aminés présents dans la molécule, les expériences furent reproduites avec un «scramble peptide», molécule contenant les mêmes acides aminés mais disposés selon une séquence différente. L'absence d'adhésion cellulaire et de croissance neuritique permet de confirmer le caractère spécifique du mode d'action du peptide (Monnerie et al, 1998).

Synaptogenèse

Des études immunohistochimiques *in vitro* ont montré que le NX210 stimule la synaptogenèse sur des cultures de lignée B104. Le comarquage de l' α VAMP, une protéine associée aux vésicules présynaptiques (Archer et al, 1990) et de l' α CNR1, un récepteur post-synaptique (Kohmura et al, 1998) montre la formation de synapses exclusivement lorsque le milieu de culture contient du NX210. L'étude morphologique au microscope électronique montre les caractéristiques ultrastructurelles de synapses fonctionnelles sous la forme de vésicules synaptiques et de mitochondries dans des boutons présynaptiques et l'existence de matériel dense au niveau des membranes pré et post-synaptiques (résultats non publiés).

Sur le plan mécanistique, des expérimentations *in vitro* ont montré que les effets du NX210 sur la formation d'agrégats cellulaire et la neuritogenèse sont médiés par les β 1-intégrines (Bamdad et al, 2004).

Objectifs de l'étude

Notre revue de la littérature montre que la réparation structurelle et fonctionnelle de la substance blanche est inhibée par l'environnement cellulaire, par les produits de destruction tissulaire, par la cicatrice gliale et la cascade métabolique de la lésion secondaire.

Les molécules de signalisation de la matrice extracellulaire, les inhibiteurs dérivés de la myéline et les protéoglycanes de la cicatrice gliale bloquent la croissance axonale, la synaptogenèse et la myélinogenèse qui constituent les principales cibles de la neuroréparation. Les essais de thérapies neuroréparatrices visent à modifier l'environnement cellulaire en apportant des acteurs moléculaires ou cellulaires de la régénération (facteurs neurotrophiques, cellules souches...), ou en bloquant les facteurs inhibiteurs présents dans la myéline et la cicatrice gliale (anticorps anti-Nogo, Céthrine, chondroitinase...). Les résultats histologiques et fonctionnels restent cependant mitigés probablement parce qu'aucune de ces solutions thérapeutiques n'est en mesure de bloquer ou de contourner les multiples voies de signalisation qui rendent non permissif l'environnement neuronal. Les approches neuroprotectrices visant à limiter les conséquences de la lésion secondaire en apportant des molécules anti-apoptotiques, anti-oxydantes et anti-inflammatoires ont également conduit à des résultats décevants chez l'homme.

L'étude comparée des phénomènes de neuroréparation à travers la phyllogenèse et l'ontogenèse nous montre pourtant des exemples de réparation fonctionnelle dans certaines conditions. Ainsi, l'environnement cellulaire reste permissif chez les mammifères jusqu'à la fin de l'ontogenèse du système nerveux central, au moment où la myélinogenèse s'achève. Pour restituer un environnement neuronal permissif et permettre au tissu adulte de se régénérer comme chez l'embryon, nous nous sommes intéressés à la SCO-spondine, morphogène impliqué dans la mise en place de la substance blanche au cours du développement. Des tests *in vitro* ont d'abord confirmé l'intérêt potentiel que pouvait représenter son utilisation dans la neuroréparation. Par la suite, un peptide de 12 acides aminés, le NX210, dérivé d'un domaine actif de cette molécule a été caractérisé et synthétisé.

L'objectif de notre travail était de tester ce peptide sur les différentes cibles thérapeutiques de la neuroprotection et de la neuroréparation et d'en apprécier l'efficacité anatomique et clinique sur des modèles *in vivo*. Les propriétés neuroprotectrices ont été explorées par la mesure de la viabilité cellulaire et de l'activité apoptotique en conditions de stress oxydatif. Ces deux mécanismes, qui s'enclenchent au début et à la fin de la cascade métabolique de la lésion secondaire, ont été choisis car ils contribuent pour une très large part aux pertes en cellules neurales. Les propriétés neuroréparatrices ont été testées *in vivo* sur des modèles de section et de contusion médullaires chez le rat. Ils nous ont permis d'une part d'objectiver la repousse des fibres et leur organisation fasciculaire et d'autre part de montrer les conséquences fonctionnelles de cette restauration anatomique. Les mécanismes d'actions de la molécule sont probablement multiples. Celui suspecté sur le recrutement cellulaire a été approché sur un modèle de section du corps calleux en conditions stéréotaxiques au moyen de techniques immunohistochimiques et histologiques.

Partie Expérimentale

I) Matériel et méthode

1) Le composé pharmacologique

Le NX210 est obtenu par synthèse chimique (Polypeptides Laboratories, Strasbourg, France). Sa séquence, déjà détaillée plus haut, comprend douze acides aminés WSGWSSCSRSCG [15]. Avant chaque expérimentation, le NX210 est mis en suspension dans de l'eau distillée stérile à pH 6,10. Les doses utilisées dans les expérimentations *in vitro* sont de 100, 250, 500 µg/ml. La dose utilisée pour les expériences *in vivo* est de 100 µg/kg.

2) Effet neuroprotecteur du NX210 sur le stress oxydatif *in vitro*.

La lignée B104 est clonée à partir d'un neuroblastome chimio-induit chez le rat (Schubert 1974) (HPA Culture Collections Salisbury, UK). Pendant 24 heures, les cellules sont mises en culture à 37°C sous 5% de CO₂ dans le milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Lonza, Levallois, France) supplémenté avec de la glutamine 2 mM, de la pénicilline G à 100 U/ml, du sulfate de streptomycine à 100 µg/ml et 10% de sérum fœtal bovin (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Les cellules sontensemencées sur des plaques de 96 puits recouverts d'une matrice de poly-D-lysine pour obtenir une densité cellulaire finale de 20 000 cellules/puits. Cinq heures après l'ensemencement, le milieu de culture est remplacé par du milieu sans FBS à raison de 200 µl/puits.

Le NX210 a été testé en prétraitement et en cotraitement.

- En cotraitement. Après 24 heures de privation de sérum, les cellules sont traitées pendant 18 heures par du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 0.15mM (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) à raison de 100 µl/puits, en présence de NX210 (100, 250, 500 µg/ml) ou du véhicule.

microscope inverse Eclipse TS100 (Nikon, Japan) après numérisation des images (camera DS-Vi1, Nikon, Japan).

Par la suite, la viabilité cellulaire a été évaluée par un test colorimétrique au rouge neutre

Principe. Le rouge neutre est un colorant faiblement cationique qui pénètre dans les membranes cellulaires par diffusion passive non ionique et se concentre dans les lysosomes. Ce colorant est extrait des cellules vivantes en utilisant une solution d'éthanol acidifiée. L'absorbance du colorant ainsi solubilisé est quantifiée par spectrophotomètre à 540 nm.

En pratique, après 18 heures de traitement, les solutions de traitement sont remplacées par 100 µl / puits de rouge neutre à 40µg/ml (Sigma) et incubées pendant 2h30 à 37°C en présence de 5% de CO₂. Le même volume de solution de rouge neutre est ajouté dans des puits sans cellules représentant le bruit de fond de l'expérimentation. Les puits sont ensuite lavés avec 150 µl / puits de PBS et 150 µl / puits de solution d'éthanol acidifiée (50% EtOH / 49% H₂O / 1% acide acétique) sont ajoutés. L'absorbance du colorant ainsi extrait est mesurée à 540nm. L'absorbance du contrôle positif (cellules non traitées) est fixée à 100 % de viabilité ; les absorbances mesurées au niveau des cellules traitées sont normalisées par rapport au contrôle de cellules non traitées. Trois expériences indépendantes sont réalisées, chaque condition expérimentale étant effectuée en quadruplicats.

3) Effet protecteur du NX210 sur l'apoptose par mesure de l'activité des caspases 3/7

Principe. L'activité des caspases 3/7 est mesurée par le test fluorimétrique Apo-ONE Homogenous caspase-3/7 assay, Promega. Les cellules B 104 sont lysées par une solution tampon Apo-ONE Homogeneous caspase-3/7. Le substrat non fluorescent des caspases (Z-DEVD-R110) ajouté au milieu est clivé par les caspases 3/7 et donne la rhodamine 110 qui est fluorescente. La fluorescence générée est proportionnelle à l'activité des caspases 3/7 présentes dans l'échantillon.

En pratique, après 18 heures de traitement, 100µl de réactif Apo-ONE caspase 3/7 sont ajoutés par puits. La plaque 96 puits est laissée incuber pendant 2 heures à température ambiante. La fluorescence est mesurée au fluorimètre à une longueur d'onde d'excitation à 485 nm et une longueur d'onde d'émission à 538 nm. Elle est exprimée en unités de fluorescence relative.

4) Effet du NX210 dans le traumatisme médullaire chez le rat

4.1. Animaux

Les expérimentations sont réalisées sur des rates adultes Sprague-Dawley de 240-300 g. la procédure chirurgicale se fait sous anesthésie générale à la kétamine (75 mg/kg ip) après prémédication à la xylazine (5 mg/kg ip). Les animaux sont hébergés dans des cages individuelles standard à la température de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ sous éclairage contrôlé (12h/j), eau et alimentation *ad libitum*. Les animaux sont examinés deux fois par jour. Aucun traitement antalgique n'a dû être administré au cours de la période expérimentale.

4.2. Modèles animaux et procédure chirurgicale

4.2.1 Effets du NX210 sur la croissance neuritique *in vivo*

La croissance neuritique a été observée sur 10 animaux. Après laminectomie de T9 et T10, et l'ouverture de la dure-mère, on pratique l'aspiration douce des cordons postérieurs de la moelle spinale en prenant soin d'aspirer également les cornes postérieures de la substance grise. On réalise ainsi une cavité de 5 mm de longueur crâniocaudalement sur 1 mm de profondeur. On met en place dans la cavité un tube de collagène de type IV d'origine placentaire (Imedex, Saduc, France) rempli de 10 μl de soluté (control) ($n = 5$) ou de NX210 ($n = 5$). La dure-mère et la peau sont ensuite suturées.

Les animaux sont euthanasiés à J10 au pentobarbital sodique (80 mg/kg ip) avant de réaliser une perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde à 4%. Les segments médullaires sont ensuite prélevés et fixés 24 heures à 4°C dans du paraformaldéhyde à 4%, puis dans une solution de sucrose à 30% dans du PBS. Les pièces sont congelées à -50°C dans l'isopentane et inclus dans de l'OCT (Tissue-Tek, Elkhart, USA). Des cryosections sagittales de 16 μm d'épaisseur sont réalisées, fixes sur des lames de verre prétraitées à l'aminopropyltriéthoxysilane (Fluka, Buchs, Switzerland). Les sections sont incubées 24 heures à température ambiante en présence d'anticorps primaire d'origine souris anti neurofilament (NF) (Dako, Glostrup, Denmark) dilués à 1/200 et des anticorps primaires d'origine rat anti laminine (Abcam, Paris, France) dilués à 1/100 dans du PBS 0.01M contenant 1% de Triton X-100 et 10% de sérum (normal goat serum, NGS). Le jour suivant, les sections sont lavées et incubées 2 heures en présence d'anticorps anti-souris

conjugués au Cy-3 dilués à 1/400 et des anticorps anti-rat conjugués au FITC (Interchim, Montluçon, France) dilués à 1/200. Dans les deux cas, le milieu de dilution est du PBS 0.01 M contenant 1% de Triton X-100 et 10% de NGS. Pour détecter les liaisons non spécifiques, certaines sections sans anticorps primaires sont incubées dans les mêmes conditions. Les coupes sont numérisées à un grossissement de 72X, la mesure de la croissance neuritique est faite au moyen de logiciel ImageJ 1.43u (NIH, USA).

4.2.2 Effets du NX210 sur le recouvrement fonctionnel après lésion médullaire

L'étude clinique chez le rat a porté sur 16 animaux. Après laminectomie de T9 et de T10, la lésion médullaire est obtenue par la chute d'une masse de 10 g et de 2.5 mm de diamètre d'une hauteur de 12,5 mm sur la dure-mère au moyen du NYU/MASCIS Impactor. Cinq minutes après le traumatisme, le NX210 (n = 8) ou le véhicule (n = 8) est injecté dans les espaces subarachnoïdiens avec une seringue Hamilton de 10 µl et une aiguille de 30G dans le site lésionnel. Le volume de 3 µl est injecté pendant 1 minute. Après suture cutanée, les rats sont hébergés individuellement dans des cages standard. Une seconde injection est réalisée 2 jours plus tard.

Les tests comportementaux ont été réalisés à l'aide d'un open-field standard de forme carrée divisé en 16 cellules. Les animaux sont observés individuellement, en aveugle, pendant 10 minutes par deux opérateurs. Les critères retenus sont la longueur parcourue et le pourcentage de temps passé dans les cellules centrales. Les résultats de chaque animal sont exprimés en pourcentage par rapport aux performances réalisées avant lésion.

Les performances locomotrices sont étudiées, en aveugle, par deux opérateurs, au moyen de l'échelle de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) (figure 28) (Basso et al, 1996). Chaque animal est évalué avant le traumatisme puis une fois par semaine. La motilité est relevée pendant 10 minutes par un dispositif automatisé, le TrueScan Photo Beam Activity system (Coulbourn Instruments). Parallèlement, chaque animal est pesé avant le traumatisme puis une fois par semaine.

Les tests réflexes sont également réalisés à l'aveugle par deux opérateurs avant lésion médullaire puis une fois par semaine. Les réflexes explorés comprennent le réflexe d'extension des orteils et le réflexe de placement. Le réflexe d'extension des orteils est exploré en soulevant l'animal par la queue, les membres pelviens pendant librement. Le réflexe de placement est exploré en soulevant l'animal par le thorax, les membres pelviens pendant librement. On amène la face dorsale du pied au contact du bord de la table d'examen, et on étudie la rapidité et la précision du placement sur le plan de la table (Sedy et al, 2008). Les résultats sont rapportés à une échelle de 4 points, de 0 (pas de réflexe) à 3 (réflexe normal).

Les animaux sont euthanasiés au 30^{ème} jour par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (80 mg/kg ip) et perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde à 4%.

Basso, Beattie, and Bresnahan Locomotor Rating Scale	
0	No observable hindlimb (HL) movement
1	Slight movement of one or two joints, usually the hip and/or knee
2	Extensive movement of one joint or extensive movement of one joint <i>and</i> slight movement of one other joint
3	Extensive movement of two joints
4	Slight movement of all three joints of the HL
5	Slight movement of two joints <i>and</i> extensive movement of the third
6	Extensive movement of two joints <i>and</i> slight movement of the third
7	Extensive movement of all three joints of the HL
8	Sweeping with no weight support or plantar placement of the paw with no weight support
9	Plantar placement of the paw with weight support in stance only (i.e., when stationary) or occasional, frequent, or consistent weight-supported dorsal stepping and no plantar stepping
10	Occasional weight-supported plantar steps; no FL–HL coordination
11	Frequent to consistent weight-supported plantar steps <i>and</i> no FL–HL coordination
12	Frequent to consistent weight-supported plantar steps <i>and</i> occasional FL–HL coordination
13	Frequent to consistent weight-supported plantar steps <i>and</i> frequent FL–HL coordination
14	Consistent weight-supported plantar steps, consistent FL–HL coordination, <i>and</i> predominant paw position during locomotion is rotated (internally or externally) when it makes <i>initial contact</i> with the surface as well as just before it is <i>lifted off</i> at the end of stance; or frequent plantar stepping, consistent FL–HL coordination, <i>and</i> occasional dorsal stepping
15	Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination <i>and</i> no toe clearance or occasional toe clearance during forward limb advancement; predominant paw position is parallel to the body at initial contact
16	Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait <i>and</i> toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift off
17	Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait <i>and</i> toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact <i>and</i> lift off
18	Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait <i>and</i> toe clearance occurs consistently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift off
19	Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait, toe clearance occurs consistently during forward limb advancement, predominant paw position is parallel at initial contact <i>and</i> lift off, and tail is down part or all of the time
20	Consistent plantar stepping and consistent coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel at initial contact and lift off, <i>and</i> trunk instability; tail consistently up
21	Consistent plantar stepping and coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel throughout stance, <i>and</i> consistent trunk stability; tail consistently up

Note. Slight: Partial joint movement through less than half the range of joint motion. Extensive: Movement through more than half of the range of joint motion. Sweeping: Rhythmic movement of HL in which all three joints are extended and then fully flex and extend again; animal is usually sidelying and plantar surface of paw may or may not contact the ground; no weight support across the HL is evident. No weight support: No contraction of the extensor muscles of the HL during plantar placement of the paw; or no elevation of the hindquarter. Weight support: Contraction of the extensor muscles of the HL during plantar placement of the paw; or, elevation of the hindquarter. Plantar stepping: The paw is in *plantar* contact with weight support and then the HL is advanced forward and *plantar* contact with weight support is reestablished. Dorsal stepping: Weight is supported through the dorsal surface of the paw at some point in the step cycle. FL–HL coordination: For every FL step a HL step is taken and the HLs alternate. Occasional: Less than or equal to half; $\leq 50\%$. Frequent: More than half but not always; 51–94%. Consistent: Nearly always or always; 95–100%. Trunk instability: Lateral weight shifts which cause waddling from side to side or a partial collapse of the trunk.

Figure 28. Evaluation de la locomotion chez le rat par le score de Basso, Beattie et Bresnahan. Le score de 14 correspond à la restitution de la coordination entre les membres thoraciques et pelviens, et au soutien de poids du corps (Basso et al, 1996)

5) Etude du recrutement cellulaire après lésion du corps calleux

5.1 Animaux

Les animaux utilisés pour cette expérimentation sont des rats mâles Sprague-Dawley (Laboratoires Janvier) âgés 6 semaines et pesant 300 g à l'opération.

5.2 Procédure expérimentale

5.2.1 Organisation des lots

Cinq lots de 6 rats sont constitués de la manière suivante : (1) rats lésés non traités ;(2) rats lésés traités par NX210 par voie ventriculaire ; (3) rats lésés traités par NX210 in situ ; (4) rats lésés traités par véhicule in situ ; (5) rats lésés traités par NX210 par voie intraparenchymateuse. Ces animaux étaient euthanasiés à J14.

Deux lots de deux rats correspondent aux (1) sham et aux (2) rats lésés traités par placebo et euthanasiés à J2

5.2.2 Procédure chirurgicale

La procédure chirurgicale est réalisée à J0 sous anesthésie générale à la kétamine à 80 mg/kg (Imalgène1000®) après prémédication à la xylazine à 5 mg/kg (Rompun à 2%®) par voie intra-péritonéale. L'animal est disposé en décubitus ventral sur couverture chauffante, avec monitoring thermique. On réalise une craniectomie frontale sagittale par fraisage, la dure-mère est ensuite ouverte au bistouri.

On pratique en conditions stéréotaxiques une section parasagittale droite du corps calleux avec un couteau ophtalmique Couteau Crescent BD Xstar™ de 2,5 mm sur un plan coronal passant par les foramens interventriculaires (coordonnées : -0,92 mm du bregma sur l'axe rostrocaudal, 2,8 mm du plan sagittal et 3 mm de profondeur selon Paxinos al, 1986. Les injections intracérébrales se pratiquent au moyen d'une canule d'injection de 16G (Laboratoires Phymep, Paris) reliée à une seringue Hamilton de 50 µl, au pousse-seringue électrique au débit de 3 µl/min. On injecte in situ ou dans le ventricule latéral gauche 3µl de NX210 ou de véhicule

(sérum glucosé à 5%). Les coordonnées de l'injection intraventriculaire sont -0,92 mm du bregma sur l'axe rostrocaudal, 1,6 mm du plan sagittal, 3,2 mm de profondeur. On ferme la craniotomie à la cire (Bone Wax®, Ethicon) et le revêtement cutané par surjet au Surgilon® 4-0 (Covidien).

La BromodéoxyUridine (BrdU) est injectée à la posologie de 50 mg/kg par voie intrapéritonéale matin et soir pendant 14 jours. La BrdU marque les cellules en mitose et permet de suivre la migration des cellules filles.

Les animaux sont euthanasiés à J2 pour les 2 rats lésés et injecté avec le véhicule *in situ*, et à J14 pour les 26 autres. Sous anesthésie générale au Pentobarbital par injection intrapéritonéale, on pratique une exsanguination par perfusion intracardiaque de sérum hépariné, puis une fixation par perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde à 4%. L'encéphale est ensuite prélevé avec le tractus olfactif.

5.3 Coloration à l'or colloïdal

La myéline a été mise en évidence par une coloration à l'or (Schmued et al, 2008). Le black Gold II est un complexe aurohalophosphate colorant spécifiquement la myéline du système nerveux central. Cette technique permet de colorer les faisceaux de fibres myélinisés en rouge-brun sombre alors que les fibres individuelles apparaissent en noir. Ce traceur peut être utilisé afin de localiser à la fois la myéline normale et pathologique

Le cerveau est imprégné dans une solution de sucrose à 30 % dans du PBS à pH 7,6 pendant 24 heures à 4°C. On réalise des cryosections transversales sériées de 30 µm du cerveau, centrées sur la lésion dont la longueur rostrocaudale est de 2,5 mm. Les coupes sont déposées sur des lames gélatinées. Les cryosections sont lavées au tampon phosphate à 0.1 M. La coloration s'effectue en les immergeant 15 min dans une solution de phosphate d'or à 0.2% (Black Gold II myelin staining kit; Millipore, USA) préchauffée à 60°C dans une solution de NaCl à 0.9% (Jabonero, 1953). Une solution de Sodium thiosulfate (1%) est ensuite ajoutée et incubée pendant 3 minutes à 60°C. Les coupes sont ensuite rincées 3 fois pendant 2 minutes avec de l'eau MilliQ. On réalise une contre-coloration des corps cellulaires avec une solution de Crésyl violet (Millipore, USA) à 0,1% dans une solution aqueuse d'acide acétique glaciale à 3µl/ml.

5.4 Immunohistochimie

Des immunomarquages ont été utilisés pour marquer la gaine de myéline et le neurofilament. Le marquage de la myéline (MBP) est réalisé par l'anticorps primaire anti-MBP (mouse polyclonal IgG, 1/500, Chemicon) dilué au 1/500 dans une solution de BSA à 3 % - PBS Triton 0,3%. Le marquage des NF utilise l'anticorps primaire anti-NF (rabbit polyclonal IgG, 1/1500, SIGMA-ALDRICH) dilué au 1/1500 dans une solution de BSA à 3 % - PBS Triton 0,3%.

Des immunomarquages sont destinés à mettre en évidence et à identifier les cellules activées dans la zone subventriculaire et recrutées sur le site lésionnel. Le marquage de la BrdU par un anticorps primaire polyclonal mouton dilué au 1/200 (Maine Biotechnology Services) permet de suivre les cellules en multiplication. Le marquage de la Nestine par un anticorps souris MAB353 dilué au 1/1000 (Millipore) permet de suivre les cellules souches neurales. Le marquage du NG2 par un anticorps anti-NG2 polyclonal lapin (Millepore) dilué au 1/200 permet de suivre les progéniteurs d'oligodendrocytes. Le marquage de l'Olig2 anticorps anti Olig2 polyclonal lapin, 1/1000 (Millepore) identifie les oligodendrocytes matures (Lu et al, 2000; Takebayashi et al, 2000 ; Zhou et al, 2000). Le marquage de NeuN par un anticorps anti-NeuN polyclonal lapin dilué au 1/1000 (Millepore) permet de suivre la lignée neuronale. Le marquage du GFAP par un anticorps anti-GFAP monoclonal souris dilué au 1/1000 (Millipore) permet de suivre la lignée astrocytaire.

Six comarquages ont été constitués : (1) Nestine – NeuN ; (2) Nestine - NG2 ; (3) Nestine - Olig2 ; (4) Nestine – GFAP ; (5) BrdU – Nestine ; (6) MBP – NF.

Le cerveau est imprégné dans une solution de sucrose à 30 % dans du PBS à pH 7,6 pendant 24 heures à 4°C. On réalise des cryosections transversales sériées de 30 µm du cerveau centrées sur la lésion dont la longueur rostrocaudale est de 2,5 mm. Les immunomarquages sont réalisés sur coupes flottantes.

Pour le marquage BrdU, les coupes flottantes sont lavées 3 fois 5 minutes dans une solution de PBS avec 0,1% de Triton. Elles sont incubées successivement 10 min dans une solution de HCl 1N à 4°C, 10 min dans une solution de HCl 2N à température ambiante, 20 min dans une solution de HCl 2N à 37°C et 12 min dans une solution de BORAX 0,1M pH 8,6. Les

coupes sont lavées 3 fois 5 min dans une solution de PBS avec 0.1% de Triton et bloquées 2 heures dans une solution de PBS avec 0,1% de Triton et 5% de sérum d'âne. Sur la nuit et sous agitation à température ambiante, les coupes flottantes sont mises en présence des anticorps primaires anti BrdU de mouton à 1/400 et anti Nestine de souris à 1/1000 dans du PBS contenant 0.1% de Triton et 1% de sérum d'âne. Les coupes sont lavées 3 fois 10 min dans une solution de PBS avec 0,1 % de Triton, puis incubées pendant 1 heure 45 avec des anticorps secondaires anti-mouton couplés au FITC dilués au 1/1600 et anti-souris couplé au Cy3 dilués au 1/1600 dans l'obscurité, à température ambiante, dans une solution de PBS avec 0,1% de Triton et 1% de sérum d'âne. Les coupes sont lavées 2 fois 10 min puis 1 heure dans une solution de PBS avec 0,1 % de Triton.

Les coupes flottantes sont montées sur des lames Superfrost Plus (ThermoScientific), séchées, rincées dans de l'eau distillée, mises en présence du liquide montage contenant du DAPI, Fluoroshield™ avec du DAPI (Sigma).

Les marquages sont numérisés au microscope à fluorescence Axio Imager M2 (Zeiss) équipé d'une caméra digitale AxioCam MRc Rev.3 (Zeiss).

6) Quantification et analyse statistique

Les données statistiques sont exprimées par leurs moyennes $\pm$ SEM. Dans les études *in vitro*, les groupes NX210, véhicule et contrôle sont comparés par analyse de la variance à un facteur suivie du test post-hoc de Dunnett. Dans les études *in vivo*, des analyses de la variance pour mesures répétées et des tests non paramétriques de Friedman complétées des tests post-hoc de Tukey-Kramer ont permis d'étudier l'évolution des différents paramètres au cours du temps et dans les différents groupes. Les tests statistiques ont été réalisés avec un risque d'erreur de type I $\alpha = 5\%$. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel STATAv10® software (StataCorp, College Station, Texas, USA).

II) Résultats

L'effet neuroprotecteur du NX210 révélé par le WST-1, ses effets sur la croissance neuritique *in vivo* et sur la récupération fonctionnelle après lésion médullaire ont fait l'objet d'une publication dans PlosOne figurant en annexe (Sakka et al, 2014). L'évaluation de la viabilité cellulaire au rouge neutre et la mesure de l'activité anti-caspase feront l'objet d'une publication prochaine.

1) Effet neuroprotecteur du NX210 sur le stress oxydatif *in vitro*

1.1 Evaluation de la viabilité cellulaire par le test WST-1

La neuroprotection exercée par le NX210 a pu être mise en évidence par la résistance des cellules B104 à l'exposition au peroxyde d'hydrogène au moyen du test colorimétrique WST-1. Il montre dans les cellules viables une réduction enzymatique extracellulaire du WST en un composant coloré, le formazan, dont la concentration est calculée en spectrophotométrie.

En présence du peroxyde d'hydrogène, on constate après 18 heures, une réduction de 70% de la viabilité cellulaire par rapport aux contrôles. Lorsque le milieu de culture contient du NX210 aux concentrations de 100 et de 250 µg/ml, cet effet du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité cellulaire est antagonisé à la dose de 250 µg/ml (Fig. 29).

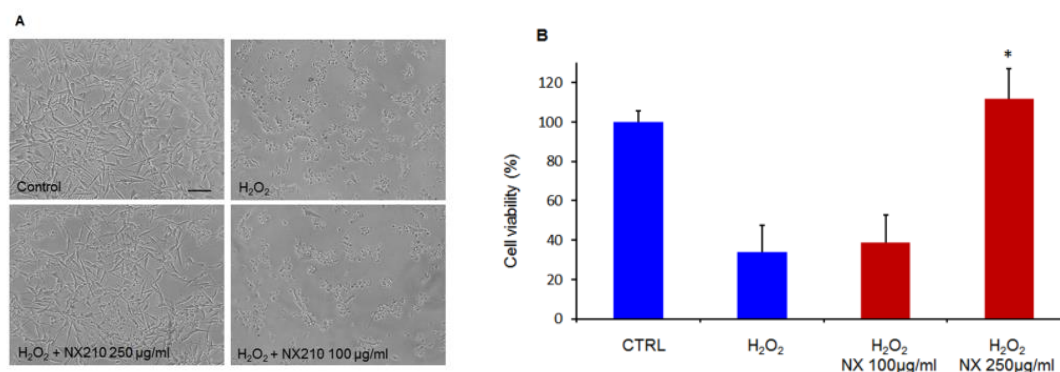


Figure 29. Effet neuroprotecteur du NX210 sur le stress oxydatif. Evaluation de la viabilité cellulaire par le WST-1. L'effet neuroprotecteur a été testé aux doses de 100 et 250 µg/ml sur la lignée B104 exposée pendant 18 heures à l'H₂O₂. (A) L'observation en microscopie par contraste de phase montre une morphologie normale des cellules dans le groupe contrôle. L'exposition au H₂O₂ diminue la viabilité cellulaire, les cellules B104 sont remplacées par des débris cellulaires. Le NX210 à 250 µg/ml prévient la mort cellulaire induite par l'H₂O₂. (B) Viabilité cellulaire évaluée par le WST-1. La mort cellulaire est réduite de manière significative par le NX210 à 250 µg/ml. Chaque expérimentation a été réalisée en triplicats répétée 4 fois. Données exprimées en pourcentage de cellules vivantes rapportées au contrôle, valeurs moyennes +/- SEM. * p < 0.001. Echelle = 100 µm.

1.2 Evaluation de la viabilité cellulaire au rouge neutre

La neuroprotection exercée par le NX210 sur le stress oxydatif a été confirmée par une autre méthode, le test colorimétrique au rouge neutre. Nous avons d'abord vérifié que le NX210 seul, sans stress oxydatif, était sans effet sur la viabilité cellulaire. L' H_2O_2 a un effet drastique sur la viabilité cellulaire qui est évaluée à 12,8%. Administré simultanément avec l' H_2O_2 , le NX210 exerce une neuroprotection significative avec une viabilité cellulaire de 39%, 72% et 94% aux concentrations de 100, 250 et 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, démontrant un effet dose dépendant (figures 30a).

Administré préalablement à l'exposition à l' H_2O_2 , le NX210 exerce une activité protectrice contre le stress oxydatif dès 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. L'effet augmente avec la dose entre 100 et 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ avec une viabilité cellulaire respectivement mesurée à 56% et à 85%. A partir de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ la protection anti-oxydante atteint un plateau, la viabilité cellulaire n'étant pas significativement augmentée à 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (figure 30b).

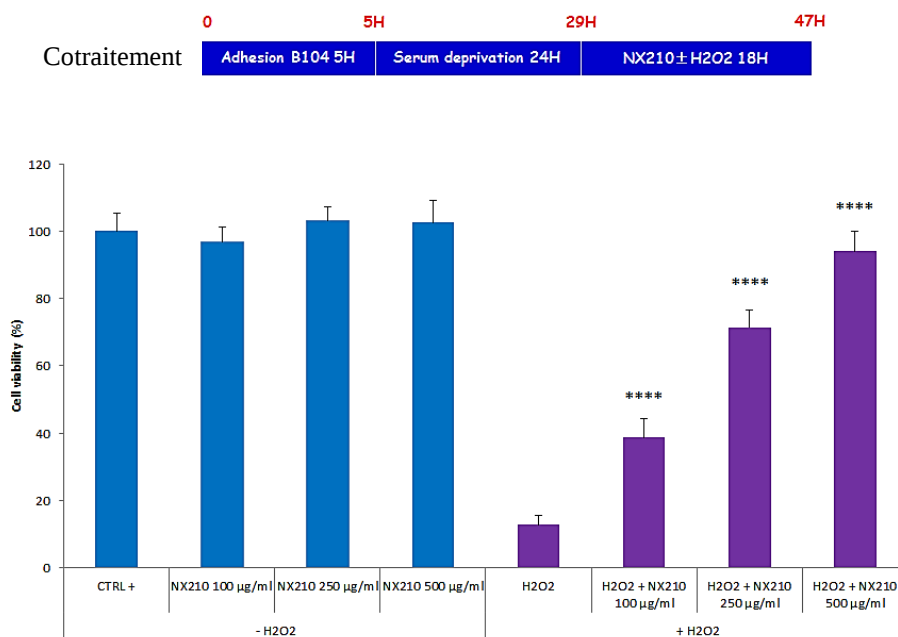


Figure 30a. Effet neuroprotecteur du NX210 sur le stress oxydatif. Evaluation de la viabilité cellulaire au rouge neutre. Traitement par administration simultanée de NX210 et de H_2O_2 .

L'effet neuroprotecteur a été testé aux doses de 100, 250 et 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sur la lignée B104 exposée pendant 18 heures à l' H_2O_2 . Le NX210 prévient les morts cellulaires par stress oxydatif dès 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et montre un effet dose. Chaque expérimentation a été réalisée en triplicats répétée 4 fois. Données exprimées en pourcentage de cellules vivantes rapportées au contrôle, valeurs moyennes $\pm$ SEM. * $p < 0.001$

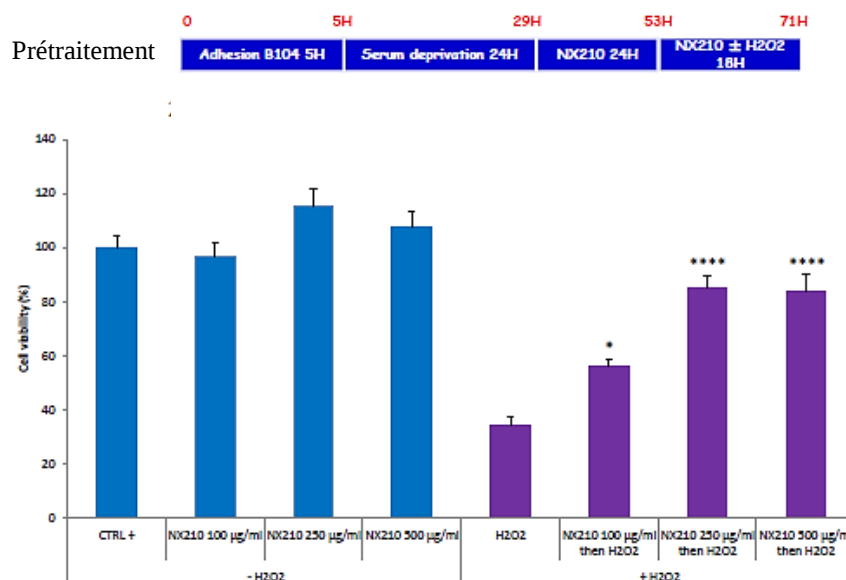


Figure 30b. Effet neuroprotecteur du NX210 sur le stress oxydatif. Evaluation de la viabilité cellulaire au rouge neutre. Traitement par NX210 avant administration d'H₂O₂.

Prétraitement pendant 24 heures au NX210 aux doses de 100, 250 et 500 µg/ml. Les cellules B104 sont ensuite exposées pendant 18 heures à l'H₂O₂. Le NX210 prévient les morts cellulaires par stress oxydatif dès 100 µg/ml et atteint un plateau à 250 µg/ml. A 500 µg/ml, l'effet anti-oxydant est moins important qu'en cotraitement. Cela suggère deux mécanismes d'action. Chaque expérimentation a été réalisée en triplicats répétée 4 fois. Données exprimées en pourcentage de cellules vivantes rapportées au contrôle, valeurs moyennes +/- SEM. * p < 0.001

1.3 Evaluation de l'apoptose par l'activité des Caspases 3/7

L'effet du NX210 sur l'apoptose a été évalué aux concentrations de 100, 250 et 500 µg/ml en présence de H₂O₂.

Lors du stress oxydatif occasionné par l'H₂O₂, l'activité des caspases 3/7, exprimée en RFU est de 106,4 et multipliée par 10 par rapport au contrôle (10.7 RFU). Le NX210 entraîne une diminution dose-dépendante de l'activité des caspases 3/7 qui est respectivement 95.9, 53.8 et 16.3 RFU aux concentrations de 100, 250 et 500 µg/ml. Ces résultats mettent en évidence le rôle anti-apoptotique du peptide NX210 lors d'un cotraitement.

L'activité des caspases 3/7 sous stress oxydatif avec une concentration de 500 µg/ml de NX210 (16.3 RFU) est très proche de celle des cellules contrôles sans stress oxydatif (10.7 RFU) (figure 31).

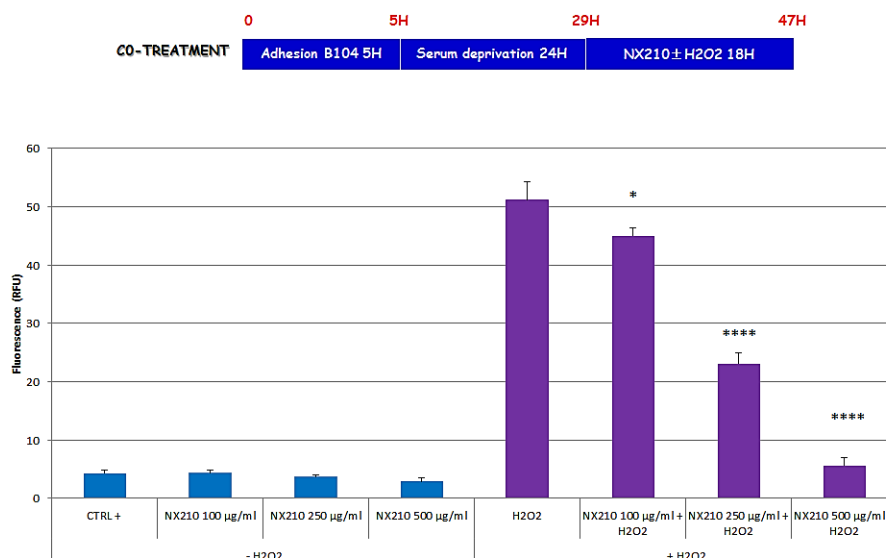


Figure 31. Effet neuroprotecteur du NX210 sur le stress oxydatif. Evaluation de l'activité anti-apoptotique par mesure de l'activité des Caspases 3/7.

L'effet neuroprotecteur a été testé aux doses de 100, 250 et 500 µg/ml sur la lignée B104 exposée pendant 18 heures à l'H₂O₂. L'effet neuroprotecteur apparaît dès 100 µg/ml (à $p < 0.05$) et montre un effet dose aux posologies suivantes. Les données sont exprimées en unités de fluorescence relatives $\pm$ SEM. Test ANOVA avec test Dunnett post-hoc. * différence significative avec H₂O₂ seul avec $p < 0.05$; **** $p < 0.001$

2) Effets du NX210 sur la croissance neuritique *in vivo*

Chez 4 des 5 animaux contrôle, aucune croissance axonale n'est constatée, aussi bien à partir de l'extrémité crâniale qu'à partir de l'extrémité caudale de la cavité. Par ailleurs, la lumière du tube de collagène reste vide, elle n'est pas colonisée par du tissu conjonctif (figure 32). Chez un animal, on observe néanmoins l'apparition d'un tissu néoformé à partir de l'extrémité caudale de la cavité opératoire. Ce bourgeonnement tissulaire présente un immunomarquage positif pour le NF (NF+) sans qu'il soit possible d'y distinguer un quelconque arrangement spatial.

Chez 4 des 5 animaux traités par le 5 NX210, il existe une repousse neuritique significative sous la forme de processus filiformes fortement NF+ orientés dans la lumière du tube selon un axe crâniocaudal. Ces bourgeons tissulaires nés de l'extrémité caudale sont significativement plus importants que ceux nés de l'extrémité rostrale de la cavité, avec une longueur respective de 1.8 contre 1.6 mm de grand axe crâniocaudal à 10 jours. Leur surface présente un marquage positif à la laminine.

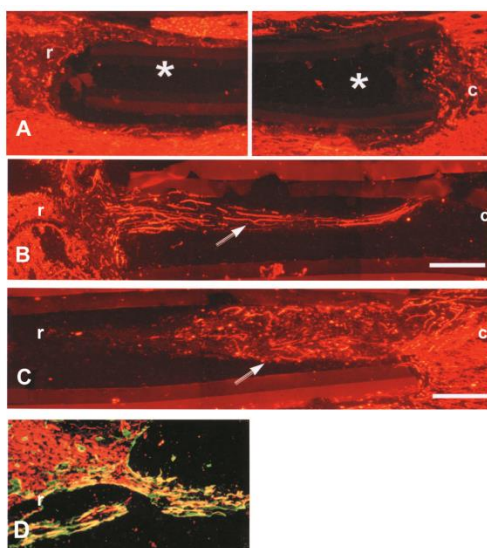


Figure 32. Effets du NX210 sur la croissance neuritique dans un modèle de lésion médullaire chez le rat. La lésion est obtenue par aspiration des cordons dorsaux et des cornes grises dorsales de la moelle spinale. Un tube collagène rempli de véhicule A (A) ou de NX210 (B and C) est mis en place dans la cavité opératoire. La croissance neuritique est mise en évidence par immunomarquage de NF. (A) Dans le groupe véhicule ($n = 5$), le tube reste vide sans signe de repousse (*). (B et C) : dans le groupe NX210 ($n = 5$), une repousse neuritique (flèche) est mise en évidence, prédominant à partir de la tranche de section médullaire caudale. Les fibres se disposent selon une orientation longitudinale. (D) : à la surface du bourgeon médullaire, le NF est colocalisé avec la laminine. r : rostral; c : caudal ; échelle : 250 μ m.

3) Effets du NX210 sur le recouvrement fonctionnel après lésion médullaire

3.1 Le poids

Avant traumatisme médullaire, il n'existe aucune différence significative relative au poids des animaux entre le groupe traité et le groupe véhicule. Le poids post-lésionnel diminue chez tous les animaux. Deux animaux témoins décèdent, l'un à J2, l'autre à J5 pour infection urinaire. Le poids des animaux traités augmente entre J1 et J7 où il retrouve le poids pré-lésionnel, et continue d'augmenter jusqu'à la fin de l'étude à J28. Chez les animaux du groupe véhicule, le poids diminue jusqu'à J7 et reprend sa valeur pré-lésionnelle seulement à J14 (figure 33).

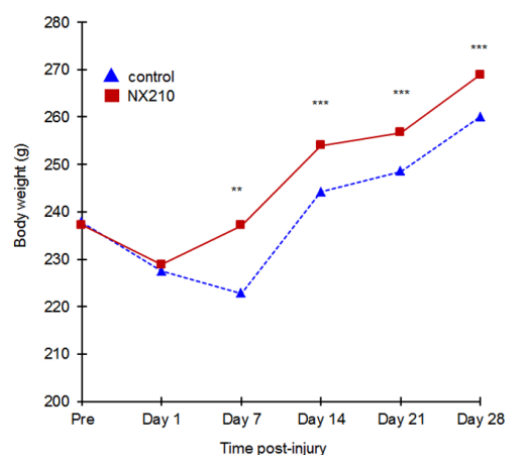


Figure 33. Effets du NX210 sur le recouvrement fonctionnel après contusion médullaire chez le rat. Poids corporel. La lésion médullaire est une contusion obtenue par le NYU/MASCIC impactor. Le poids corporel est mesuré une fois par semaine tout au long de l'étude, groupe NX210 (n = 8) en rouge, groupe véhicule (n = 8) en bleu. Dans le groupe NX210, le poids augmente continuellement dès J1 et rattrape la valeur pré-lésionnelle à J7. Dans le groupe véhicule, le poids corporel baisse les 7 jours suivant la lésion, rattrape la valeur pré-lésionnelle à J 14 et reste significativement inférieur aux valeurs du groupe traité jusqu'à la fin de l'étude. Résultats exprimés en moyennes $\pm$ SEM. Différence significative avec ** $p < 0.05$ et *** $p < 0.001$.

3.2 Le score BBB

Le score locomoteur de BBB diminue de manière significative chez tous les animaux à tous les points de mesure après lésion médullaire par rapport aux valeurs pré-lésionnelles. Dans le groupe traité, le score est significativement plus important par rapport au groupe véhicule dès J14 et ce jusqu'à la fin de l'étude. Le score des animaux traités augmente continuellement jusqu'à la fin de l'étude alors qu'il marque un plateau chez les animaux du groupe véhicule. Cinq des 8 animaux traités atteignent un score final de 14, correspondant à l'existence de mouvements coordonnés entre les membres thoraciques et les membres pelviens, contre seulement 1 sur 6 dans le groupe véhicule (figure 34).

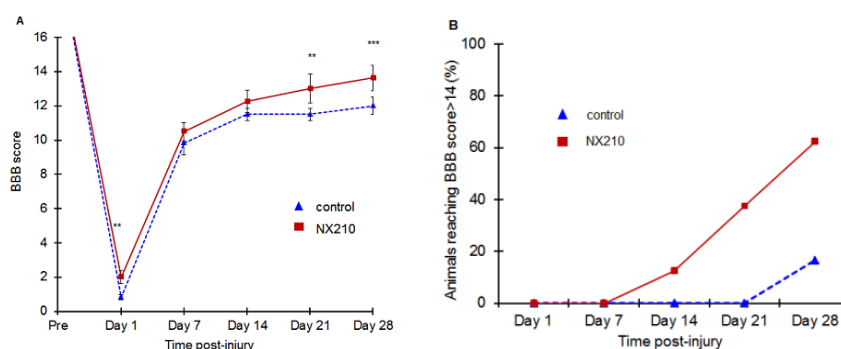


Figure 34. Effets du NX210 sur le recouvrement fonctionnel après contusion médullaire chez le rat : BBB score. Les fonctions locomotrices ont été évaluées une fois par semaine par deux observateurs en utilisant l'échelle de BBB, groupe NX210 (n = 8) en rouge, groupe véhicule (n = 8) en bleu. (A) Le score BBB du groupe NX210 est significativement plus élevé que celui du groupe témoin les deux dernières semaines de l'étude. Il continue d'augmenter jusqu'à la fin de l'étude alors qu'il atteint un plateau à J14 dans le groupe témoin. (B) Un score supérieur à 14 correspond à une coordination entre les mouvements des membres thoraciques et les mouvements des membres pelviens. Dans le groupe NX210, des animaux atteignent un score de 14 dès la deuxième semaine, et leur proportion continue d'augmenter jusqu'à la fin de l'étude pour atteindre 5/8. Dans le groupe témoin, le score de 14 est atteint par un seul animal à J28. Données exprimées en moyenne $\pm$ SEM, $p < 0.05$.

3.3 Les Open Arena tests

Les deux critères retenus, la distance parcourue et le temps passé dans les cellules centrales, sont altérés de manière significative dans le groupe véhicule à tous les points de mesure, comparés aux valeurs pré-lésionnelles (2-way ANOVA, $p < 0.05$). Le groupe traité montre en revanche une augmentation de la distance parcourue aux points de mesure intermédiaires, et une diminution significative du temps passé dans les cellules centrales notamment à la fin de l'étude (figure 35).

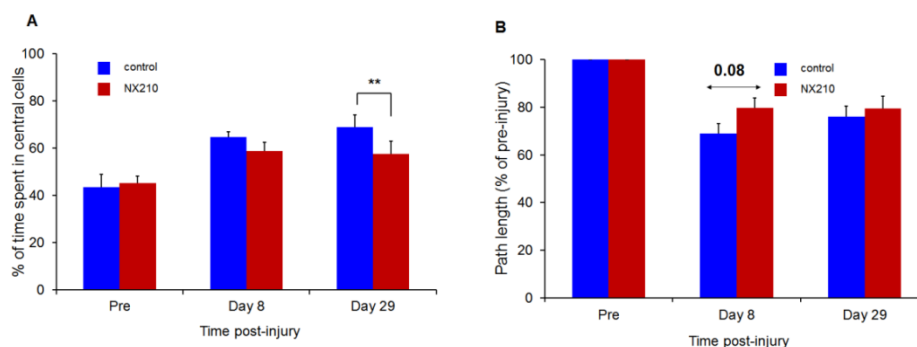


Figure 35. Effets du NX210 sur le recouvrement fonctionnel après contusion médullaire chez le rat : open arena test. (A) Pourcentage de temps passé dans les cellules centrales. (B) Trajet parcouru. Groupe NX210 (n = 8, rouge), groupe témoin (n = 8, bleu). Le traitement par NX210 modifie significativement le temps passé dans les cellules centrales par rapport au groupe véhicule en fin d'étude. Données exprimées en moyennes $\pm$ SEM, * $p < 0.05$.

3.4 Les réflexes

Les résultats des réflexes d'extension et de placement sont exprimés en pourcentages d'animaux donnant des réponses normales. Ils sont systématiquement plus élevés chez les animaux traités à J14, J21 et J28. Dans ce groupe, le pourcentage d'animaux recouvrant un réflexe d'extension normal est de 40% à J7, et il augmente continuellement pour atteindre 100% en fin d'étude. Dans le groupe véhicule, il reste inférieur à 33% jusqu'aux derniers points de mesure. Un réflexe de placement normal est obtenu chez 50% des animaux du groupe traité aux deux dernières mesures contre seulement 33% dans le groupe véhicule (Fig. 36).

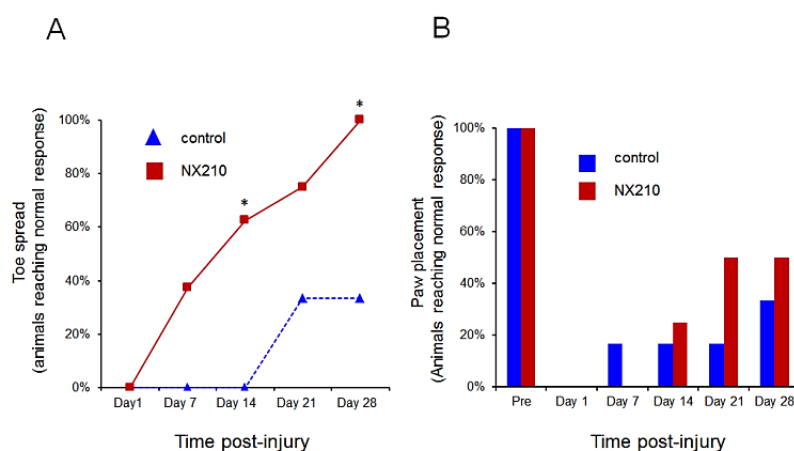


Figure 36. Effets du NX210 sur le recouvrement fonctionnel après contusion médullaire chez le rat : étude des réflexes.

(A) : réflexe d'extension, (B) : test de placement. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'animaux donnant une réponse normale. Les groupes NX210 (n = 8) et véhicule (n = 8) montrent une altération significative des réponses aux deux tests le jour suivant la lésion. A J21 et J28, le groupe NX210 présente une amélioration significative avec des scores qui se normalisent en fin d'étude pour le réflexe d'extension. Dans le groupe véhicule, une amélioration n'est détectée qu'à J14 avec un plateau atteint à J21. Données exprimées par la moyenne de chaque groupe $\pm$ SEM. *: différence significative par rapport au groupe véhicule, $p < 0.05$.

4) Etude du recrutement cellulaire après lésion par section du corps calleux

L'étude de la prolifération et du recrutement cellulaires a été réalisée en immunohistochimie (figures 37 à 40). Nos résultats correspondent aux groupes traités par injection *in situ* de NX210 ou de véhicule. Nous ne disposons que de résultats préliminaires, car la totalité des voies d'administration n'a pas encore été explorée.

L'étude a porté sur les cellules souches neurales, les astrocytes, les neurones et les oligodendrocytes. L'immunomarquage de la nestine a permis de mettre en évidence une migration de cellules souches neurales de la zone subventriculaire vers le site lésionnel, chez les tous les animaux. Dans l'état actuel de notre étude, nous ne mettons pas en évidence de différence quantitative entre le lot NX210 et le lot véhicule. L'immunomarquage de la GFAP montre que le NX210 ne suscite pas de manière élective un recrutement de cellules astrocytaires par rapport au véhicule. L'immunomarquage du NeuN ne met en évidence aucun recrutement de cellules neuronales différenciées sur le site lésionnel dans les deux groupes d'animaux. Par contre, l'immunomarquage du NG2 semble montrer un recrutement significatif de cellules myélinisantes sur le site lésionnel. L'ensemble de ces données nécessite bien entendu d'être quantifié et confirmé statistiquement après lecture de toutes les coupes histologiques.

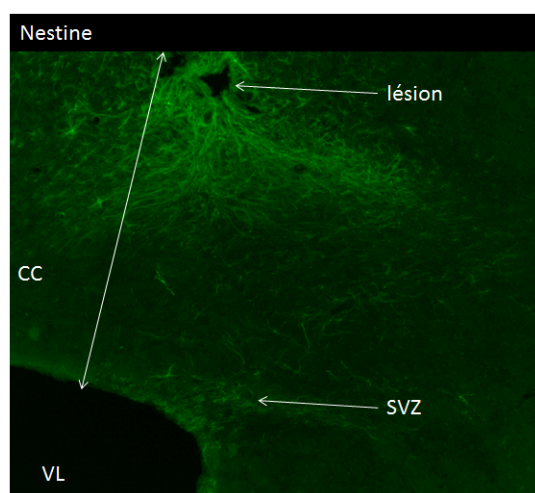


Figure 37. Le recrutement de cellules souches neurales par immunomarquage de la nestine. X25
L'immunomarquage de la nestine permet de montrer une migration de cellules souches neurales de la zone subventriculaire vers le site lésionnel où elles s'accumulent en périphérie.

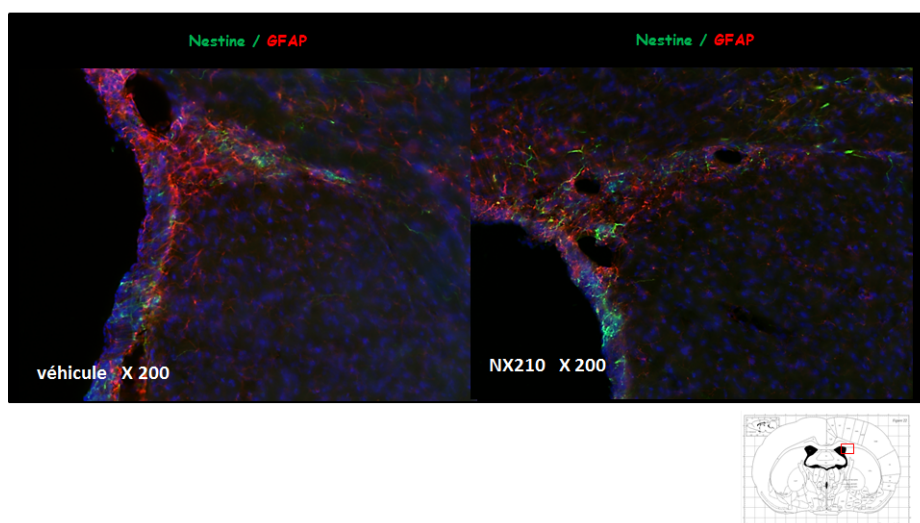


Figure 38. Mise en évidence du recrutement de cellules de phénotype astrocytaire par comarquage de la nestine et de la GFAP.
L'immunomarquage de la GFAP ne met pas en évidence de majoration du recrutement de cellules astrocytaire sous l'effet du NX210

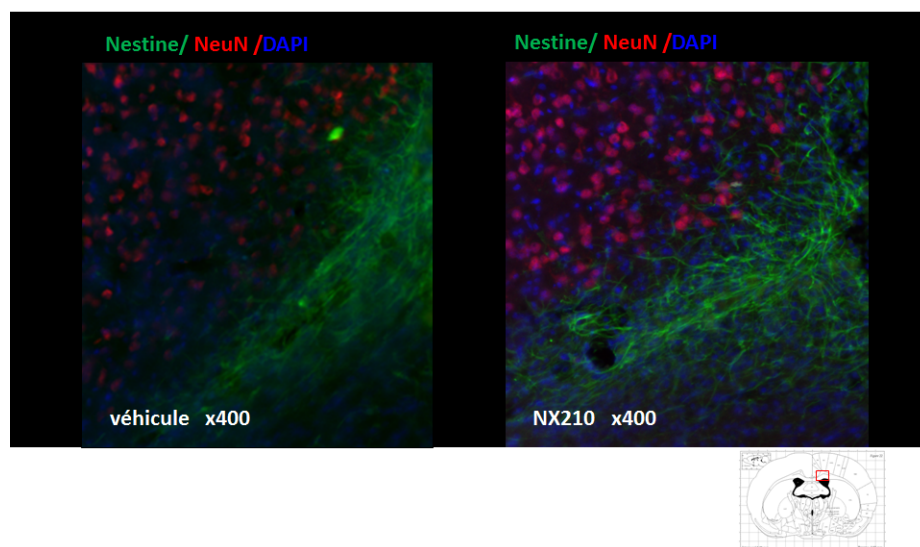


Figure 39. Mise en évidence du recrutement de cellules neuronales par immunomarquage du NeuN.
Le comarquage du NeuN et de la Nestine ne met pas en évidence de recrutement neuronal sur le site lésionnel.

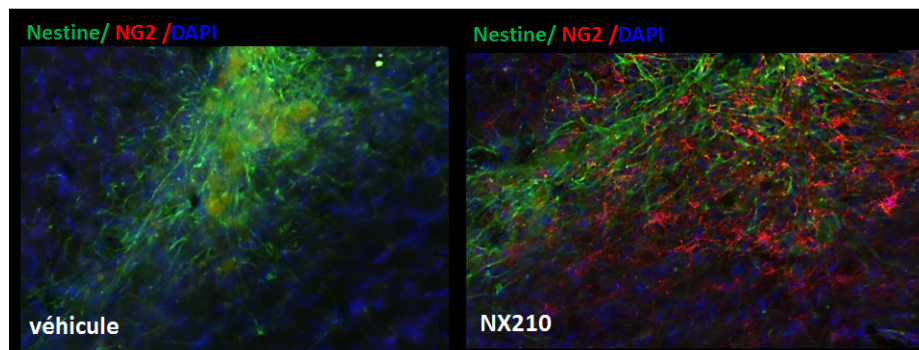


Figure 40. Mise en évidence du recrutement de cellules myélinisantes sur le site lésionnel par immunomarquage du NG2.

L'immunomarquage de NG2 est significativement augmenté chez les animaux traités par le NX210. Le NG2 marque chez l'adulte les cellules progénitrices des oligodendrocytes

Discussion

Aucune approche pharmacologique ou cellulaire développée en préclinique pour traiter les lésions traumatiques de la substance blanche n'a jusqu'à aujourd'hui débouché sur un bénéfice substantiel en essai clinique chez l'homme. Le principe de la chirurgie à la phase aiguë reste « mécaniciste », basé sur la levée précoce d'une compression parenchymateuse ou la stabilisation d'une lésion rachidienne instable. Celui de la neuroréanimation vise au maintien des fonctions vitales et à la prévention des complications secondaires par le traitement des atteintes systémiques. Certes, des progrès significatifs ont été réalisés grâce au monitoring multimodal qui permet notamment d'adapter l'oxygénation tissulaire aux besoins métaboliques, mais aucun traitement spécifique n'est disponible pour prévenir ou traiter les lésions histologiques secondaires. La rééducation quant à elle, vise à optimiser la réinsertion dans la vie active avec un maximum d'autonomie, les récupérations fonctionnelles restant rares et limitées au-delà de 6 mois, même si une amélioration par régénération nerveuse ou formation de circuits de suppléance peut être suscitée par la rééducation.

Les difficultés rencontrées par cette recherche de thérapie spécifique sont en fait liées à l'extrême complexité de la physiopathologie des lésions de la substance blanche qui est à la fois mal comprise et mal maîtrisée. Il s'agit de surcroît d'un processus évolutif offrant des cibles thérapeutiques successives au cours de son déroulement. L'impact initial suscite une lésion primaire sous la forme de destructions neuronales et vasculaires plus ou moins importantes dont l'évolution suit classiquement trois phases successives : inflammation, cicatrisation et régénération. En vérité, ces phases, initiées dès le début de l'agression tissulaire, s'empîent en interagissant les unes avec les autres. La phase d'inflammation associe dès la première heure un afflux leucocytaire sur le site lésionnel et la constitution d'un œdème. Elle enclenche la cascade d'événements vasculaires et biochimiques de la lésion secondaire qui étend la destruction tissulaire à la zone limitrophe primitivement épargnée. A la phase de cicatrisation, la réorganisation des circuits neuronaux est entravée par les inhibiteurs de la croissance axonale et la gliose réactionnelle. Les cellules neurales recolonisent en partie la lésion, mais leur potentiel de régénération fonctionnelle est faible.

Jusque dans les années 90, le cerveau adulte était considéré comme une structure différenciée, incapable de se renouveler. Des travaux ont depuis montré l'existence de niches à cellules souches (Doetsch et al, 1999) capables de donner naissance à de nouvelles cellules gliales et à de nouveaux neurones. Des modèles murins ont par ailleurs montré que des lésions ischémiques de la substance blanche cérébrale activent la production de neuroblastes dans ces réservoirs de cellules souches (Jin et al, 2001) et stimulent leur migration vers la lésion où ils s'intègrent au tissu cérébral lésé pour le régénérer (Faiz et al, 2008).

Aucune étude n'est parvenue à montrer *in vivo* l'incidence de ce recrutement cellulaire sur une repousse axonale et une reconstitution myélinique qui supporteraient le recouvrement fonctionnel. La régénération cellulaire à partir de ces niches et les mécanismes de réparation *in situ* ne restituent en fait jamais *ad integrum* les pertes tissulaires sur le site lésionnel. Le recouvrement partiel des fonctions neurologiques observé chez certains malades repose donc essentiellement sur des phénomènes de plasticité neuronale à l'étage cortical ou spinal (Bradebury et al, 2006). Une stratégie thérapeutique destinée à restituer les fonctions neurologiques par la restauration de leur support anatomique devrait idéalement combiner la neuroprotection et la neurorégénération pour contrecarrer la lésion secondaire et stimuler les capacités de réparation du SNC.

La SCO-spondine est une glycoprotéine de la superfamille des TSR appartenant à la matrice extracellulaire, sécrétée par l'épendyme de la partie rostrale de l'aqueduc du cerveau. Dans les espèces de vertébrés où la moelle spinale a la capacité de se régénérer, elle est également produite par certaines cellules épendymaires du canal central de la moelle spinale qui semble initier le processus de régénération (Chernoff et al, 1996 ; Meiniel et al, 1996 ; Meletis et al, 2008). Son action sur la croissance et le guidage de l'axone et son implication probable dans la constitution de la commissure épithalamique lui ont donc conféré le statut de morphogène (Stanic et al, 2010 ; Estivill-Torus et al, 2001). Le NX210 dérive de la séquence la mieux conservée du motif TSR de ce morphogène. Nous avons vu ces TSR présents dans de nombreux systèmes biologiques impliqués dans les mécanismes d'adhésion cellulaire et dans les voies de signalisation médiées par les molécules de la matrice extracellulaire (Adams et al, 2000) qui guident l'axone en croissance (Hilario et al, 2009). Nous avons précédemment démontré que le

NX210 stimulait la croissance neuritique et la fasciculation sur des neurones primaires en culture (Monnerie et al, 1998) et la neuritogenèse sur les cellules de lignée B104 (Gobron et al, 2000). L'efficacité du NX210 dans la réparation de la substance blanche n'avait pas été explorée sur des modèles *in vivo*.

Pour démontrer son efficacité thérapeutique, nous avons soumis le NX210 à des tests *in vitro* et *in vivo* modélisant les cibles potentielles de la neuroprotection et de la neuroréparation.

La neuroprotection

L'augmentation significative de la viabilité des cellules B104 exposées au peroxyde d'oxygène par le traitement au NX210 préfigure une propriété anti-oxydante potentiellement intéressante en clinique. Nous avons choisi le peroxyde d'hydrogène, parce qu'il constitue un des principaux radicaux oxygénés de la réaction secondaire. Il est couramment utilisé pour apprécier *in vitro* les propriétés anti-oxydantes des molécules pharmacologiques.

Le mode d'action du NX210 n'était pas encore connu. Nous ne savions pas si la molécule agissait par effet scavenger en fixant les ROS comme pourrait le laisser envisager l'existence des deux radicaux thiols dans la molécule (figure 28) ou si elle agissait par voie métabolique. Cette dernière hypothèse pouvait être argumentée par deux constats : (1) le blocage des β 1-intégrines fait diminuer le taux de radicaux libres *in vitro* (Bao et al, 2008), (2) les effets biologiques du NX210 résultent pour la plupart d'une interaction avec les β 1-intégrines (Bamdad et al, 2004). Nous avons donc réalisé deux temps d'administration pour tester l'hypothèse d'une action métabolique. Administré 24 heures avant ou administré pendant l'exposition au peroxyde d'hydrogène, le NX210 exerce dans les deux situations une activité anti-oxydante, qui semble néanmoins plus forte en cotraitement. La demi-vie du peptide ne dépassant pas 2 heures, la persistante d'un effet pharmacologique au-delà de 24 heures démontre qu'il enclenche des voies métaboliques exerçant une action protectrice prolongée. Cela nous a donc permis de montrer que la molécule agit selon un double mode d'action, chimique et métabolique.

Cet effet antioxydant peut être important en pratique clinique. Libérés par les phénomènes ischémiques et les troubles ioniques, les ROS jouent en effet un rôle crucial dans les altérations tissulaires de la lésion secondaire. Leur intervention est précoce et prolongée, la concentration

des ROS augmentant dans les premières heures du traumatisme et ne se normalisant qu'après quatre à cinq semaines (Donnelly et al, 2007 ; Xiong et al, 2007). La peroxydation des lipides membranaires qu'ils provoquent enclenche une cascade d'événements cytotoxiques comprenant la destruction des membranes plasmiques et mitochondriales, la majoration de la perméabilité au Ca^{2+} responsable d'un influx calcique, le renforcement des phénomènes apoptotiques et la destruction de l'endothélium vasculaire ouvrant la BHE (Pineau et al, 2007 ; Schnell et al, 1999). La rupture de la BHE favorise l'extravasation de cellules et de cytokines inflammatoires et auto-entretient l'inflammation et les phénomènes apoptotiques (Kubes et al, 2000).

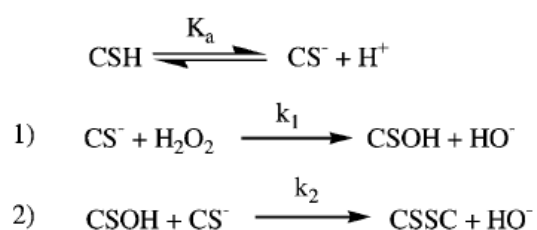


Figure 41. Effet scavenger potentiel du NX210.

La neuroprotection du NX210 contre le stress oxydatif peut relever d'un effet « scavenger ». Les deux radicaux thiols du peptide se lient au peroxyde pour constituer un pont bisulfure.

Les mécanismes nécrotiques ou apoptotiques conduisant à la mort des cellules prédominent selon le type de population cellulaire concerné, ce qui complique le choix de la cible thérapeutique. Ainsi, les pertes astrocytaires relèveraient de phénomènes nécrotiques (Beattie et al, 2002), alors que les pertes en oligodendrocytes relèveraient plutôt de processus apoptotiques (Crowe et al, 1997). L'incidence de l'apoptose sur les neurones dépendrait du niveau de déplétion énergétique et donc du mode lésionnel (Nicoreta et al, 1997). Nous avons vu que cette voie apoptotique relève très probablement d'une interaction des neurones avec la microglie activée (Beer et al, 2000 ; Choi et al, 1999, Grosjean et al, 2007, Martin-Villalba et al, 1999, Qiu et al, 2002) et les oligodendrocytes, selon un mécanisme caspase dépendant (Casha et al, 2001). Le mécanisme par lequel le stress oxydatif détruit les cellules B104 n'étant pas connu, nous avons étudié l'activité des caspases 3/7 qui sont impliquées dans la cascade apoptotique. Nous avons donc soumis les cellules B104 à un traitement combinant le peroxyde d'hydrogène et le NX210. L'inhibition de l'activité des caspases 3/7 par le NX210 dans ces conditions expérimentales et l'existence d'un effet dose dépendant démontrent les propriétés anti-apoptotiques de la molécule

in vitro indépendamment de son effet antioxydant. Le mécanisme d'action anti-caspase encore inconnu est en cours d'exploration.

L'efficacité des molécules neuroprotectrices reste décevante dans le traitement des lésions de la substance blanche en clinique pour différentes raisons. Dans certains cas, l'étendue des lésions anatomiques pourrait excéder les capacités d'une molécule pharmacologique. Dans d'autres, le champ d'action de la molécule, limité à une voie de signalisation isolée, pourrait être contrebalancé par la mise en jeu simultanée d'autres voies de signalisation. Inversement, la mise en évidence d'un mode d'action *in vitro* n'exclue pas la mise en route de plusieurs cascades d'événements métaboliques *in vivo* interagissant au sein du mécanisme lésionnel. Aucune molécule neuroprotectrice testée en phase préclinique n'a aujourd'hui démontré de bénéfice tangible dans les essais cliniques de lésions traumatiques de la moelle et du cerveau chez l'homme.

La neurorégénération

La neurorégénération constitue la deuxième option thérapeutique, destinée à compenser les pertes cellulaires et les lésions axonales. Ce type de traitement doit idéalement stimuler à la fois le renouvellement des neurones et des oligodendrocytes, la croissance et le guidage de l'axone, la synaptogenèse et la myélinisation. Nous avons montré dans des travaux précédents que le NX210 stimulait *in vitro* la croissance neuritique sur des cultures primaires de neurones et la synaptogenèse sur des cultures de cellules B104. Ces résultats obtenus par un peptide qui rappelons-le dérive d'un domaine TSR de la SCO-spondine, font écho avec ceux obtenus par d'autres protéines TSR dans la neuritogenèse et la synaptogenèse, en particulier la TSP-1 et la TSP-2 (Christopherson et al, 2005). Sécrétées dans le site lésionnel par les astrocytes et la microglie activés (Lin et al, 2003), elles apparaissent comme d'importants régulateurs de la plasticité synaptique au cours du développement et de la neuroréparation spontanée (Risher et al, 2012). *In vitro* la TSP-1 stimule la croissance neuritique (Neugebauer et al, 1991) et la migration des OPC (Scott-Drew et al, 1997) selon un mécanisme impliquant les mêmes récepteurs que le NX210, les β 1-intégrines (Tomaselli et al, 1990). *In vivo*, la TSP-1 est surexprimée sur le site lésionnel où elle stimule la croissance neuritique (Hoffmann et al, 1999) et la synaptogenèse (Hughes et al, 2010 ; Liauw et al, 2008). Ces résultats pourraient expliquer la formation de

synapses aberrantes générées par la cicatrice gliale lorsque les axones en croissance arrivent au contact d'astrocytes activés (Liuzzi 1987). Dans la synaptogenèse, les TSP agiraient sur les récepteurs à la gabapentine $\alpha 2\delta 1$ (Eroglu et al, 2009) et au TGF- $\beta 1$ (Packard et al, 2003) des neurones, par des séquences communes aux $\beta 1$ -intégrines (Eroglu et al, 2009 ; Wilkins et al, 1996).

Nous montrons maintenant que le NX210 stimule *in vivo* la croissance axonale dans un modèle de lésion médullaire traumatique à la phase aiguë chez le rat. Le modèle que nous utilisons s'inspire de celui décrit par Duchossoy et coll. (Duchossoy et al, 2001). Le tube collagène inséré dans la moelle spinale après aspiration des cordons dorsaux vise à privilégier la repousse des fibres sectionnées aux dépens des phénomènes de repousses collatérales (collateral sprouting). L'aspiration complète des deux cordons dorsaux de la moelle spinale crée une cavité lésionnelle sans laisser de collerette de substance blanche intacte en périphérie comme cela est constaté dans les modèles de contusion. L'insertion du tube collagène, calé entre les deux tranches de sections crâniale et caudale de la moelle, limite la repousse aux seules fibres issues des deux moignons de moelle. Chez les animaux traités, on constate une repousse au 10^{ème} jour, ce qui est précoce comparativement aux données de la littérature (Hill et al, 2001 ; Liebster et al, 2005). Nous notons également que la repousse des fibres ascendantes, qui atteint 2 mm en dix jours, est plus importante que celle des fibres descendantes. Cela vient corroborer les résultats d'études *in vivo* montrant une plus grande capacité régénératrice des fibres sensibles par rapport aux fibres corticospinales (Blesch et al, 2009). La repousse neuritique apparaît plus ou moins précocement selon le faisceau, celle du faisceau corticospinal s'étalant par exemple de la troisième semaine au 8^{ème} mois chez le rat (Hill et al, 2001). Les fibres ne sont pas disposées au hasard. Leur regroupement et leur agencement selon un axe crâniocaudal rappellent l'effet de la SCO-spondine sur la fasciculation des neurites constaté *in vitro* (Monnerie et al, 1997) et *in vivo* (Stanic et al, 2010). Cette aptitude à stimuler la fasciculation a été également mise en évidence *in vivo* pour d'autres protéines TSR comme la F-spondine. Sécrétée par les cellules de la floor plate, elle est impliquée dans la formation des commissures tout comme la SCO-spondine dont le NX210 dérive (Zismann et al, 2007 ; Woo et al, 2008).

Il est intéressant de constater chez les animaux traités, une colocalisation des neurofilaments et de la laminine au niveau de la repousse. Sécrétées par les astrocytes et les cellules de Schwann, les laminines stimulent la croissance axonale et interviennent dans le guidage de l'axone en interagissant avec les $\beta 1$ -intégrines (Chen et al, 2009 ; McKeon et al, 1995 ; Buss et al, 2007). Nous avons déjà souligné que l'environnement lésionnel était rendu puissamment non permissif pour la croissance axonale par les CSPG de la cicatrice gliale. Des études *in vitro* ont montré qu'un milieu de culture contenant les CSPG de la cicatrice gliale, favorisait la croissance et la fasciculation des neurites en présence de laminine, tandis qu'en présence de laminine seule, les axones apparaissent dispersés. Cela tendrait à montrer que la fasciculation pourrait, dans certaines conditions expérimentales, résulter de l'interaction entre des molécules inhibitrice (les CSPG) et une molécule stimulatrice (la laminine) (Snow et al, 2003). L'hypothèse selon laquelle le NX210 interagirait avec les CSPG de la même manière que les laminines, *via* une interaction avec les $\beta 1$ -intégrines, pourrait être testée par le comarquage de la laminine-1 et de la $\beta 1$ -intégrine. Le marquage des cellules de Schwann et des astrocytes pourrait utilement compléter notre étude mécanistique en précisant la nature de la population cellulaire à l'origine de la laminine.

Les altérations de la gaine de myéline constituent également une cible majeure des thérapies régénératives. Celles résultant de l'impact mécanique du traumatisme initial font l'objet des mesures de prévention primaire. Seules les destructions liées aux modifications métaboliques de la phase secondaire font l'objet de la neuroprotection. Nous avons vu que la destruction des gaines de myéline est corrélée à celle du cytosquelette axonal. Elle prédomine sur la moelle en amont de la lésion et sur les voies descendantes, notamment le tractus corticospinal, épargnant relativement la moelle en aval de la lésion et les cordons postérieurs où la remyélinisation commence précocement dès le 7^{ème} jour chez le rat (Ward et al, 2014). La destruction secondaire des gaines de myéline peut être attribuée à la perte des oligodendrocytes que l'on constate dès la 24^{ème} heure chez le rat (Totoiu et al, 2005). Les oligodendrocytes sont détruits surtout par un mécanisme apoptotique contre lequel on a démontré une action protectrice du NX210. Cette raréfaction de la population oligodendrocytaire explique la présence d'axones démyélinisés qui traversent en pont la cavité lésionnelle et constituent la cible des traitements régénératifs. De nombreux axones peu myélinisés résultent probablement de la démyélinisation des fibres

initialement épargnées par la lésion primaire, ou correspondent à des axones remyélinisés de manière imparfaite en raison des modifications de la matrice extracellulaire. Ces fibres pourraient contribuer à expliquer la récupération partielle des fonctions neurologiques chez certains traumatisés médullaires (Cao et al, 2005 ; Guest et al, 2005).

Des données récentes non encore publiées suggèrent un effet prometteur du NX210 sur la myélinisation. Des expérimentations *in vitro* sur des cultures primaires d'oligodendrocytes montrent en effet que la molécule augmente la survie des oligodendrocytes et favorise la formation d'extensions cytoplasmiques. De plus, le NX210 pourrait directement stimuler la myélinisation en activant la $\beta 1$ -intégrine dont on a montré l'implication dans le processus de myélinisation (Barros et al, 2009). Exprimées par les oligodendrocytes, les $\beta 1$ -intégrines sont indispensables à la formation de la gaine de myéline. Un des ligands physiologiques pourrait être la laminine dont la déficience chez l'homme est à l'origine de troubles de la myélinisation (Vainzof et al, 1995). D'autres études montrent que l'activation de l' $\alpha 6 \beta 1$ -intégrine stimule la survie des oligodendrocytes *in vitro* (Benninger et al, 2006). Les acteurs de la remyélinisation ne sont pas clairement identifiés. Les oligodendrocytes ne sont pas nécessairement les seuls impliqués. Les cellules de Schwann colonisent également la lésion médullaire et reconstituent les gaines de myéline. Elles proviendraient des racines spinales endommagées ou dériveraient des progéniteurs résidents (Zawadzka et al, 2010). Incapables de migrer en territoire sain, leur présence au contact des axones signerait la myélinisation d'axones en croissance ou la remyélinisation d'axones épargnés par la lésion.

Récupération fonctionnelle

Nous avons testé l'efficacité clinique du NX210 sur un modèle de contusion médullaire à la phase aiguë au moyen du NY impactor. Ce choix a été guidé par la reproductibilité du modèle, et parce qu'il semble fournir des lésions proches de celles constatées en traumatologie humaine (Metz et al, 2000 ; Raineteau et al, 2001 ; Dietz et al, 2006). Les critères d'évaluation comprenaient le suivi du poids corporel, des tests réflexes, les open-arena tests et la mesure du score de Basso, Beattie et Bresnahan ou score de BBB (Basso et al, 1996).

Dans notre étude, le poids corporel était précocement et constamment supérieur chez les animaux traités par rapport aux témoins. Il constitue un critère d'évaluation global, systématiquement exploité en comportement animal, pour traduire le bien-être de l'animal, notamment l'absence de douleur et de stress, et sa capacité à se déplacer pour accéder à la nourriture. Les effets du NX210 sur la locomotion évalués en « open-field » comprenaient une légère augmentation de la distance parcourue aux temps intermédiaires et une diminution significative du temps passé dans les cellules centrales de l'arène surtout en fin d'observation par rapport aux témoins. Ces tests évaluent en plus de l'activité motrice, l'état de santé général de l'animal par l'observation de son comportement exploratoire. La pratique de ces tests montre néanmoins l'incidence de biais inévitables sur les résultats, en particulier l'influence du stress, de l'habituation à l'environnement et de l'entraînement. Ils semblent néanmoins suffisamment sensibles pour détecter des modifications neurologiques et les quantifier même lorsque l'état neurologique est profondément altéré (Sedy et al, 1999 ; Metz et al, 2000).

Le NX210 entraîne une amélioration significative de la motricité des membres pelviens mise en évidence par le score de BBB. Cinq animaux traités sur 8 et seulement 1 sur les 8 animaux contrôles atteignent un score de 14 qui signe la capacité de soutenir le poids du corps et la coordination des mouvements entre les membres thoraciques et les membres pelviens. On notera que les faibles différences de scores entre les groupes sont typiques de ces échelles de locomotion qui comme le score de BBB ne sont pas linéaires. Par ailleurs, comme pour les autres échelles d'évaluation des fonctions neurologiques, le score de BBB ne donne qu'une appréciation globale de la fonction médullaire, c'est pourquoi nous l'avons complété par l'étude des réflexes. D'une manière assez classique, les réflexes de placement et d'extension disparaissent les jours suivant le traumatisme, puis donnent une réponse anormale avant de se normaliser progressivement. La revue de la littérature ne donne pas d'indication précise sur la chronologie de cette évolution (Gale et al, 1985; Seki et al, 2002). Le substratum anatomique de ces réflexes n'est pas non plus clairement établi. Le réflexe d'extension a été toutefois corrélé au volume de la lésion médullaire (von Euler et al, 1997). Des expérimentations consistant à pratiquer des lésions à différents niveaux du névraxe tendent à montrer qu'ils ne sont pas des réflexes spinaux. Le réflexe de placement a été décrit sous le contrôle du cortex sensorimoteur du cervelet et du noyau rouge, ce qui signifie que sa restauration après lésion médullaire suppose l'intégrité des tractus

corticospinal et rubrospinal et des afférences extéroceptives (Amassian et al, 1973 ; Forssberg et al, 1974 ; Donnatelle et al, 1977 ; Bradley 1983 ; Metz et al, 2000 ; Seki et al, 2002 ; Roof et al, 2001 ; Sedy et al, 2008). Par conséquent, les meilleurs résultats obtenus par les animaux traités pourraient être corrélés à une meilleure restitution du contrôle supraspinal, notamment par la repousse du faisceau corticospinal que nous avons suspectée plus haut. Cela est d'autant plus envisageable que seul 1% du tractus corticospinal est nécessaire pour restaurer certaines taches motrices volontaires coordonnées chez le rat adulte (Li et al, 1997). Par ailleurs, notre modèle de lésion médullaire par aspiration des cordons dorsaux mettait en évidence la repousse des fibres ascendantes et descendantes. La destruction de la substance grise postérieure et la présence du tube de collagène permettent de supposer que ces fibres ne sont pas des fibres propriospinales, et que par conséquent les fibres ascendantes sont bien des afférences extéroceptives. Enfin, on peut supposer que les fibres descendantes appartiennent au tractus corticospinal car ce sont les seules voies descendantes des cordons postérieurs de la moelle chez le rat (figure 42).

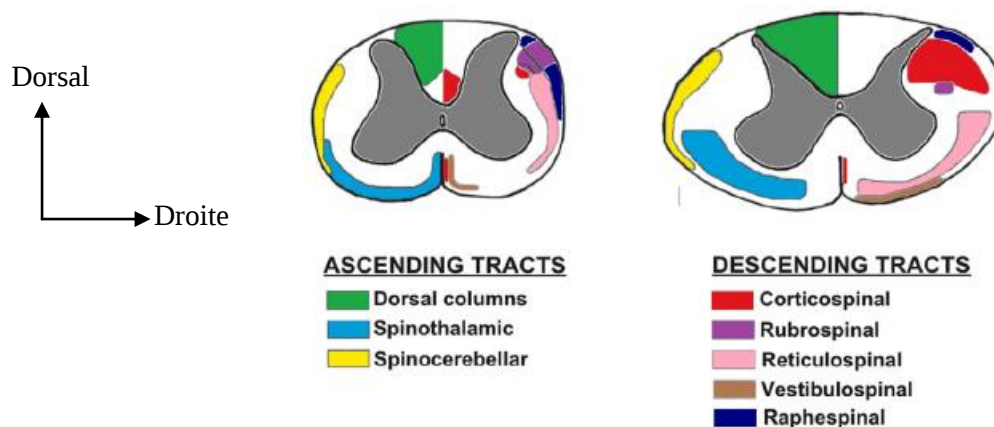


Figure 42. Anatomie comparative des tractus ascendants et descendants de la moelle spinale chez le rat et l'homme. Coupe transversale de la moelle spinale du rat (à gauche) et de l'Homme (à droite). Le seul tractus descendant des faisceaux dorsaux de la moelle spinale du rat est le tractus corticospinal (Watson et al, 2009).

Il n'est cependant pas possible d'éliminer la participation d'un effet neuroprotecteur de la molécule mis en évidence *in vitro*, dans la récupération fonctionnelle des animaux traités. De même, une repousse collatérale peut également contribuer à expliquer l'amélioration

fonctionnelle constatée dans notre modèle de contusion. Un tel phénomène peut en effet se produire à partir de la collerette de substance blanche saine que ce type de modèle laisse en périphérie de la cavité lésionnelle et qui existe également en pathologie humaine (Bareyre et al, 2004). Des repousses collatérales peuvent aussi naître à partir des axones lésés du tractus corticospinal et établir des synapses avec certaines fibres propriospinales qui enjambent le foyer lésionnel pour se connecter avec les motoneurons destinés aux membres pelviens. Il a été établi que ces repousses collatérales, quelle que soit leur origine, contribuent à former localement des néocircuits neuronaux qui participent au rétablissement de la motricité des membres pelviens (Bareyre et al, 2004). Pour faire la part entre un contrôle supraspinal lié à la repousse des fibres longues ou à celle de fibres collatérales, certaines équipes préconisent des protocoles comprenant deux hémisections successives de la moelle thoracique. Lorsque la motricité récupérée après la première hémisection est de nouveau perdue avec paraplégie complète après une deuxième section de l'hémimoelle controlatérale au même niveau, cela signifie que le contrôle supraspinal restitué empruntait la voie de fibres propriospinales cheminant dans l'hémimoelle controlatérale à la première lésion. Une monoplégie homolatérale à la seconde section signifierait au contraire une repousse des voies longues (Courtine et al, 2008).

Les modèles de contusion et de compression médullaires expérimentales indiquent par ailleurs une corrélation significative entre l'étendue des lésions des gaines de myéline et l'importance du déficit neurologique (Noble et al, 1989 ; Fehlings et al, 1995; Basso et al, 1996 ; Gruner et al, 1996). Il est donc possible qu'une part de la récupération des fonctions neurologiques repose sur la remyélinisation par les oligodendrocytes et les cellules de Schwann, des axones épargnés par la lésion, indépendamment de la neuritogenèse et des phénomènes de repousse collatérale.

Le recrutement cellulaire

L'effet du NX210 sur le recrutement cellulaire a été exploré sur un modèle de lésion traumatique du corps calleux. Le choix de ce site anatomique a été guidé par la vulnérabilité du corps calleux en pathologie traumatique chez l'homme et par la facilité technique de réaliser une section du corps calleux en conditions stéréotaxiques. La réalisation d'une lésion à proximité de la zone subventriculaire avait pour objectif d'explorer l'activation de la prolifération cellulaire dans cette niche à cellules souches et la migration cellulaire jusqu'au site lésionnel.

D'après les résultats préliminaires dont nous disposons, l'absence de cellule marquée au NeuN tend à démontrer l'absence de production de nouveaux neurones à J 14. Le marquage au MBP montre des débris de myéline dispersés dans le plan des fibres du corps calleux à distance du foyer lésionnel. L'existence de ces débris de myéline à distance de la lésion peut s'expliquer par des phénomènes de dégénérescence wallérienne ou par les mécanismes d'excitotoxicité de la lésion secondaire.

L'existence de cellules marquées au GFAP et au NG2 sur le site lésionnel témoigne d'un recrutement astrocytaire et oligodendrocytaire. Nous avons vu que la réaction astrocytaire élabore une cicatrice astrogliale périlésionnelle qui constitue une barrière physique et métabolique à la repousse neuritique. Son rôle est également bénéfique car elle restitue la BHE (Faulkner et al, 2004) et rétablit l'équilibre ionique (Herrmann et al, 2008). Certains types d'astrocytes favoriseraient même la repousse axonale (Faulkner et al, 2004). Ce recrutement de cellules GFAP nécessite des compléments d'étude afin de préciser son incidence sur la régénération.

Le marquage des cellules au NG2, plus intense dans le lot NX210 que dans le lot véhicule, est intéressant car il identifie une population de progéniteurs qui se différencient principalement en cellules myélinisantes, les oligodendrocytes (Zhu et al, 2008). Les cellules NG2 constituent une population cellulaire particulière. Chez l'adulte, elles se répartissent uniformément dans la substance blanche et la substance grise et constituent la principale population de cellules prolifératives du SNC en dehors des niches à cellules souches (Dawson et al, 2003). L'origine des cellules marquées au NG2 sur le site lésionnel peut donc être discutée. Il n'est pour l'instant pas possible de déterminer s'il s'agit de cellules résidentes et/ou de cellules recrutées à partir de la ZSV. L'existence de cellules NG2 sur le trajet de migration entre la ZSV et la lésion montre qu'une part au moins de ces cellules provient d'un recrutement à partir de la ZSV. Nous avons vu que les neurotransmetteurs libérés par l'activité neuronale stimulent la production de cellules NG2 *via* des connexions synaptiques entre le neurone et l'OPC (Bergles et al, 2010). Par la sécrétion de PDGF, l'activité neuronale stimule également la prolifération des OPC et probablement leur différenciation en oligodendrocytes myélinisants dans la substance blanche (Noble et al, 1988). Cet effet est plus discuté dans la substance grise (Hillet al, 2014). Le comarquage du NG2 et du PDGF pourrait permettre d'étayer cette hypothèse.

Sous forme libre, la molécule NG2 stimule la prolifération et la migration des OPC (Fukushi et al, 2004) en formant des complexes moléculaires avec le récepteur au FGF-2 et l' $\alpha 3 \beta 1$ intégrine (Fukushi et al, 2004). Les cellules NG2⁺ et la molécule NG2, sont impliquées dans d'autres aspects de la régénération comme la croissance de l'axone (Yang et al, 2006). La molécule NG2 inhibe la croissance neuritique, comme toutes les CSPG (Ughrin et al, 2003).

L'endothélium des capillaires de la ZSV joue un rôle majeur dans le destin des cellules souches neurales. Il oriente leur différenciation par la sécrétion de facteurs neurotrophiques selon la nature de l'environnement cellulaire (Gage et al, 2000 ; Noctor et al, 2002 ; Shen et al, 2004 ; Wu et al, 2005). Certaines cellules souches sont amarrées à la laminine de la lame basale de l'endothélium par les $\beta 1$ -intégrines dont le blocage détache les cellules des vaisseaux et augmente leurs capacités prolifératives (Shen et al, 2008). Le traitement par le NX210 combiné au marquage et au blocage des $\beta 1$ -intégrines permettrait de tester l'hypothèse selon laquelle le NX210 recruterait les cellules souches en modulant leur ancrage vasculaire selon un mécanisme médié par les $\beta 1$ -intégrines.

La fonction physiologique de ces niches à cellules souches reste débattue. Ils seraient impliqués dans la plasticité neuronale (Kirsche et al, 1983). La ZSV est une source de progéniteurs neuraux (Weissman et al, 2014) dont la participation dans la réparation reste controversée chez l'homme. Deux études nécropsiques pédiatriques montrent certes des images de prolifération cellulaire (Haynes et al, 2011), mais sans apporter la preuve d'un recrutement cellulaire sur le site lésionnel (Taylor et al, 2013).

Dans la moelle spinale, ce sont les cellules épendymaires qui constituent chez l'adulte une source de cellules souches (Johansson et al, 1999). Après section des cordons dorsaux de la moelle spinale chez la souris, des cellules épendymaires migrent dans le site lésionnel où elles se différencient en astrocytes. Ces astrocytes élaborent le tissu cicatriciel et produisent des facteurs neurotrophiques comme l'IGF-1 qui réduisent les pertes neuronales en inhibant l'apoptose caspase-3 dépendante (Sabelstrom et al, 2013). Nous ne sommes pas en mesure de préciser leur rôle précis dans la réparation médullaire chez l'homme. Des études d'immunohistochimie devront être réalisées après lésion médullaire pour étudier le rôle du recrutement cellulaire dans ce contexte. Il n'est en effet pas certain que les résultats obtenus à l'étage encéphalique soient

extrapolables à l'étage spinal, car le canal central de la moelle qui constitue une source de cellules souches disparaît progressivement au cours de la vie chez l'homme (Yasui et al, 1999).

Les modèles animaux

Les modèles de traumatismes cérébraux et médullaires les plus couramment utilisés en recherche préclinique restent les modèles rongeurs pour des raisons de coût et de reproductibilité. L'extrapolation à l'homme des constatations physiopathologiques obtenues doit être néanmoins pondérée par les différences anatomiques et biomécaniques de l'enceinte crâniospinale et du névraxe entre les différents modèles.

L'étude de la réparation de la substance blanche utilise essentiellement des modèles médullaires. Cela tient à plusieurs raisons. Les lésions de la moelle spinale affectent la substance blanche d'une manière prépondérante. Par conséquent, les troubles neurologiques et le bénéfice des molécules testées sont facilement corrélés à l'intégrité des fibres qui constituent leur support anatomique. Les modèles de lésions médullaires, standardisés et reproductibles, permettent des évaluations cliniques semi-quantitatives à l'aide d'échelles validées et des explorations électrophysiologiques (Fitzgerald et al, 2007). Les modèles de traumatismes cérébraux créent des lésions mixtes affectant le cortex et les noyaux gris dont l'implication clinique est difficile à dissocier de celle de la substance blanche. Par ailleurs, la correspondance entre les retentissements cognitifs des lésions cérébrales chez l'homme et les troubles comportementaux des modèles animaux posent d'évidentes questions de transposabilité notamment à partir d'espèces lissencéphales comme les rongeurs, qui sont les plus utilisées (Cenci et al, 2002 ; Povlishock et al, 1994). Ces modèles sont néanmoins indispensables pour étudier la physiopathologie lésionnelle et proposer des cibles thérapeutiques potentielles (Saatman et al, 2008).

La gaine de myéline est sensible à de multiples facteurs environnementaux qui se répercutent sur la qualité de la myélinisation. Ils constituent une source de discordance dans la transposition des résultats à l'homme. On a déjà évoqué l'activité neuronale et l'imprégnation hormonale. Les modifications de la substance blanche liées à l'âge révèlent des mécanismes métaboliques distincts. On constate chez l'homme une dégénérescence progressive de la substance blanche avec une raréfaction de la myéline et des oligodendrocytes. Ce phénomène

affecte surtout les fibres associatives et notamment la partie antérieure du corps calleux. Chez le singe Rhésus, on observe également cet appauvrissement de la substance blanche au cours de la sénescence mais on observe au contraire une augmentation du nombre d'oligodendrocytes (Wisco et al, 2008). Chez les rongeurs utilisés en laboratoire, la substance blanche s'enrichit constamment en myéline et la proportion d'axones myélinisés dans le corps calleux augmente tout au cours de la vie (Nunez et al, 2000).

Ce que nous apportent les modèles animaux de régénération spontanée

Les exemples de régénération spontanée chez les vertébrés inférieurs nous aident à mieux comprendre les obstacles à la réparation chez l'homme. Nous avons vu que la substance blanche remanie en permanence son organisation structurale dans des situations physiologiques. Des expériences sensorielles suscitent continuellement la destruction et la formation de connexions synaptiques pour former de nouveaux circuits au cours des processus mnésiques et d'apprentissage (Zito et al, 2002 ; Zuo et al, 2005). Pourquoi cette plasticité est-elle mise en échec dans la neuroréparation ? La conservation chez les anamniotes adultes d'une capacité neurorégénératrice apparaît liée à un microenvironnement neuronal spécifique dont certaines caractéristiques ont été bien identifiées chez le zebrafish comme l'absence de surexpression des CSPG (Becker et al, 2002). Cette régénération de la substance blanche restitue la fonction (Dias et al, 2012, Van Raamsdonk et al, 1998), par la croissance axonale et non par la mise en jeu des centres générateurs de mouvements (Becker et al, 1997). Les cellules épendymogliales guident la croissance des axones à travers la cavité lésionnelle (Becker et al, 1997). Elles ne génèrent que des progéniteurs neuraux. Il n'y a pas d'astrocytes donc pas de cicatrice gliale pour inhiber la repousse axonale. Les inhibiteurs associés à la myéline comme Nogo ne montrent aucune activité inhibitrice sur le cône de croissance (Abdeselem et al, 2009). Concernant la myélinisation, les oligodendrocytes du zebrafish expriment les mêmes molécules de reconnaissance et de croissance axonale que les cellules de Schwann des mammifères (Jeserich et al, 1990 ; Bernhardt et al, 1996, Schweitzer et al, 2003). La différence réside donc dans le système de signalisation cellulaire.

Chez les urodèles, la moelle et le cerveau gardent la capacité de se régénérer à l'âge adulte. La transformation épithéliomésenchymateuse des épendymocytes se substitue à la réaction astrogliale des mammifères, et pourrait correspondre à la conservation par l'épendyme

des caractéristiques embryonnaires du neuroépithélium. La structure de la moelle spinale des amphibiens conserve également une disposition primitive, les épendymocytes gardant un aspect de glie radiaire (Schonbach et al, 1969 ; Roots et al, 1986 ; Holder et al, 1990). Lors d'agression tissulaires, les cellules épendymaires protégeraient les neurones et les oligodendrocytes de la cytotoxicité induite par le calcium en captant le calcium extracellulaire (Chernoff et al, 2003). Chez les mammifères, les astrocytes propagent l'influx calcique aux astrocytes et aux neurones voisins, diffusant de proche en proche la cytotoxicité liée au Ca^{2+} (Nedergaard et al, 1994).

Les indications potentielles

La phase aiguë de la lésion médullaire ou cérébrale constitue la cible privilégiée mais non exclusive de la neuroprotection et de la neuroréparation. La fenêtre thérapeutique reste à définir. L'administration lors de l'abord chirurgical de lésions instables ou compressives est l'option retenue par l'étude Céthrine. Elle ne permet pas de traiter les lésions de contusion cervicale non opérées, comme les décompensations de myélopathie cervicarthrosique. Le mode d'administration intrathécal ou topique, le nombre administrations, unique ou répétée, doivent également être précisés.

Les phases subaiguë et chronique constituent également des indications potentielles des thérapies neuroprotectrices et neurorégénératrices. Un traumatisme cérébral unique même de gravité modérée génère des lésions tardives de la substance blanche (Molgaard et al, 1990, Johnson et al, 2013) associant des remaniements de la myéline (Corsellis et al, 1973, Omalu et al, 2011, McKee et al, 2011) et des dégénérescences wallériennes au sein de réactions astrogliales persistantes. La détersion des débris de myéline par les cellules microgliales et les macrophages activés se poursuit plusieurs années après le traumatisme (Adams et al, 2000).

La phase chronique de la lésion médullaire définie cliniquement par la stagnation des signes neurologiques, peut évoluer sur le plan histologique vers une myélomalacie avec la constitution d'une formation kystique centromédullaire. Des modèles de contusion médullaire chez le rongeur et le primate montrent la persistance de pertes neuronales et de remaniements dégénératifs plusieurs mois après le traumatisme (Huang et al, 2007, Crowe et al, 1997; Liu et al, 1997; Grossman et al, 2001). Ces lésions évolutives de la substance blanche et les pertes

neuronales différées justifient donc le développement de traitements neuroprotecteurs même à la phase chronique tardive du traumatisme.

Conclusions et perspectives

Ce travail expérimental, issu d'une collaboration entre un laboratoire académique, l'IGCNC EA7282, et une entreprise de biotechnologie, Neuronax, a permis de mettre en évidence l'intérêt d'un peptide dérivé d'une protéine TSR dans la neuroprotection et la neurorégénération de la substance blanche. Le NX210 est né d'une thématique de recherche fondamentale innovante portant sur un morphogène impliqué dans la mise en place des fibres commissurales chez l'embryon. Sa séquence a été conçue à partir d'un des domaines biologiquement actifs de sa biomolécule mère, puis testée chez l'adulte dans l'optique de réparer les lésions de la substance blanche en clinique.

In vitro, nous avons montré que le NX210 protège contre le stress oxydatif et l'apoptose. Il stimule la synaptogenèse, la croissance axonale et la fasciculation. Deux modèles de lésions médullaires nous ont apporté la preuve de concept chez l'animal : la molécule favorise la reconstitution de la substance blanche médullaire en stimulant la repousse axonale selon une organisation fasciculaire. Cette restructuration anatomique supporte la restauration fonctionnelle.

Il reste à mieux préciser le mécanisme d'action de la molécule qui peut être différent selon l'effet biologique considéré. Ainsi, nous testons actuellement l'hypothèse selon laquelle l'activité neuroprotectrice contre le stress oxydatif s'exerce par le biais d'une voie métabolique spécifique ou par effet scavenger. Cette précision est importante sur le plan thérapeutique, car l'existence d'un effet scavenger pourrait nous conduire à envisager un traitement combinant le NX210 à d'autres molécules réductrices de type Glutathion. Le mécanisme de protection contre l'apoptose doit également être approfondi pour savoir notamment si la molécule active un récepteur membranaire ou si elle pénètre dans la cellule pour interagir avec les voies de signalisation. Nous devons préciser le mode d'action de la molécule sur les OPC et la myélinogenèse et confirmer l'implication probable des β 1-intégrines. L'étude immunohistochimique à l'étage encéphalique montre que la molécule modifie le recrutement cellulaire sur le site lésionnel. Nous devons vérifier que ce mécanisme d'action existe dans le contexte de la lésion médullaire.

Dans le domaine de la lésion médullaire traumatique, des expérimentations complémentaires nous permettront de préciser la fenêtre optimale d'administration. Les études de toxicologie, déjà réalisées chez le rongeur et le chien seront complétées par les études de tolérance et de pharmacocinétique chez l'homme. Un essai clinique de phase I/II devrait ainsi être lancé en 2015 dans le cadre d'une étude prospective multicentrique.

D'autres cibles thérapeutiques potentielles seront précisées sur des modèles expérimentaux, notamment les lésions de la substance blanche cérébrale d'origine vasculaire ou dégénérative. Le contexte de l'hydrocéphalie chronique de l'adulte peut constituer une thématique intéressante en raison de sa fréquence et de la réversibilité de son tableau clinique après chirurgie.

Nous avons vu comment les modèles animaux de régénération fonctionnelle spontanée de la moelle nous aident à mieux comprendre les mécanismes inhibant la régénération chez l'homme. Un zebrafish mutant pour la SCO-spondine est en cours de mise au point dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, pour préciser la participation de cette molécule dans la réparation de la moelle spinale lorsqu'elle est opérationnelle.

Annexe

Sakka L, Delétage N, Lalloué F, Duval A, Chazal J, Lemaire JJ, Meiniel A, Monnerie H, Gobron S. SCO-spondin derived peptide NX210 induces neuroprotection *in vitro* and promotes fiber regrowth and functional recovery after spinal cord injury. PLoS One. 2014 Mar 25;9(3):e93179. doi: 10.1371/journal.pone.0093179.

P. 140-147 : l'article cité en page précédente, qui a été extrait du fichier, est accessible en libre accès en ligne :

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0093179>

Références bibliographiques

1. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006, 7: 41–53.
2. Abdesselem H, Shypitsyna A, Solis GP, Bodrikov V, Stuermer CA. No Nogo66- and NgR-mediated inhibition of regenerating axons in the zebrafish optic nerve. *J Neurosci* 2009, 29: 15489-15498.
3. Adams JC, Tucker RP. The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: Diverse proteins with related roles in neuronal development. *Dev Dyn* 2000, 218: 280–299.
4. Adams JH, D.I.Graham D.I. Jennett. The structural basis of moderate disability after traumatic brain damage, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001, 71(4): 521–524.
5. Adams JH, Doyle D, Ford I, et al. Diffuse axonal injury in head injury: definition, diagnosis and grading. *Histopathology* 1989, 15: 49–59.
6. Adams RH, Betz H, Puschel AW. A novel class of murine semaphorins with homology to thrombospondin is differentially expressed during early embryogenesis. *Mech Dev* 1996, 57: 33–45.
7. Ahn S, Joyner AL. In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* 2005, 437: 894–897.
8. Ai X, Kitazawa T, Do AT, Kusche-Gullberg M, Labosky PA, Emerson CP Jr. SULF1 and SULF2 regulate heparan sulfate-mediated GDNF signaling for esophageal innervation, *Development* 2007, 134: 3327–3338.
9. Aizawa H, Wakatsuki S, Ishii A, Moriyama K, Sasaki Y, Ohashi K, Sekine-Aizawa Y, Sehara-Fujisawa A, Mizuno K, Goshima Y, Yahara I. Phosphorylation of cofilin by LIM kinase is necessary for Sema 3a-induced growth cone collapse. *Nat Neurosci* 2001, 4: 367–373.
10. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 1965, 124: 319–335.
11. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 1969, 137: 433–458.
12. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2001, 2: 287–293.
13. Amassian VE, Ross R. Development in the kitten of control of contact placing by sensorimotor cortex. *J Physiol* 1973, 230: 55–56.

14. Anderson MJ, Choy CY, Waxman SG. Self-organization of ependyma in regenerating teleost spinal cord: Evidence from serial section reconstructions. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1986, 96: 1-18.
15. Andriessen TM, Jacobs B, Vos PE. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. *J Cell Mol Med.* 2010, 14(10): 2381-92.
16. Apostolova I, Irintchev A, Schachner M. Tenascin-R restricts posttraumatic remodeling of motoneuron innervation and functional recovery after spinal cord injury in adult mice. *J Neurosci* 2006, 26:7849-7859.
17. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med.* 2002, 8(9):963-70.
18. Arvin KL, Han BH, Du Y, Lin SZ, Paul SM, Holtzman DM. Minocycline markedly protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann Neurol* 2002, 52: 54–61.
19. Atwal JK, Pinkston-Gosse J, Syken J, Stawicki S, Wu Y, Shatz C, Tessier-Lavigne M. 2008. PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration. *Science* 322: 967–970.
20. Bains M, Hall ED. Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1822(5):675-84.
21. Bamdad M, Volle D, Dastugue B, Meiniel A. A $\alpha 1\beta 1$ -integrin is an essential signal for neurite outgrowth induced by thrombospondin type 1 repeats of SCO-spondin. *Cell Tissue Res* 2004, 315: 15–25.
22. Bao F, Chen Y, Schneider KA, Weaver LC. An integrin inhibiting molecule decreases oxidative damage and improves neurological function after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2008, 214: 160–7.
23. Bao F, Liu D. Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptotic cell death and activates caspase-3. *Neuroscience* 2003, 116:59–70.
24. Baptiste DC, Fehlings MG: Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. *J Neurotrauma* 23:318–334, 2006.
25. Bareyre FM, Kerschensteiner M, Raineteau O, Mettenleiter TC, Weinmann O, et al. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nat Neurosci* 2004, 7: 269–77.
26. Barnea A, Nottebohm F. Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 11217–11221.

27. Barritt AW, Davies M, Marchand F, et al. Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. *J Neurosci* 2006, 26: 10856–10867.
28. Barros CS, Nguyen T, Spencer KS, Nishiyama A, Colognato H, et al. β 1 integrins are required for normal CNS myelination and promote AKT dependent myelin outgrowth. *Development* 2009, 136: 2717–24.
29. Bartsch S, Bartsch U, Dorries U, Faissner A, Weller A, Eklom P, Schachner M. Expression of tenascin in the developing and adult cerebellar cortex. *J Neurosci* 1992, 12: 736–749.
30. Bartsch U. Myelination and axonal regeneration in the central nervous system of mice deficient in the myelin associated glycoprotein. *J Neurocytol* 1996, 25:303–313.
31. Bartus K, James ND, Bosch KD, Bradbury EJ. Chondroitin sulphate proteoglycans: key modulators of spinal cord and brain plasticity. *Exp Neurol*. 2012; 235(1): 5-17.
32. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol* 1996, 139:244–256.
33. Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, et al. Cell death in models of spinal cord injury. *Prog Brain Res* 2002, 137: 37–47.
34. Becker CG, Becker T, Meyer RL, Schachner M. Tenascin-R inhibits the growth of optic fibers in vitro but is rapidly eliminated during nerve regeneration in the salamander *Pleurodeles waltl*. *J Neurosci* 1999, 19: 813–827.
35. Becker CG, Becker T: Repellent guidance of regenerating optic axons by chondroitin sulfate glycosaminoglycans in zebrafish. *J Neurosci* 2002, 22: 842-853.
36. Becker CG, Lieberoth BC, Morellini F, Feldner J, Becker T, Schachner M: L1.1 is involved in spinal cord regeneration in adult zebrafish. *J Neurosci* 2004, 24:7837-7842.
37. Becker CG, Meyer RL, Becker T: Gradients of ephrin-A2 and ephrin-A5b mRNA during retinotopic regeneration of the optic projection in adult zebrafish. *J Comp Neurol* 2000, 427:469-483.
38. Becker T, Wullimann MF, Becker CG, Bernhardt RR, Schachner M. Axonal regrowth after spinal cord transection in adult zebrafish. *J Comp Neurol* 1997, 377: 577-595.
39. Beer R, Franz G, Schöpf M, et al. Expression of Fas and Fas ligand after experimental traumatic brain injury in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000, 20: 669–677.
40. Belvindrah R, Hankel S, Walker J, Patton BL, Muller U. 2007. β 1 integrins control the formation of cell chains in the adult rostral migratory stream. *J Neurosci* 27: 2704–2717.

41. Benraiss A, Arsanto JP, Coulon J, Thouveny Y. Neural crest-like cells originate from the spinal cord during tail regeneration in adult amphibian urodeles. *Dev Dyn* 1997, 209:15–28.
42. BensonMD, Romero MI, Lush ME, Lu QR, Henkemeyer M, Parada LF. Ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci* 2005, 102: 10694–10699.
43. Bergles DE, Jabs R, Steinhauser C. Neuron–glia synapses in the brain. *Brain Res. Rev.* 2010, 63, 130–137.
44. Bergsneider M, Hovda DA, Shalmon E, Kelly DF, Vespa PM, Martin NA, Phelps ME, McArthur DL, Caron MJ, Kraus JF, Becker DP. Cerebral hyperglycolysis following severe traumatic brain injury in humans: a positron emission tomography study. *J Neurosurg* 1997, 86:241–251.
45. Bigler ED, Anderson CV, Blatter DD. Temporal lobe morphology in normal aging and traumatic brain injury, *AJNR Am J Neuroradiol* 2002, 23(2): 255–266.
46. Bigler ED, Anterior and middle cranial fossa in traumatic brain injury: relevant neuroanatomy and neuropathology in the study of neuropsychological outcome, *Neuropsychology* 2007, 21(5): 515–531
47. Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, Decarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Bioi. Med.* 1993, 4: 197-250.
48. Biro S, Yu ZX, Fu YM, Smale G, Sasse J, Sanchez J, Ferrans VJ, Casscells W. Expression and subcellular distribution of basic fibroblast growth factor are regulated during migration of endothelial cells. *Circ. Res.* 1994, 74: 485–494.
49. Blake SM, Strasser V, Andrade N, Duit S, Hofbauer R, Schneider WJ, Nimpf J. Thrombospondin-1 binds to ApoER2 and VLDL receptor and functions in postnatal neuronal migration. *Embo J* 2008, 27: 3069–3080.
50. Blakemore WF, Crang AJ. The use of cultured autologous Schwann cells to remyelinate areas of persistent demyelination in the central nervous system. *J. Neurol. Sci.* 1985, 70: 207–223.
51. Blesch A, Tuszynski MH. Spinal cord injury: plasticity, regeneration and the challenge of translational drug development. *Trends Neurosci* 2009; 32: 41-7.
52. Bomstein Y, Marder JB, Vitner K, Smirnov I, Lisaey G, Butovsky O, Fulga V, Yoles E. Features of skin-coincubated macrophages that promote recovery from spinal cord injury. *J Neuroimmunol* 2003; 142(1–2):10–16
53. Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, et al: Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 2002, 416: 636–640.
54. Bradford D, Cole SJ, Cooper HM. Netrin-1: Diversity in development. *Int J Biochem Cell Biol* 2009, 41: 487–493.

55. Bradley NS, Smith JL, Villablanca JR. Absence of hind limb tactile placing in spinal cats and kittens. *Exp Neurol* 1983, 82: 73–88.
56. Brady ST. et al. Formation of compact myelin is required for maturation of the axonal cytoskeleton. *J. Neurosci.* 1999, 19: 7278–7288.
57. Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, Dai HN, Gao D, Schwab ME. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature.* 1995; 378(6556): 498–501.
58. Bregman BS, McAtee M, Dai HN, Kuhn PL. Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat. *Exp. Neurol.* 1997; 148: 475–494.
59. Bresnahan JC, Beattie MS, Todd FD III, Noyes DH. A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impaction device. *Exp. Neurol.* 1987, 95: 548–570
60. Brinkmann BG. et al. Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron* 2008, 59: 581–595.
61. Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol.* 2003; 467(1): 1–10.
62. Brundula V, Rewcastle NB, Metz LM, Bernard CC, Yong VW. Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain* 2002; 125: 1297–308.
63. Bullock R, Zauner A, Myseros JS, et al. Evidence for prolonged release of excitatory amino acids in severe human head trauma. Relationship to clinical events. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 765: 290–7.
64. Bullock R, Zauner A, Woodward JJ, et al. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. *J Neurosurg.* 1998, 89: 507–18.
65. Bulow HE, Hobert O. Differential sulfations and epimerization define heparan sulfate specificity in nervous system development, *Neuron* 2004, 41: 723–736.
66. Bundesen LQ, Scheel TA, Bregman BS, Kromer LF. Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte-meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adults rats. *J Neurosci* 2003, 27: 7789–7800.
67. Bunge RP, Puckett WR, Becerra JL, et al: Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. *Adv Neurol* 1993, 59: 75–89.
68. Busch SA, Silver J. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 2007, 17(1): 120–127.

69. Buss A, Pech K, Kakulas BA, Martin D, Schoenen J, et al. Growth modulating molecules are associated with invading Schwann cells and not astrocytes in human traumatic spinal cord injury. *Brain* 2007, 130: 940–53.
70. BATTERY PC, Ffrench-Constant C. Laminin-2/integrin interactions enhance myelin membrane formation by oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 1999, 14(3): 199–212.
71. Byrnes KR, Loane DJ, Stoica BA, Zhang J, Faden AI. Delayed mGluR5 activation limits neuroinflammation and neurodegeneration after TBI. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 43.
72. Cai D. et al. Neuronal cyclic amp controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J. Neurosci.* 2001, 21: 4731–4739.
73. Calof AL, Reichardt LF. Response of purified chick motoneurons to myotube conditioned medium: Laminin is essential for the substratum-binding, neurite outgrowth-promoting activity. *Neurosci Lett* 1985, 59: 183–189.
74. Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 1993, 56: 337–344.
75. Campos LS, Leone DP, Relvas JB, Brakebusch C, Fassler R, Suter U, ffrench-Constant C. $\beta 1$ integrins activate a MAPK signaling pathway in neural stem cells that contributes to their maintenance. *Development* 2004, 131: 3433–3444.
76. Cao Q-l, Zhang YP, Howard RM, Walters WM, Tsoulfas P, Whittemore SR. Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. *Exp. Neurol.* 2001; 167: 48–58.
77. Cao Q, Zhang YP, Iannotti C, DeVries WH, Xu XM, et al. Functional and electrophysiological changes after graded traumatic spinal cord injury in adult rat. *Exp Neurol* 2005, 191: S3–S16.
78. Carmichael ST. Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: making waves. *Ann Neurol.* 2006, 59(5):735–42.
79. Caroni P, Schwab ME. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1988, 1: 85–96.
80. Carson MJ, Behringer RR, Brinster RL, McMorris FA. Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice. *Neuron* 1993, 10: 729–740.
81. Casha S, Yu WR, Fehlings MG. FAS deficiency reduces apoptosis, spares axons and improves function after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2005, 196:390–400.

82. Casha S, Yu WR, Fehlings MG. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience* 2001, 103:203–218.
83. Casha S, Zygun D, McGowan MD, Bains I, Yong VW, Hurlbert RJ. Results of a phase II placebo-controlled randomized trial of minocycline in acute spinal cord injury. *Brain*. 2012, 135(Pt 4):1224-36.
84. Caubit X, Arsanto JP, Figarella-Branger D, Thouveny Y. Expression of polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-N-CAM) in developing, adult and regenerating caudal spinal cord of the urodele amphibians. *Int. J. Dev. Biol.* 1993, 37: 327-336.
85. Caubit X, Riou JF, Coulon J, Arsanto JP, Benraiss A, Boucaut JC, Thouveny Y. Tenascin expression in developing, adult and regenerating caudal spinal cord in the urodele amphibians. *Int. J. Dev. Biol.* 1994, 38: 661-672.
86. Celio MR, Blumcke I. Perineuronal nets — a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 1994, 19: 128–145.
87. Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci* 2002, 3:574–579.
88. Chan SS, Zheng H, Su MW, Wilk R, Killeen MT, Hedgecock EM, Culotti JG. UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. *Cell* 1996, 87:187–195.
89. Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 2000, 403: 434-9.
90. Chen XH, Johnson VE, Uryu K, Trojanowski JQ, Smith DH. A lack of amyloid β plaques despite persistent accumulation of amyloid β in axons of long-term survivors of traumatic brain injury. *Brain Pathol.* 2009, 19: 214–223.
91. Chen ZJ, Negra M, Levine A, Ughrin Y, Levine JM. Oligodendrocyte precursor cells: reactive cells that inhibit axon growth and regeneration. *J Neurocytol* 2002; 31: 481–95.
92. Chen ZL, Haegeli V, Yu H, Strickland S. Cortical deficiency of laminin gamma1 impairs the AKT/GSK-3b signaling pathway and leads to defects in neurite outgrowth and neuronal migration. *Dev Biol* 2009, 327: 158–168.
93. Chen ZL, Haegeli V, Yu H, Strickland S. Cortical deficiency of laminin gamma1 impairs the AKT/GSK-3b signaling pathway and leads to defects in neurite outgrowth and neuronal migration. *Dev Biol* 2009, 327: 158–168.
94. Chernoff EA. Spinal cord regeneration: a phenomenon unique to urodeles? *Int J Dev Biol* 1996, 40: 823–31.

95. Chernoff EAG, O'Hara CM, Bauerle D, Bowling M. Matrix metalloproteinase production in regenerating axolotl spinal cord. *Wound Repair Regen* 2000, 8: 282–291.
96. Chinnock P, Roberts I. Gangliosides for acute spinal cord injury. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; 2: CD004444
97. Choi C, Park JY, Lee J, et al. Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF- α , or IFN- γ . *J Immunol* 1999, 162: 1889–1895.
98. Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA. Thrombospondins are astrocyte secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 2005, 120: 421–433.
99. Clearwaters KP. Regeneration of the spinal cord of the chick. *J Comp Neurol* 1954, 101: 317–329.
100. Colognato H, Baron W, Avellana-Adalid V, Relvas JB, A.B.-V. Evercooren E. Georges-Labouesse C. Ffrench-Constant. CNS integrins switch growth factor signaling to promote target-dependent survival *Nat Cell Biol* 2002, 4: 833–841
101. Corotto FS, Henegar JR, Maruniak JA Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neuroscience* 1994, 61: 739–744
102. Corsellis JA, Bruton CJ, Freeman-Browne D. The aftermath of boxing. *Psychol. Med.* 1973, 3: 270–303.
103. Courtine G, Song B, Roy RR, Zhong H, Herrmann JE, et al. Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nat Med* 2008, 14: 69–74.
104. Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, et al: Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med* 1997, 3:73–76.
105. D'Arcangelo G, Homayouni R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T. Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* 1999, 24: 471–479.
106. Danesin CE, Agius N, Escalas, et al., Ventral neural progenitors switch toward an oligodendroglial fate in response to increased Sonic hedgehog (Shh) activity: involvement of Sulfatase 1 in modulating Shh signaling in the ventral spinal cord, *J. Neurosci.* 2006, 26: 5037–5048.
107. David S, Aguayo AJ. Axonal elongation into peripheral nervous system «bridges» after central nervous system injury in adult rats. *Science* 1981, 214: 931-3.

108. Davies SJ, Fitch MT, Memberg SP, Hall AK, Raisman G, Silver J. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature*. 1997, 390: 680-3.
109. Davies SJ, Goucher DR, Doller C, Silver J. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci*. 1999, 19(14): 5810-22.
110. Dawson MR, Polito A, Levine JM, Reynolds R. NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci*. 2003; 24(2): 476-88.
111. DeBellard ME, Tang S, Mukhopadhyay G, Shen YJ, Filbin MT. Myelin-associated glycoprotein inhibits axonal regeneration from a variety of neurons via interaction with a sialoglycoprotein. *Mol. Cell. Neurosci*. 1996, 7: 89–101.
112. Deckner M, Lindholm T, Cullheim S, Risling M. Differential expression of tenascin-C, tenascin-R, tenascin/J1, and tenascin-X in spinal cord scar tissue and in the olfactory system. *Exp Neurol* 2000, 166: 350-362.
113. Dempsey RJ, Raghavendra Rao VL. Cytidinediphosphocholine treatment to decrease traumatic brain injury-induced hippocampal neuronal death, cortical contusion volume, and neurological dysfunction in rats. *J. Neurosurg*. 2003, 98: 867–873.
114. Dias TB, Yang YJ, Ogai K, Becker T, Becker CG: Notch signaling controls generation of motor neurons in the lesioned spinal cord of adult zebrafish. *J Neurosci* 2012, 32: 3245-3252.
115. Dietz V, Curt A. Neurological aspects of spinal-cord repair: promises and challenges. *Lancet Neurol* 2006, 5: 688–94.
116. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999, 97: 703–716.
117. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 1997, 17: 5046–5061.
118. Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat. Neurosci*. 2003, 6: 1127–1134.
119. Donatelle JM. Growth of the corticospinal tract and the development of placing reactions in the postnatal rat. *J Comp Neurol* 1977, 175: 207–232.
120. Donnelly DJ, Popovich PG. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2008, 209: 378–388.
121. Dontchev VD, Letourneau PC. Nerve growth factor and semaphorin 3A signaling pathways interact in regulating sensory neuronal growth cone motility. *J. Neurosci*. 2002, 22:6659–69

122. Drago J, Nurcombe V, Bartlett PF. Laminin through its long arm E8 fragment promotes the proliferation and differentiation of murine neuroepithelial cells in vitro. *Exp Cell Res* 1991, 192: 256–265.
123. Duchossoy Y, Kassar-Duchossoy L, Orsal D, Stettler O, Horvat JC. Reinnervation of the biceps brachii muscle following cotransplantation of fetal spinal cord and autologous peripheral nerve into the injured cervical spinal cord of the adult rat. *Exp Neurol* 2001, 167: 329–40.
124. Dulabon L, Olson EC, Taglienti MG, Eisenhuth S, McGrath B, Walsh CA, Kreidberg JA, Anton ES. Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 2000, 27: 33–44.
125. Erickson AC, Couchman JR. Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem* 2000, 48: 1291–1306.
126. Eroglu C, Allen NJ, Susman MW, O'Rourke NA, Park CY et al. Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell*. 2009; 139(2):380-92.
127. Ertel W, Keel M, Stocker R, et al. Detectable concentrations of Fas ligand in cerebrospinal fluid after severe head injury. *J Neuroimmunol* 1997; 80: 93–96.
128. Ertürk A, Hellal F, Enes J, Bradke F. Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration. *J Neurosci*. 2007; 27(34):9169-80.
129. Estivill-Torres G, Vitalis T, Fernandez-Llebrez P, Price DJ. The transcription factor Pax6 is required for development of the diencephalic dorsal midline secretory radial glia that forms the subcommissural organ. *Mech Dev* 2001, 109: 215–224.
130. Fabes J, Anderson P, Yanez-Munoz RJ, Thrasher A, Brennan C, Bolsover S. Accumulation of the inhibitory receptor EphA4 may prevent regeneration of corticospinal tract axons following lesion. *Eur J Neurosci* 2006, 23: 1721–1730.
131. Farbota KD, Sodhi A, Bendlin BB, McLaren DG, Xu G, Rowley HA, Johnson SC. Longitudinal volumetric changes following traumatic brain injury: a tensor-based morphometry study. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 2012, 18: 1006–1018.
132. Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J. Neurosci*. 2004, 24: 2143–2155.
133. Fawcett JW, Schwab ME, Montani L, Brazda N, Muller HW. Defeating inhibition of regeneration by scar and myelin components. *Handb Clin Neurol* 2012, 109:503-522.

134. Fearing MA, Bigler ED, Wilde EA, Johnson JL, Hunter JV, Xiaoqi L et al. Morphometric MRI findings in the thalamus and brainstem in children after moderate to severe traumatic brain injury, *J Child Neurol* 2008, 23(7): 729–737.
135. Fehlings MG, Baptiste DC. Current status of clinical trials for acute spinal cord injury. *Injury*. 2005; 36 Suppl 2:B113-22.
136. Fehlings MG, Tator CH. The relationships among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* 1995, 132:220–228.
137. Fehlings MG, Theodore N, Harrop J, Maurais G, Kuntz C, Shaffrey CI, Kwon BK, Chapman J, Yee A, Tighe A, McKerracher L. A phase I/IIa clinical trial of a recombinant Rho protein antagonist in acute spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2011; 28(5): 787-96.
138. Figueroa JD, Benton RL, Velazquez I, Torrado AI, Ortiz CM, Hernandez CM, Diaz JJ, Magnuson DS, Whittemore SR, Miranda JD. Inhibition of EphA7 up-regulation after spinal cord injury reduces apoptosis and promotes locomotor recovery. *J Neurosci Res* 2006, 84: 1438–1451.
139. Ferrari G, Fabris M, Gorio A. Gangliosides enhance neurite outgrowth in PC12 cells. *Brain Res* 1983; 284(2–3): 215–221
140. Fitzgerald J, Fawcett J. Repair in the central nervous system. *J Bone Joint Surg Br*. 2007 ; 89(11): 1413-20.
141. Flanagan JG, Vanderhaeghen P. The Ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* 1998, 21: 309–345.
142. Fleminger S, Oliver DL, Lovestone S, Rabe-Hesketh S, Giora A. Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease: the evidence 10 years on; a partial replication. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2003, 74: 857–862.
143. Forssberg H, Grillner S, Sjöström A. Tactile placing reactions in chronic spinal kittens. *Acta Physiol Scand* 1974, 92: 114–120.
144. Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 2001, 409:341–346.
145. Franklin RJM, Gilson JM, Franceschini IA, Barnett SC. Schwann cell-like myelination following transplantation of an olfactory bulb-ensheathing cell line into areas of demyelination in the adult CNS. *Glia* 1996, 17: 217–224.
146. Frazier-Cierpial L, Brunjes PC. Early postnatal cellular proliferation and survival in the olfactory bulb and rostral migratory stream of normal and unilaterally odor-deprived rats. *J Comp Neurol* 1989, 289:481–492.

147. Freund P, Schmidlin E, Wannier T, et al. Nogo-A-specific antibody treatment enhances sprouting and functional recovery after cervical lesion in adult primates. *Nat Med* 2006, 12: 790–792.
148. Fujita KE, Takechi N, Sakamoto, et al., HpSulf, a heparan sulfate 6-O endosulfatase, is involved in the regulation of VEGF signaling during sea urchin development, *Mech. Dev.* 2010, 127: 235–245.
149. Fukushi J, Makagiansar IT, Stallcup WB, NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin, *Mol. Biol. Cell* 2004, 15: 3580–3590.
150. Fuss B, Wintergerst ES, Bartsch U, Schachner M. Molecular characterization and in situ mRNA localization of the neural recognition molecule J1–160/180: A modular structure similar to tenascin. *J Cell Biol* 1993, 120: 1237–1249.
151. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000, 287: 1433–1438.
152. Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat. Neurosci.* 2004, 7: 1233–1241.
153. García-Alías G, Petrosyan HA, Schnell L, Horner PJ, Bowers WJ, Mendell LM, Fawcett JW, Arvanian VL. Chondroitinase ABC combined with neurotrophin NT-3 secretion and NR2D expression promotes axonal plasticity and functional recovery in rats with lateral hemisection of the spinal cord. *J Neurosci.* 2011, 31(49): 17788–99.
154. Garcia-Barcina JM, Matute C. AMPA-selective glutamate receptor subunits in glial cells of the adult bovine white matter. *Brain Res Mol Brain Res* 1998, 53: 270– 6.
155. Garcia-Barcina JM, Matute C. Expression of kainate-selective glutamate receptor subunits in glial cells of the adult bovine white matter. *Eur J Neurosci* 1996, 8:2379– 87.
156. Garcion E, Halilagic A, Faissner A, ffrench-Constant C. Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development* 2004, 131: 3423–3432.
157. Geddes JF, Graham DI, Central nervous system trauma, *in* Escourolles and Poirier *Manual of basic pathology*, 4th edition, Butterworth Heinemann, 400 p, 2004.
158. Geddes JF, Vowles GH, Nicoll JA, Révész T. Neuronal cytoskeletal changes are an early consequence of repetitive head injury. *Acta Neuropathol* 1999; 98: 171–178.
159. Gennarelli TA, Thibault LE, Adams JH, et al. Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate. *Ann Neurol.* 1982; 12: 564–74.

160. Gennarelli TA. Head injury in man and experimental animals: clinical aspects. *Acta Neurochir Suppl.* 1983; 32: 1–13.
161. Gentry LR, Godersky JC, Thompson B. MR imaging of head trauma: review of the distribution and radiopathologic features of traumatic lesions. *AJR Am J Roentgenol.* 1988; 150: 663–72.
162. Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent JD, Lledo PM. Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:1823–1828.
163. Ghooray GT, Martin GF. The development of myelin in the spinal cord of the North American opossum and its possible role in loss of rubrospinal plasticity. A study using myelin basic protein and galactocerebroside immuno-histochemistry. *Brain Res Dev Brain Res.* 1993; 72(1): 67-74.
164. Giftochristos N, David S. Laminin and heparan sulphate proteoglycan in the lesioned adult mammalian central nervous system and their possible relationship to axonal sprouting. *J Neurocytol.* 1988, 17(3):385-97.
165. Gilbert RJ, McKeon RJ, Darr A, Calabro A, Hascall VC, Bellamkonda RV. CS-4,6 is differentially upregulated in glial scar and is a potent inhibitor of neurite extension. *Mol Cell Neurosci* 2005, 29:545-558.
166. Giros A, Morante J, Gil-Sanz C, Fairen A, Costell M. Perlecan controls neurogenesis in the developing telencephalon, *BMC Dev. Biol.* 2007, 7: 29.
167. Glabinski AR, Balasingam V, Tani M, et al. Chemokine monocyte chemoattractant protein-1 is expressed by astrocytes after mechanical injury to the brain. *J Immunol* 1996; 156:4363– 4368.
168. Gobron S, Creveaux I, Meiniel R, Didier R, Herbet A, et al. Subcommissural organ/Reissner's fiber complex: characterization of SCO-spondin, a glycoprotein with potent activity on neurite outgrowth. *Glia* 2000, 32: 177–191.
169. Gobron S, Monnerie H, Meiniel R, Creveaux I, Lehmann W, Lamalle D, Dastugue B, Meiniel A. SCO-spondin: A new member of the thrombospondin family secreted by the subcommissural organ is a candidate in the modulation of neuronal aggregation. *J Cell Sci* 1996, 109: 1053–1061.
170. Godsave SF, Anderton BH, Wylie CC. The appearance and distribution of intermediate filament proteins during differentiation of the central nervous system, skin and notochord of *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1986, 97: 201.223.
171. Goldstein LE, Fisher AM, Tagge CA, Zhang XL, Velisek L et al. Chronic traumatic encephalopathy in blast-exposed military veterans and a blast neurotrauma mouse model. *Sci. Transl. Med.* 2012, 4: 134ra60.

172. Gonzenbach RR, Zoerner B, Schnell L, Weinmann O, Mir AK, Schwab ME. Delayed anti-nogo-a antibody application after spinal cord injury shows progressive loss of responsiveness. *J Neurotrauma*. 2012; 29(3): 567-78.
173. Goodger SJ, Robinson CJ, Murphy KJ, et al., Evidence that heparin saccharides promote FGF2 mitogenesis through two distinct mechanisms, *J. Biol. Chem.* 2008, 283 13001–13008.
174. Gorio A, Ferrari G, Fusco M, Janigro D, Zanoni R, Jonsson G. Gangliosides and their effects on rearranging peripheral and central neural pathways. *Cent Nerv Syst Trauma* 1984, 1(1): 29–37
175. Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 1999, 2: 260–265.
176. GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 2000, 403: 439–444.
177. Graus-Porta D, Blaess S, Senften M, Littlewood-Evans A, Damsky C, Huang Z, Orban P, Klein R, Schittny JC, Muller U. β 1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron* 2001, 31: 367–379.
178. Graves AB, White E, Koepsell TD, Reifler BV, van Belle G, Larson EB, Raskind M. The association between head trauma and Alzheimer's disease. *Am. J. Epidemiol.* 1990, 131: 491–501.
179. Griffin WST, Sheng JG, Gentleman SM, Graham DI, Mrak RE, Roberts GW. Microglial interleukin-1 α expression in human head injury: correlations with neuronal and neuritic β -amyloid precursor protein expression. *Neurosci Lett* 1994, 176: 133–6
180. Grill R., Murai, K., Blesch, A., Gage, F. H., Tuszynski, M. H. Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axon growth and partial functional recovery after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 1997 ; 17: 5560–5572.
181. Gris D, Marsh DR, Oatway MA, Chen Y, Hamilton EF, Dekaban GA, Weaver LC. Transient blockade of the CD11d/CD18 integrin reduces secondary damage after spinal cord injury, improving sensory, autonomic, and motor function. *J Neurosci.* 2004; 24(16): 4043-51.
182. Grosjean MB, Lenzlinger PM, Stahel PF, et al. Immunohistochemical characterization of Fas (CD95) and Fas ligand (FasL/CD95L) expression in the injured brain: relationship with neuronal cell death and inflammatory mediators. *Histol Histopathol* 2007, 22: 235–250.
183. Grossman SD, Rosenberg LJ, Wrathall JR. Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. *Exp Neurol* 2001, 168:273–282.

184. Groves AK, Barnett SC, Franklin RJ, Crang AJ, Mayer M, Blakemore WF, Noble M. Repair of demyelinated lesions by transplantation of purified O-2A progenitor cells. *Nature* 1993, 362: 453–455.
185. Gruner JA, Yee AK, Blight AR. Histological and functional evaluation of experimental spinal cord injury: evidence of a stepwise response to graded compression. *Brain Res* 1996, 729: 90–101.
186. Guest JD, Hiester ED, Bunge RP. Demyelination and Schwann cell responses adjacent to injury epicenter cavities following chronic human spinal cord injury. *Exp Neurol* 2005, 192: 384–93.
187. Guo Z, Cupples LA, Kurz A, Auerbach SH, Volicer L, Chui H, Green RC et al. Head injury and the risk of AD in the MIRAGE study. *Neurology* 2000, 54: 1316–1323.
188. Habib AA, Marton LS, Allwardt B, Gulcher JR, Mikol DD, Högnason T, Chattopadhyay N, Stefansson K. Expression of the oligodendrocyte-myelin glycoprotein by neurons in the mouse central nervous system. *J. Neurochem.* 1998, 70: 1704–1711.
189. Hammang JP, Archer DR, Duncan ID. Myelination following transplantation of EGF responsive neural stem cells into a myelin-deficient environment. *Exp. Neurol.* 1997, 147, 84–95.
190. Harris JL, Reeves TM, Phillips LL. Phosphacan and receptor protein tyrosine phosphatase β expression mediates deafferentation-induced synaptogenesis. *Hippocampus.* 2011; 21(1):81-92.
191. Hasan SJ, Keirstead HS, Muir GD, Steeves JD. Axonal regeneration contributes to repair of injured brainstem-spinal neurons in embryonic chick. *J. Neurosci.* 1993, 13: 492-507.
192. Haynes RL, Xu G, Folkerth RD, Trachtenberg FL, Volpe JJ, Kinney HC. Potential neuronal repair in cerebral white matter injury in the human neonate. *Pediatr Res.* 2011, 69(1): 62-7.
193. Herrmann JE, Imura T, Song B, et al: STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci* 2008, 28:7231–7234.
194. Higashijima S, Nose A, Eguchi G, Hotta Y, Okamoto H. Mindin/F-spondin family: novel ECM proteins expressed in the zebrafish embryonic axis. *Dev Biol* 1997, 192:211–227.
195. Hilario JD, Rodino-Klapac LR, Wang C, Beattie CE. Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue for axial motoneurons in vivo. *Dev Biol* 2009, 326: 190–200.
196. Hill CE, Beattie MS, Bresnahan JC. Degeneration and sprouting of identified descending supraspinal axons after contusive spinal cord injury in the rat. *Exp Neurol* 2001, 171:153–169.

197. Hoe HS, Wessner D, Beffert U, Becker AG, Matsuoka Y, Rebeck GW. F-spondin interaction with the apolipoprotein E receptor ApoE2 affects processing of amyloid precursor protein. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(21): 9259-68.
198. Hoffman JR, O'Shea KS. Thrombospondin expression in nerve regeneration II. Comparison of optic nerve crush in the mouse and goldfish. *Brain Res Bull* 1999, 48: 421–427.
199. Hoffman PN, Cleveland DW, Griffin JW, Landes PW, Cowan NJ, Price DL. Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84: 3472–3476.
200. Holder N, Cooke J, Brennan C. The Eph receptor kinases and the ephrins: roles in nervous system development. *Eur J Neurosci* 1998, 10: 405–408
201. Holtz A, Nystrom B, Gerdin B, Olsson Y. Neuropathological changes and neurological function after spinal cord compression in the rat. *J Neurotrauma* 1990, 7: 155–167.
202. Horsburgh K, Cole GM, Yang F, Savage MJ, Greenberg BD, Gentleman SM, Graham DI, Nicoll JA. Beta-amyloid (A β)₄₂(43), A β ₄₂, A β ₄₀ and apoE immunostaining of plaques in fatal head injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2000, 26: 124–132.
203. Hoyo-Becerra C, Lopez-Avalos MD, Cifuentes M, Visser R, Fernandez-Llebrez P, Grondona JM. The subcommissural organ and the development of the posterior commissure in chick embryos. *Cell Tissue Res* 2010, 339: 383–395.
204. Hu F, Strittmatter SM. The N-terminal domain of Nogo-A inhibits cell adhesion and axonal outgrowth by an integrin-specific mechanism. *J Neurosci* 2008, 28: 1262–1269.
205. Hu H. Cell-surface heparan sulfate is involved in the repulsive guidance activities of Slit2 protein. *Nat Neurosci* 2001, 4: 695–701.
206. Huang JK, Phillips GR, Roth AD, Pedraza L, Shan W, Belkaid W et al. Glial membranes at the node of Ranvier prevent neurite outgrowth. *Science* 2005, 310: 1813–1817.
207. Huang WL, George KJ, Ibba V, Liu MC, Averill S, Quartu M, Hamlyn PJ, Priestley JV. The characteristics of neuronal injury in a static compression model of spinal cord injury in adult rats. *Eur J Neurosci* 2007, 25: 362–372.
208. Huber A, Gabbert K, Kelemen J, Cervos-Navarro J. Density of amyloid plaques in brains after head trauma. *J. Neurotrauma* 1993, 10 (Suppl. 1): S180.
209. Hughes EG, Elmariah SB, Balice-Gordon RJ. Astrocyte secreted proteins selectively increase hippocampal GABAergic axon length, branching, and synaptogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 2010, 43: 136–145.

210. Ikonomic MD, Uryu K, Abrahamson EE, Ciallella JR, Trojanowski JQ, Lee VM. Alzheimer's pathology in human temporal cortex surgically excised after severe brain injury. *Exp Neurol* 2004; 190: 192–203.
211. Imura T, Kornblum HI, Sofroniew MV. The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. *J. Neurosci.* 2003, 23: 2824–2832.
212. Irizarry-Ramirez M, Willson CA, Cruz-Orengo L, Figueroa J, Velazquez I, Jones H, Foster RD, Whittemore SR, Miranda JD. Upregulation of EphA3 receptor after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2005, 22: 929–935.
213. Iruela-Arispe ML, Liska DJ, Sage EH, Bornstein, P. Differential expression of thrombospondin 1, 2, and 3 during murine development. *Dev. Dyn.* 1993, 197: 40–56.
214. Ishii M, Maeda N. Oversulfated chondroitin sulfate plays critical roles in the neuronal migration in the cerebral cortex, *J. Biol. Chem.* 2008, 283: 32610–32620.
215. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66: 233–243.
216. Iwashita Y, Kawaguchi S, Murata M. Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat. *Nature* 1994, 367: 167–170.
217. Jain KK. Neuroprotection in traumatic brain injury. *Drug Discov Today.* 2008; 13(23-24):1082-9.
218. Jalink K, van Corven EJ, Hengeveld T, Morii N, Narumiya S, Moolenaar WH. Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell Biol.* 1994; 126(3): 801–10.
219. Jennett GM, Adams JH, Murray LS, Graham DI. Neuropathology in vegetative and severely disabled patients after head injury, *Neurology* 2001, 56(4): 486–490.
220. Jeserich G, Muller A, Jacque C. Developmental expression of myelin proteins by oligodendrocytes in the CNS of trout *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1990, 51: 27–34.
221. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99: 11946–11950.
222. Johansson CB, Momba S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25–34.

223. Johnson PW, Abramow-Newerly W, Seilheimer B, Sadoul R, Tropak MB et al. Recombinant myelin-associated glycoprotein confers neural adhesion and neurite outgrowth function. *Neuron* 1989, 3, 377–385.
224. Johnson VE, Stewart JE, Begbie FD, Trojanowski JQ, Smith DH, Stewart W. Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury. *Brain*. 2013, 136(Pt 1):28-42.
225. Johnson VE, Stewart W, Smith DH. Widespread tau and amyloid-beta pathology many years after a single traumatic brain injury in humans. *Brain Pathol*. 2012, 22: 142–149.
226. Johnson VE, Stewart W, Smith DH. Traumatic brain injury and amyloid- β pathology: a link to Alzheimer's disease? *Nat. Rev. Neurosci*. 2010, 11, 361–370.
227. Jones LL, Margolis RU, Tuszynski MH. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp Neurol* 2003, 182: 399-411.
228. Kakulas BA. Neuropathology: the foundation for new treatments in spinal cord injury. *Spinal Cord* 2004, 42:549–563.
229. Kantor DB, Chivatakarn O, Peer KL, Oster SF, Inatani M, Hansen MJ et al. Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. *Neuron* 2004, 44: 961–975.
230. Kaplan DR, Miller FD. Axon growth inhibition: signals from the p75 neurotrophin receptor. *Nat. Neurosci*. 2003, 6 (5): 435–6.
231. Kaplan MS, Hinds JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 1977, 197: 1092–1094.
232. Káradóttir R, Hamilton NB, Bakiri Y, Attwell D. Spiking and nonspiking classes of oligodendrocyte precursor glia in CNS white matter. *Nature Neurosci*. 2008, 11: 450–456.
233. Kasper M, Perry G, Stosiek P. Cytokeratin expression in human spinal meninges and ependymal cells. *J. Hirnforsch*. 1991, 32: 19-25.
234. Keleman K, Dickson BJ. Short- and long-range repulsion by the *Drosophila* Unc5 netrin receptor. *Neuron* 2001, 32: 605–617.
235. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 1997, 386:493–495.
236. Kerever, A., Schnack, J., Vellinga, D., Ichikawa, N., Moon, C., Arikawa-Hirasawa, E., Efrid, J.T., and Mercier, F. Novel extracellular matrix structures in the neural stem cell niche capture the neurogenic factor FGF-2 from the extracellular milieu. *Stem Cells* 2007, 25: 2146–2157.

237. Kim GM, Xu J, Xu J, Song SK, Yan P, et al: Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor-kappaB activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 2001, 21: 6617–6625.
238. Klar A, Baldassare M, Jessell TM. F-spondin: a gene expressed at high levels in the floor plate encodes a secreted protein that promotes neural cell adhesion and neurite extension. *Cell* 1992, 69: 95–110.
239. Kohmura N, Senzaki K, Hamada S, Kai N, Yasuda R, Watanabe M, Ishii H, Yasuda M, Mishina M, Yagi T. Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at a synaptic complex. *Neuron* 1998, 20:1137-51.
240. Koprivica V, Cho KS, Park JB, Yiu G, Atwal J, Gore B, Kim JA, Lin E, Tessier-Lavigne M, Chen DF, He Z. EGFR activation mediates inhibition of axon regeneration by myelin and chondroitin sulfate proteoglycans. *Science* 2005, 310:106-11.
241. Kraushaar DC, S. Rai, E. Condac, et al., Heparan sulfate facilitates FGF and BMP signaling to drive mesoderm differentiation of mouse embryonic stem cells, *J. Biol. Chem.* 2012, 287: 22691–22700.
242. Kubes P, Ward PA. Leukocyte recruitment and the acute inflammatory response. *Brain Pathol* 2000; 10: 127–135.
243. Kucharova K, Stallcup WB. The NG2 proteoglycan promotes oligodendrocyte progenitor proliferation and developmental myelination, *Neuroscience* 2010, 166: 185–194.
244. Kusik BW, Hammond DR, Udvadia AJ. Transcriptional regulatory regions of gap43 needed in developing and regenerating retinal ganglion cells. *Dev Dyn* 2010, 239:482-495.
245. Kwok JC, P.Warren, J.W. Fawcett, Chondroitin sulfate: a key molecule in the brain matrix, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2012, 44: 582–586.
246. Kwon BK, Liu J, Messerer C, Kobayashi NR, McGraw J, Oschipok L, Tetzlaff W. Survival and regeneration of rubrospinal neurons 1 year after spinal cord injury. *PNAS* 2002; 99: 3246–3251.
247. Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J* 2004; 4(4): 451-64.
248. Lang DM, Rubin BP, Schwab ME, Stuermer CA. CNS myelin and oligodendrocytes of the *Xenopus* spinal cord—but not optic nerve—are nonpermissive for axon growth. *J Neurosci* 1995, 15: 99–109.
249. Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA. Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97: 13883–13888.

250. Lee JK, Chan AF, Luu SM, Zhu Y, Ho C, Tessier-Lavigne M, Zheng B. Reassessment of corticospinal tract regeneration in Nogo-deficient mice. *J Neurosci* 2009; 29: 8649–8654.
251. Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 1999; 399: A7–14.
252. Lenzlinger PM, Marx A, Trentz O, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Prolonged intrathecal release of soluble Fas following severe traumatic brain injury in humans. *J Neuroimmunol* 2002; 122: 167–174.
253. Lepeintre JF, D'Arbigny P, Mathé JF, Vigué B, Loubert G, Delcour J, Kempf C, Tadié M. Neuroprotective effect of gacyclidine. A multicenter double-blind pilot trial in patients with acute traumatic brain injury. *Neurochirurgie*. 2004; 50(2-3): 83-95.
254. Leventhal C, Rafii S, Rafii D, Shahar A, Goldman SA. Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. *Mol. Cell. Neurosci.* 1999, 13: 450–464.
255. Levine JM, Nishiyama A. The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: a multifunctional proteoglycan associated with immature cells. *Perspect Dev Neurobiol.* 1996; 3(4): 245-59.
256. Levine JM. Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. *J Neurosci* 1994; 14: 4716–30.
257. Li GL, Farooque M, Holtz A, Olsson Y. Changes of beta-amyloid precursor protein after compression trauma to the spinal cord: an experimental study in the rat using immunohistochemistry. *J Neurotrauma* 1995, 12: 269–277.
258. Li S, Stys PK. Mechanisms of ionotropic glutamate receptor mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter. *J Neurosci* 2000; 20: 1190–8.
259. Li Y, Field PM, Raisman G. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* 1997, 277: 2000–2002.
260. Liauw J, Hoang S, Choi M, Eroglu C, Choi M, Sun GH, Percy M, Wildman-Tobriner B, Bliss T, Guzman RG, Barres BA, Steinberg GK. Thrombospondins 1 and 2 are necessary for synaptic plasticity and functional recovery after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008, 28(10):1722-32.
261. Liebscher T, Schnell L, Schnell D, Scholl J, Schneider R, et al. Nogo-A Antibody Improves Regeneration and Locomotion of Spinal Cord–Injured Rats. *Ann Neurol* 2005, 58: 706–719.
262. Liesi P. Laminin-immunoreactive glia distinguish regenerative adult CNS systems from non-regenerative ones. *Embo J*, 1985 4: 2505–2511.

263. Lin, T.N., Kim, G.M., Chen, J.J., Cheung, W.M., He, Y.Y., Hsu, C.Y. (2003). Differential regulation of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 after focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke* 34, 177–186.
264. Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, Dong HX, Wu YJ, Fan GS, Jacquin MF, Hsu CY, Choi DW. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 1997, 17:5395–5406.
265. Liuzzi FJ, Lasek, RJ. Astrocytes block axonal regeneration in mammals by activating the physiological stop pathway. *Science* 1987, 237, 642–645.
266. Lledo PM, Merkle FT, Alvarez-Buylla A. Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci.* 2008, 31, 392–400.
267. Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 1984, 264:1145–1148.
268. Lois C, Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 2074–2077.
269. Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Chain migration of neuronal precursors. *Science* 1996, 271: 978–981.
270. Luckenbill-Edds L. Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res Brain Res Rev* 1997, 23, 1–27.
271. Luque JM, Morante-Oria J, Fairen A. Localization of ApoER2, VLDLR and Dab1 in radial glia: Groundwork for a new model of reelin action during cortical development. *Brain Res Dev Brain Res* 2003, 140: 195–203.
272. Macas J, Nern C, Plate KH, Momma S. Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. *J Neurosci.* 2006; 26(50): 13114-9.
273. Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD. NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron.* 1990; 5(4): 501-9.
274. Margolis RK, Margolis RU: Nervous tissue proteoglycans. *Experientia* 1993, 49: 429-446.
275. Martin-Villalba A, Herr I, Jeremias I, et al. CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 1999; 19: 3809 –3817.
276. Martland H. Punch drunk. *J. Am. Med. Assoc.* 1928, 91: 1103–1107.

277. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet.* 1990, 6: 121-125.
278. Matute C, Alberdi E, Ibarretxe G, Sanchez-Gomez MV. Excitotoxicity in glial cells. *Eur J Pharmacol* 2002; 447: 239–46.
279. Mayer U, Nischt R, Pöschl E, Mann K, Fukuda K, Gerl M, Yamada Y, Timpl R. A single EGF-like motif of laminin is responsible for high affinity nidogen binding. *Embo J.* 1993, 12(5):1879-85.
280. McDonald JW, Belegu V: Demyelination and remyelination after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2006, 23:345–359.
281. McGee AW, Yang Y, Fischer QS, Daw NW, Strittmatter SM. Experience-driven plasticity of visual cortex limited by myelin and Nogo receptor. *Science.* 2005; 309(5744): 2222-6.
282. McIntosh TK, Juhler M, Wieloch T. Novel pharmacologic strategies in the treatment of experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1998; 15: 731–69.
283. McKee AC, Cantu RC, Nowinski CJ, Hedley-Whyte ET, et al. Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive tauopathy after repetitive head injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2009, 68: 709–735.
284. McKee AC, Stern RA, Nowinski CJ, Stein TD, Alvarez VE et al. The spectrum of disease in chronic traumatic encephalopathy. *Brain* 2013, 136, 43–64.
285. McKenzie KJ, McLellan DR, Gentleman SM, et al. Is β -APP a marker of axonal damage in short-surviving head injury? *Acta Neuropathol.* 1996, 92: 608–613.
286. McKeon RJ, Höke A, Silver J. Injury-Induced Proteoglycans Inhibit the Potential for Laminin-Mediated Axon Growth on Astrocytic Scars. *Exp Neurol* 1995, 136: 32–43.
287. McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J: Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci* 1991, 11: 3398-3411.
288. McKerracher L, Higuchi H. Targeting Rho to stimulate repair after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2006, 23:309–317.
289. McLaughlin T, O’Leary DDM. Functional consequences of coincident expression of EphA receptors and ephrin-A ligands. *Neuron* 1999, 22:636–639.
290. Meiniel A, Meiniel R, Didier R, Creveaux I, Gobron S, et al. The subcommissural organ and Reissner’s fiber complex. An enigma in the central nervous system? *Prog Histochem Cytochem* 1996, 30: 1–66.

291. Meiniel O, Meiniel R, Lalloue F, Didier R, Jauberteau MO, Meiniel A, Petit D. The lengthening of a giant protein: When, how, and why? *J Mol Evol* 2008, 66: 1–10.
292. Meletis K, Barnabe´-Heider F, Carle´n M, Evergren E, Tomilin N, et al. Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol.* 2008, 22:6(7):e182. DOI: 10.1371/journal.pbio.0060182.
293. Mercier F, E. Arikawa-Hirasawa, Heparan sulfate niche for cell proliferation in the adult brain, *Neurosci. Lett.* 2012, 510: 67–72.
294. Mercier F, Kitasako JT, Hatton GI. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J. Comp. Neurol.* 2002, 451, 170–188.
295. Metz GA, Curt A, van de Meent H, Klusman I, Schwab ME, et al. Validation of the weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2000, 17: 1–17.
296. Metz LM, Zhang Y, Yeung M, et al. Minocycline reduces gadolinium-enhancing magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2004; 55: 756.
297. Meuli-Simmen C, Meuli M, Hutchins GM, Yingling CD, Timmel GB, Harrison MR, Adzick NS. The fetal spinal cord does not regenerate after in utero transection in a large mammalian model. *Neurosurgery* 1996, 39:555–560; discussion 560–561.
298. Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B et al. Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 2004, 304: 700–703.
299. Micu I, Jiang Q, Coderre E, Ridsdale A, Zhang L, Woulfe J, Yin X, Trapp BD, McRory JE, Rehak R, Zamponi GW, Wang W, Stys PK. NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia. *Nature.* 2006; 439(7079): 988-92.
300. Millspaugh J. Dementia pugilistica. *U. S. Nav. Med. Bull.* 1937, 35: 297–303.
301. Ming GL, Song HJ, Berninger B, Holt CE, Tessier-Lavigne M, Poo MM. cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron.* 1997; 19(6): 1225-35.
302. Miranda JD, White LA, Marcillo AE, Willson CA, Fagid J, Whittemore SR. Induction of Eph B3 after spinal cord injury. *Exp Neurol* 1999, 156:218–222.
303. Molgaard CA, Stanford EP, Morton DJ, Ryden LA, Schubert KR, Golbeck AL. Epidemiology of head trauma and neurocognitive impairment in a multi-ethnic population. *Neuroepidemiology* 1990, 9, 233–242.
304. Moller JC, Klein MA, Haas S, Jones LL, Kreutzberg GW, Raivich G. Regulation of thrombospondin in the regenerating mouse facial motor nucleus. *Glia* 1996, 17: 121–132.

305. Mongiat M, S.M. Sweeney, J.D. San Antonio, J. Fu, R.V. Iozzo, Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan, *J. Biol. Chem.* 2003, 278: 4238–4249.
306. Monnerie H, Dastugue B, Meiniel A. Reissner's fiber promotes neuronal aggregation and influences neuritic outgrowth in vitro. *Cell Tissue Res* 1997; 287: 285-295.
307. Monnerie H, Dastugue B, Meiniel A. Effect of synthetic peptides derived from SCO-spondin conserved domains on chick cortical and spinal-cord neurons in cell cultures. *Cell Tissue Res* 1998, 293: 407–18.
308. Monnier PP, Sierra A, Schwab JM, Henke-Fahle S, Mueller BK: The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar. *Mol Cell Neurosci* 2003, 22:319-330.
309. Mortimer JA, van Duijn CM, Chandra V, Fratiglioni L, Graves AB, et al. Head trauma as a risk factor for Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *Int. J. Epidemiol.* 1991, 20 (Suppl. 2), S28–S35.
310. Mulder M, Koopmans G, Wassink G, Al Mansouri G, Simard ML, Havekes LM, Prickaerts J, Blokland A. LDL receptor deficiency results in decreased cell proliferation and presynaptic bouton density in the murine hippocampus. *Neurosci Res.* 2007; 59(3):251-6.
311. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449–1456.
312. Nashmi R, Fehlings MG: Changes in axonal physiology and morphology after chronic compressive injury of the rat thoracic spinal cord. *Neuroscience* 2001, 104: 235–251.
313. Nave KA, Salzer JL. Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2006, 16: 492–500.
314. Nedergaard M. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 1994, 263: 1768-1171.
315. Neugebauer KM, Emmett CJ, Venstrom KA, Reichardt LF. Vitronectin and thrombospondin promote retinal neurite outgrowth: Developmental regulation and role of integrins. *Neuron* 1991, 6: 345–358.
316. Nicotera P, Ankarcrona M, Bonfoco E, Orrenius S, Lipton SA. Neuronal necrosis and apoptosis: two distinct events induced by exposure to glutamate or oxidative stress. *Adv Neurol.* 1997 ; 72:95-101.
317. Nishiyama A, Lin XH, Stallcup WB. Generation of truncated forms of the NG2 proteoglycan by cell surface proteolysis. *Mol Biol Cell.* 1995, 6(12): 1819-32.
318. Niu S, Yabut O, D'Arcangelo G. The Reelin signaling pathway promotes dendritic spine development in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2008, 28: 10339–10348.

319. Noble M, Murray K, Stroobant P, Waterfield MD, Riddle P. Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature* 1988 ; 333 ; 560–562.
320. Noble LJ, Wrathall JR: Distribution and time course of protein extravasation in the rat spinal cord after contusive injury. *Brain Res* 1989, 482: 57–66.
321. Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* 2002; 22: 3161–3173.
322. Norenberg MD, Smith J, Marcillo A: The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *J Neurotrauma* 2004, 21:429–440.
323. Oehmichen M, Meissner C, Schmidt V, Pedal I, König HG, Saternus KS. Axonal injury - a diagnostic tool in forensic neuropathology? A review. *Forensic Sci Int.* 1998; 95(1): 67-83.
324. Omalu B, Bailes J, Hamilton RL, Kamboh MI et al. Emerging histomorphologic phenotypes of chronic traumatic encephalopathy in American athletes. *Neurosurgery* 2011, 69,173–183.
325. Omalu BI, DeKosky ST, Minster RL, Kamboh MI et al. Chronic traumatic encephalopathy in a National Football League player. *Neurosurgery* 2005; 57; 128–134.
326. O'Meara ES, Kukull WA, Sheppard L, Bowen JD, McCormick WC et al. Head injury and risk of Alzheimer's disease by apolipoprotein E genotype. *Am. J. Epidemiol.* 1997, 146, 373–384.
327. O'Neill P, Whalley K, Ferretti P. Nogo and Nogo-66 receptor in human and chick: implications for development and regeneration. *Dev Dyn.* 2004; 231(1): 109-21.
328. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite: in Health and disease. *Physiological Reviews* 2007, 87(1): 315-424.
329. Packard M, Mathew D, Budnik V. Wnts and TGF beta in synaptogenesis: old friends signaling at new places. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003, 4, 113–120.
330. Palmer TD, Willhoite AR., Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 2000, 425, 479–494.
331. Pant HC. Dephosphorylation of neurofilament proteins enhances their susceptibility to degradation by calpain. *Biochem J* 1988, 256:665–668.
332. Park E, Velumian AA, Fehlings MG: The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *J Neurotrauma* 2004, 21:754–774.

333. Park JB, Yiu G, Kaneko S, et al: A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron* 2005, 45:345–351.
334. Park Y, Rangel C, Reynolds MM, et al., *Drosophila* perlecan modulates FGF and hedgehog signals to activate neural stem cell division, *Dev. Biol.* 2003, 253: 247–257.
335. Parr AM, Tator CH, Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 40(7): 609-19.
336. Pasterkamp RJ, Giger RJ, Ruitenberg M-J, Holtmaat AJGD, de Wit J, de Winter F, Verhaagen J. Expression of the gene encoding the chemorepellent semaphorin III is induced in the fibroblast component of neural scar tissue formed following injuries of adult but not neonatal CNS. *Mol Cell Neurosci* 1999, 13:143–166.
337. Pasterkamp RJ, Verhaagen J. Emerging roles for semaphorins in neural regeneration. *Brain Res Rev* 2001, 35: 36–54.
338. Pathy L. Homology of a domain of the growth hormone/prolactin receptor family with type III modules of fibronectin. *Cell.* 1990; 61(1): 13-4.
339. Paxinos G, Watson Ch. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, 3ème édition, 1986.
340. Payne HR, Lemmon V. Glial cells of the O-2A lineage preferentially bind to N-cadherin and develop distinct morphologies. *Dev. Biol.* 1993, 159: 595–607.
341. Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 2010; 6: 193–201.
342. Peters A, Sethares C. Oligodendrocytes, their progenitors and other neuroglial cells in the aging primate cerebral cortex. *Cereb Cortex.* 2004; 14(9): 995-1007.
343. Piao MS, Lee JK, Jang JW, Hur H, Lee SS, Xiao L, Kim HS. Melatonin improves functional outcome via inhibition of matrix metalloproteinases-9 after photothrombotic spinal cord injury in rats. *Acta Neurochir (Wien).* 2014 May 31
344. Pineau I, Lacroix S. Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *J Comp Neurol* 2007, 500:267–285.
345. Plassman BL, Havlik RJ, Steffens DC, Helms MJ, Newman TN et al. Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology* 2000, 55, 1158–1166.

346. Pointillart V, Petitjean ME, Wiart L, Vital JM, Lassié P, Thicoipé M, Dabadie P. Pharmacological therapy of spinal cord injury during the acute phase. *Spinal Cord*. 2000; 38(2): 71-6.
347. Popovich PG, Guan Z, Wei P, Huitinga I, van Rooijen N, Stokes BT. Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp. Neurol*. 1999; 158, 351–365.
348. Povlishock JT, Hayes RL, Michel ME, McIntosh TK. Workshop on animal models of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1994, 11:723–732.
349. Prinjha R, Moore SE, Vinson M, et al. Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature* 2000; 403: 383-84.
350. Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petratos S. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 2004; 15(3): 415-36.
351. Pudenz RH, Shelden CH. The lucite calvarium- A method for direct observation of the brain. *J Neurosurg*. 1946; 3:487–505.
352. Pujadas L, Gruart A, Bosch C, Delgado L, Teixeira CM, Rossi D, de Lecea L, Martinez A, Delgado-Garcia JM, Soriano E. Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. *J Neurosci* 2010, 30: 4636–4649.
353. Qin L, Liu Y, Cooper C, Liu B, Wilson B, Hong JS. Microglia enhance beta-amyloid peptide-induced toxicity in cortical and mesencephalic neurons by producing reactive oxygen species. *J Neurochem* 2002; 83: 973–83.
354. Qiu J, Whalen MJ, Lowenstein P, et al. Upregulation of the Fas receptor death-inducing signaling complex after traumatic brain injury in mice and humans. *J Neurosci* 2002; 22: 3504 –3511.
355. Raineteau O, Schwab ME. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 2001, 2: 263–73.
356. Ramirez-Castillejo C, Sanchez-Sanchez F, Andreu-Agullo C, Ferron SR, Aroca-Aguilar JD, Sanchez P, Mira H, Escribano J, Farinas I. Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat. Neurosci*. 2006, 9, 331–339.
357. Rhodes KE, Fawcett J. Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J Anat* 2004, 204:33-48.
358. Risling M, Fried K, Linda H, Carlstedt T, Cullheim S. Regrowth of motor axons following spinal cord lesions: distribution of laminin and collagen in the CNS scar tissue. *Brain Res Bull* 1993, 30, 405–414.

359. Roberts GW, Gentleman SM, Lynch A, Graham DI. β A4 amyloid protein deposition in brain after head trauma. *Lancet* 1991; 338, 1422–1423.
360. Roberts GW, Gentleman SM, Lynch A, Murray L, et al. β amyloid protein deposition in the brain after severe head injury: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1994, 57, 419–425.
361. Roof RL, Schielke GP, Ren X, Hall ED. A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats. *Stroke* 2001, 32: 2648–57.
362. Rosenberg SS, Kelland EE, Tokar E, De la Torre AR, Chan JR. The geometric and spatial constraints of the microenvironment induce oligodendrocyte differentiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2008, 105: 14662–14667.
363. Ross DE, Ochs AL, Seabaugh JM, Demark MF et al. Progressive brain atrophy in patients with chronic neuropsychiatric symptoms after mild traumatic brain injury: a preliminary study. *Brain Inj.* 2012, 26: 1500–1509.
364. Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B, Fehlings MG. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus.* 2008; 25(5):E2.
365. Ryan ME, Usman A, Ramamurthy NS, Golub LM, Greenwald RA. Excessive matrix metalloproteinase activity in diabetes: inhibition by tetracycline analogues with zinc reactivity. *Curr Med Chem* 2001; 8: 305–16.
366. Sabelström H, Stenudd M, Réu P, Dias DO, Elfineh M, Zdunek S, Damberg P, Göritz C, Frisén J. Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science*. 2013; 342(6158): 637–40.
367. Sage EH, Bornstein P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. *J Biol Chem* 1991, 266: 14831–14834.
368. Sakka L, Delétage N, Lalloué F, Duval A, Chazal J, Lemaire JJ, Meiniel A, Monnerie H, Gobron S. SCO-spondin derived peptide NX210 induces neuroprotection *in vitro* and promotes fiber regrowth and functional recovery after spinal cord injury. *PLoS One*. 2014 Mar 25;9(3):e93179. doi: 10.1371/journal.pone.0093179.
369. Salib E, Hillier V. Head injury and the risk of Alzheimer's disease: a case control study. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 1997, 12: 363–368.
370. Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar, S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-Garcia Verdugo J, et al. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 2004, 427: 740–744.

371. Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A, Logan A. Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia* 2004, 46: 225-251.
372. Schnell L, Fearn S, Schwab ME, et al: Cytokine-induced acute inflammation in the brain and spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999, 58:245–254.
373. Schofield PW, Tang M, Marder K, Bell K, Dooneief G et al. Alzheimer's disease after remote head injury: an incidence study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1997, 62: 119–124.
374. Schultz-Cherry S, Lawler J, Murphy-Ullrich JE, 1994. The type 1 repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* 1994, 269: 26783–26788.
375. Schumacher PA, Eubanks JH, Fehlings MG. Increased calpain I-mediated proteolysis, and preferential loss of dephosphorylated NF200, following traumatic spinal cord injury. *Neuroscience* 1999, 91:733–744.
376. Schwab ME, Thoenen H. Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors. *J Neurosci* 1985; 5: 2415-23.
377. Scott-Drew S, Ffrench-Constant C. Expression and function of thrombospondin-1 in myelinating glial cells of the central nervous system. *J Neurosci Res* 1997, 50: 202–214.
378. Sedy J, Urdzikova L, Jendelova P, Sykova E. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neurosci Biobehav Rev* 2008, 32: 550–80.
379. Seki T, Hida K, Tada M, Koyanagi I, Iwasaki Y. Graded contusion model of the mouse spinal cord using a pneumatic impact device. *Neurosurgery* 2002, 50: 1075–1081.
380. Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 2004; 304: 1338–1340.
381. Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, Roysam B, Temple S. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell.* 2008; 3(3): 289-300.
382. Shibuya S, Miyamoto O, Itano T, Mori S, Norimatsu H. Temporal progressive antigen expression in radial glia after contusive spinal cord injury in adult rats. *Glia* 2003; 42:172–183.
383. Schmued L, Slikker W Jr. Black-gold: a simple, high-resolution histochemical label for normal and pathological myelin in brain tissue sections. *Brain Res.* 1999; 837(1-2): 289-97.
384. Simmons AM, Horowitz SS, Brown RA. Cell proliferation in the forebrain and midbrain of the adult bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Brain Behav. Evol.* 2008, 71: 41–53.

385. Simpson SB. Jr. Morphology of the regenerated spinal cord in the lizard, *Anolis carolinensis*. *J. Comp Neural*. 1968, 134: 193-210.
386. Singer M, Nordlanoer AH, Egar P. Axonal guidance during embryogenesis and regeneration in the spinal cord of newt: the blueprint hypothesis of neuronal pathway patterning. *J. Comp. Neurol*. 1979, 185: 1-22.
387. Singh I, Knezevic N, Ahmmed GU, Kini V, Malik AB, Mehta D. Galphag-TRPC6-mediated Ca^{2+} entry induces RhoA activation and resultant endothelial cell shape change in response to thrombin. *J Biol Chem*. 2007; 282(11): 7833-43.
388. Singleton RH, Povlishock JT. Identification and characterization of heterogeneous neuronal injury and death in regions of diffuse brain injury: evidence for multiple independent injury phenotypes. *J Neurosci*. 2004; 24: 3543-53.
389. Sirko S, von Holst A, Weber A, et al., Chondroitin sulfates are required for fibroblast growth factor-2-dependent proliferation and maintenance in neural stem cells and for epidermal growth factor-dependent migration of their progeny, *Stem Cells* 2010, 28: 775-787.
390. Sivasankaran R, Pei J, Wang KC, Zhang YP, Shields CB, Xu XM, He Z. PKC mediates inhibitory effects of myelin and chondroitin sulfate proteoglycans on axonal regeneration. *Nat Neurosci* 2004, 7: 261-268.
391. Skandsen T, Kvistad KA, Solheim O, et al. Prevalence and impact of diffuse axonal injury in patients with moderate and severe head injury: a cohort study of early magnetic resonance imaging findings and 1-year outcome. *J Neurosurg*. 2010; 113: 556-63.
392. Smith C, Berry M, Clarke WE, Logan A. Differential expression of fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor 1 in a scarring and nonscarring model of CNS injury in the rat. *Eur J Neurosci* 2001, 13: 443-456.
393. Smith C, Gentleman SM, Leclercq PD, Murray LS, Griffin WS, Graham DI, Nicoll JAR. The neuroinflammatory response in humans after traumatic brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2013
394. Smith C, Graham DI, Murray LS, Nicoll JAR. Tau immunohistochemistry in acute brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2003; 29: 496-502
395. Smith DH, Chen XH, Pierce JE, Wolf JA, Trojanowski JQ, et al. Progressive atrophy and neuron death for one year following brain trauma in the rat, *J Neurotrauma* 1997, 14(10): 715-727.
396. Smith DH, Johnson VE, Stewart W. Chronic neuropathologies of single and repetitive TBI: substrates of dementia? *Nat Rev Neurol*. 2013, 9(4): 211-21.

397. Snow DM, Smith JD, Cunningham AT, McFarlin J, Goshorn EC. Neurite elongation on chondroitin sulfate proteoglycans is characterized by axonal fasciculation. *Exp Neurol* 2003, 182: 310–21.
398. Sobeih MM, Corfas G. Extracellular factors that regulate neuronal migration in the central nervous system. *Int J Dev Neurosci* 2002, 20: 349–357.
399. Sozmen EG, Kolekar A, Havton LA, Carmichael ST. A white matter stroke model in the mouse: axonal damage, progenitor responses and MRI correlates. *J Neurosci Methods*. 2009; 180(2): 261–72.
400. Stanic K, Montecinos H, Caprile T. Subdivision of chick diencephalic roof plate: implication in the formation of the posterior commissure. *Dev Dyn* 2010, 239: 2584–2593.
401. Stichel CC, Muller HW. Relationship between injury-induced astrogliosis, laminin expression and axonal sprouting in the adult rat brain. *J Neurocytol* 1994, 23, 615–630.
402. Strich SJ. Diffuse degeneration of the cerebral white matter in severe dementia following head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1956; 19: 163–85.
403. Stys PK, Lipton SA. White matter NMDA receptors: an unexpected new therapeutic target? *Trends Pharmacol Sci* 2007, 28:561–566.
404. Stys PK. General mechanisms of axonal damage and its prevention. *J Neurol Sci* 2005; 233: 3–13.
405. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 75: 1169 –1178.
406. Tang S, Qiu J, Nikulina E, Filbin MT. Soluble myelin-associated glycoprotein released from damaged white matter inhibits axonal regeneration. *Mol. Cell. Neurosci*. 2001, 18: 259–269.
407. Tarlov IM, Klinger H, Vitale S. Spinal cord compression studies I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. *A.M.A. Archiv. Neurol. Psych*. 1953, 70: 813–819.
408. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 1991, 75:15–26.
409. Tator CH, Koyanagi I. Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *J Neurosurg* 1987, 86:483–492.
410. Taylor SR, Smith C, Harris BT, Costine BA, Duhaime AC. Maturation-dependent response of neurogenesis after traumatic brain injury in children. *J Neurosurg Pediatr*. 2013, 12(6): 545–54.

411. Terman JR, Wang XM, Martin GF. Repair of the transected spinal cord at different stages of development in the North American opossum, *Didelphis virginiana*. *Brain Res Bull* 2000, 53:845–855.
412. Tomaselli KJ, Hall DE, Flier LA, Gehlsen KR, Turner DC, Carbonetto S, Reichardt LF. A neuronal cell line (PC12) expresses two b1-class integrins- α 1 b1 and α 3 b1-that recognize different neurite outgrowth-promoting domains in laminin. *Neuron* 1990, 5: 651–662.
413. Totoiu MO, Keirstead HS. Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination. *J Comp Neurol* 2005, 486: 373–383.
414. Trapp BD. Distribution of the myelin-associated glycoprotein and P0 protein during myelin compaction in quaking mouse peripheral nerve. *J. Cell Biol.* 1988, 107: 675–685.
415. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev* 2010; 10: 116–129.
416. Turnley AM, Bartlett PF. MAG and MOG enhance neurite outgrowth of embryonic mouse spinal cord neurons. *Neuroreport* 1998, 9: 1987–1990.
417. Tuszynski MH, Gabriel K, Gage FH, Suhr S, Meyer S, Rosetti A. Nerve growth factor delivery by gene transfer induces differential outgrowth of sensory, motor and noradrenergic neurites after adult spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 1996, **137**: 157–173.
418. Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DPU, Bakay HS, Patel R, Blesch P, et al. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat. Med.* 2005; 11: 551–555.
419. Ughrin YM, Chen ZJ, Levine JM. Multiple regions of the NG2 proteoglycan inhibit neurite growth and induce growth cone collapse. *J. Neurosci.* 2003, 23: 175–186.
420. Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA. Control of synapse number by glia. *Science* 2001, 291: 657– 661.
421. Vainzof M, Marie SKN, Reed UC, Schwartzman JS, Pavanello RCM, Passosbueno MR, Zatz M. Deficiency of merosin (laminin-M or α -2) in congenital muscular-dystrophy associated with cerebral white matter alterations. *Neuropaed* 1995, 26(6): 293–297.
422. van der Staay FJ, Arndt SS, Nordquist RE. Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behav Brain Funct.* 2009 Feb 25;5:11. doi: 10.1186/1744-9081-5-11.
423. van Raamsdonk W, Maslam S, de Jong DH, Smit-Onel MJ, Velzing E: Long term effects of spinal cord transection in zebrafish. swimming performances, and metabolic properties of the neuromuscular system. *Acta Histochem* 1998, 100: 117-131.

424. Varga ZM, Schwab ME, Nicholls JG. Myelin-associated neurite growth-inhibitory proteins and suppression of regeneration of immature mammalian spinal cord in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92:10959–10963.
425. Veldman MB, Bembien MA, Goldman D. Tuba1a gene expression is regulated by KLF6/7 and is necessary for CNS development and regeneration in zebrafish. *Mol Cell Neurosci* 2010, 43: 370-383.
426. Viano DC, Casson IR, Pellman EJ, Zhang L, King AI, Yang KH. Concussion in professional football: brain responses by finite element analysis: part 9, *Neurosurgery* 2005, 57(5): 891–916; discussion 891–916.
427. Wake H, Lee PR, Fields RD. Control of local protein synthesis and initial events in myelination by action potentials. *Science*. 2011; 333(6049): 1647-51.
428. Walker P, Harting MT, Baumgartner JE, Fletcher S, Strobel N, Cox CS Jr. Modern approaches to pediatric brain injury therapy. *J Trauma* 2009; 67(2 Suppl): S120–7.
429. Wang HC, Ma YB. Experimental models of traumatic axonal injury. *J Clin Neurosci*. 2010; 17: 157–62.
430. Wang S, Young KM. White matter plasticity in adulthood. *Neuroscience*. 2014; 276: 148-160.
431. Wang XM, Basso DM, Terman JR, Bresnahan JC, Martin GF. Adult opossums (*Didelphis virginiana*) demonstrate near normal locomotion after spinal cord transection as neonates. *Exp Neurol* 1998a, 151:50–69.
432. Wang XM, Terman JR, Martin GF. Regeneration of supraspinal axons after transection of the thoracic spinal cord in the developing opossum, *Didelphis virginiana*. *J Comp Neurol* 1998b, 398: 83–97.
433. Wang Z, Colognato H, French-Constant C. Contrasting effects of mitogenic growth factors on myelination in neuron-oligodendrocyte co-cultures. *Glia* 2007, 55: 537–545.
434. Wanner M, Lang DM, Bandtlow CE, Schwab ME, Bastmeyer M, Stuermer CA. Reevaluation of the growth-permissive substrate properties of goldfish optic nerve myelin and myelin proteins. *J Neurosci* 1995, 15: 7500–7508.
435. Ward RE, Huang W, Kostusiak M, Pallier PN, Michael-Titus AT, Priestley JV. A characterization of white matter pathology following spinal cord compression injury in the rat. *Neuroscience*. 2014; 260:227-39.
436. Warner MA, Youn TS, Davis T, Chandra A, Marquez de la Plata C, Moore C et al. Regionally selective atrophy after traumatic axonal injury, *Arch Neurol* 2010, 67(11): 1336–1344.

437. Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G. Chapter 1 – The organization of the spinal cord. *In*: Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G. (Eds.), *The Spinal Cord*. Academic Press, San Diego, 2009, pp. 1–7.
438. Weeber EJ, Beffert U, Jones C, Christian JM, Forster E, Sweatt JD, Herz J. Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J Biol Chem* 2002, 277: 39944–39952.
439. Weissman T, Noctor SC, Clinton BK, Honig LS, Kriegstein AR. Neurogenic radial glial cells in reptile, rodent and human: from mitosis to migration. *Cereb Cortex*. 2003; 13(6):550–9.
440. Wells J, Hurlbert J, Fehlings M, Yong VW. Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury. *Brain* 2003; 126: 1628–37
441. Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 1997, 91:439–442.
442. Wilkins JA, Li A, Ni H, Stupack DG, Shen C. Control of beta1 integrin function. Localization of stimulatory epitopes. *The Journal of biological chemistry* 1996; 271: 3046–3051.
443. Wong ST, Henley JR, Kanning KC, et al: A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci* 2002, 5:1302–1308.
444. Woo WM, Berry EC, Hudson ML, Swale RE, Goncharov A, Chisholm AD. The *C. elegans* F-spondin family protein SPON-1 maintains cell adhesion in neural and non-neural tissues. *Development*. 2008;135(16): 2747-56.
445. Woodruff RH, Fruttiger M, Richardson WD, Franklin RJ. Platelet-derived growth factor regulates oligodendrocyte progenitor numbers in adult CNS and their response following CNS demyelination. *Mol Cell Neurosci*. 2004; 25(2): 252-62.
446. Wu D, Miyamoto O, Shibuya S, Mori S, Norimatsu H, Janjua NA, et al. Co-expression of radial glial marker in macrophages/microglia in rat spinal cord contusion injury model. *Brain Res* 2005; 1051:183–188.
447. Wu JC, Huang WC, Chen YC, Tu TH, Tsai YA, Huang SF, Huang HC, Cheng H. Acidic fibroblast growth factor for repair of human spinal cord injury: a clinical trial. *J Neurosurg Spine* 2011; 15(3): 216-27.
448. Wu J-C, Huang W-C, Tsai Y-A, Chen Y-C, Cheng H. Nerve repair using acidic fibroblast growth factor in human cervical spinal cord injury: a preliminary phase I clinical study. *J Neurosurg Spine* 2008; 8: 208–214.

449. Xiong Y, Rabchevsky AG, Hall ED: Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury. *J Neurochem* 2007, 100:639–649.
450. Yang Z, Suzuki R, Daniels SB, Brunquell CB, Sala CJ, Nishiyama A. NG2 glial cells provide a favorable substrate for growing axons. *J. Neurosci.* 2006, 26, 3829–3839.
451. Yasui K, Hashizume Y, Yoshida M, Kameyama T, Sobue G. Age-related morphologic changes of the central canal of the human spinal cord. *Acta Neuropathol.* 1999; 97(3): 253-9.
452. Yin X, Crawford TO, Griffin JW, Tu Ph, Lee VM, Li C, Roder J, Trapp BD. Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J. Neurosci.* 1998, 18, 1953–1962.
453. Yiu G, He Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 2006, 7:617–627.
454. Yong VW, Dooley NP, Noble PG. Protein kinase C in cultured adult human oligodendrocytes—A potential role for isoform A as a mediator of process outgrowth. *J. Neurosci. Res.* 1994, 39(1): 83–96.
455. Yong VW, Wells J, Giuliani F, Casha S, Power C, Metz LM. The promise of minocycline in neurology. *Lancet Neurol* 2004, 3(12):744-51.
456. Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, Taniguchi K, Kano H, Mizuno M, Inazu T, Mitsuhashi H, Takahashi S, Takeuchi M, et al. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* 2001, 1: 717–724.
457. Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Leonard EJ. Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *J Immunol* 1989;142: 1956 –1962.
458. Young-Pearse TL, Bai J, Chang R, Zheng JB, LoTurco JJ, Selkoe DJ. A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J Neurosci* 2007, 27: 14459–14469.
459. Ypsilanti AR, Zagar Y, Chedotal A. Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. *Development* 2010, 137: 1939–1952.
460. Yu WR, Westergren H, Farooque M, Holtz A, Olsson Y. Systemic hypothermia following spinal cord compression injury in the rat: an immunohistochemical study on MAP 2 with special reference to dendrite changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 2000, 100:546–552.
461. Zawadzka M, Rivers LE, Fancy SP, Zhao C, Tripathi R, Jamen F, Young K, Goncharevich A, Pohl H, Rizzi M, Rowitch DH, Kessaris N, Suter U, Richardson WD, Franklin RJ. CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. *Cell Stem Cell* 2010, 6:578–590.

- 462. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 2008; 132: 645–660.
- 463. Zhao S, Hu X, Park J, Zhu Y, Zhu Q, Li H, Luo C, Han R, Cooper N, Qiu M. Selective expression of LDLR and VLDLR in myelinating oligodendrocytes. *Dev Dyn.* 2007; 236(9): 2708-12.
- 464. Zheng B, Ho C, Li S, Keirstead H, Steward O, Tessier-Lavigne M. Lack of enhanced spinal regeneration in Nogo deficient mice. *Neuron* 2003, 38: 213–224.
- 465. Zhou T, Zhang Y, Sun G, et al. Anti-P-selectin lectin-EGF domain monoclonal antibody inhibits the maturation of human immature dendritic cells. *Exp Mol Pathol.* 2006, 80(2): 171–6.
- 466. Zhou YX, Flint NC, Murtie JC, Le TQ, Armstrong RC. Retroviral lineage analysis of fibroblast growth factor receptor signaling in FGF2 inhibition of oligodendrocyte progenitor differentiation. *Glia* 2006, 54: 578–590.
- 467. Zisman S, Marom K, Avraham O, Rinsky-Halivni L, Gai U, et al. Proteolysis and membrane capture of F-spondin generates combinatorial guidance cues from a single molecule. *J Cell Biol* 2007, 178: 1237–49.
- 468. Zito K, Svoboda K. Activity-dependent synaptogenesis in the adult mammalian cortex. *Neuron* 2002, 35, 1015–1017.
- 469. Zorner B, Schwab ME. Anti-Nogo on the go: from animal models to a clinical trial. *Ann N Y Acad Sci* 2010, 1198(Suppl 1): E22–34.
- 470. Zuo J, Neubauer D, Dyess K, Ferguson TA, Muir D: Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neuritepromoting potential of spinal cord tissue. *Exp Neurol* 1998, 154:654-666.
- 471. Zuo Y, Yang G, Kwon E, Gan WB. Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex. *Nature* 2005, 436: 261–265.

Résumé

Ce travail évalue l'efficacité d'un peptide dérivé d'une protéine TSR dans la réparation des lésions traumatiques de la substance blanche du système nerveux central. Les propriétés neuroprotectrices ont été explorées sur l'activité anti-oxydante et anti-apoptotique. Le NX210 augmente la viabilité des cellules B104 exposées au peroxyde d'oxygène, un des principaux radicaux oxygénés de la réaction secondaire. Le mécanisme anti-apoptotique a été étudié par la mesure de l'activité anti-caspase. Le NX210 inhibe l'activité des caspases 3/7 selon un effet dose dépendant. Les propriétés neuroréparatrices ont été testées sur des modèles de lésions médullaires chez le rat. Dans un modèle de section médullaire, le NX210 stimule précocement la croissance axonale et la fasciculation. Deux molécules impliquées dans la fasciculation, les neurofilaments et la laminine, sont colocalisées au niveau de la repousse. L'efficacité clinique du NX210 a été testée sur un modèle de contusion médullaire. Le poids corporel était précocement et constamment supérieur chez les animaux traités par rapport aux témoins. L'amélioration motrice évaluée en «open-field» comprenait une augmentation de la distance parcourue et une diminution du temps passé dans les cellules centrales. Un score de BBB supérieur à 14 chez les animaux traités signait la restauration de la coordination des mouvements entre les membres thoraciques et les membres pelviens. La normalisation des réflexes pouvait être corrélée à la restitution du contrôle supraspinal, notamment par la repousse des fibres corticospinales, rubrospinales et extéroceptives. L'action sur le recrutement cellulaire a été étudiée sur un modèle de section du corps calleux en immunohistochimie. La réalisation d'une lésion proche de la zone subventriculaire permettait d'explorer le recrutement cellulaire à partir de cette niche à cellules souches. L'absence de cellule NeuN+ tendrait à démontrer l'absence de recrutement neuronal. Le marquage au MBP montrait des débris de myéline à distance du foyer lésionnel liés à des phénomènes de dégénérescence wallérienne ou d'excitotoxicité. La présence de cellules GFAP+ et NG2+ sur le site lésionnel témoignait d'un recrutement astrocytaire et oligodendrocytaire.

Summary

In this work, we have studied the efficacy of a TSR-derived peptide in white matter repair. Neuroprotective properties were studied using two models of oxidative stress and apoptosis *in vitro*. NX210 increases cell viability after exposition to H₂O₂, one the the main ROS that take part in the secondary lesion. Anti-oxidant action was mediated by the scavenger property of the molecule and the stimulation of signaling pathway. Anti-apoptotic action was assessed by measuring caspase3/7 activity. NX210 inhibits caspase3/7 activity according to a dose effect relation. Neurorepair was assessed using two separate rat models of spinal cord injury (SCI). In the model provided by section of both dorsal funiculi, NX210 stimulates early axonal growth that predominates on sensory fibers and displays a fasciculate organization. At the site of regrowth, neurofilaments were colocalized with laminin, a molecule involved in fasciculation and axonal guidance during embryogenesis. Clinical efficiency was assessed using a contusive model of SCI. Body weight was early and constantly increased in NX210 treated animals as compared to vehicle treated animals. Improvement in locomotor behavior was appraised with the open field tests. Path length was significantly increased while time spent in central cells was constantly decreased in NX210 treated animals. A BBB score above 14 only performed by NX210 treated animals was related to the restoration of coordination between forelimbs and hind limbs. Normalization of reflexes such as paw placement and toe spread in NX210 treated animals could be correlated to the recovery of supraspinal control. The action on cell recruiting was assessed by immunohistochemistry using a rat model of corpus callosum section. The lesion was performed near the subventricular zone to study cell proliferation and migration from the stem cell niche to the site of injury. The lack of NeuN immunostaining confirmed the absence of neural cells recruitment. Myelin debris identified by MBP immunostaining were located at a distance from the site of injury. GFAP and NG2 cells significantly more numerous in NX210 treated animals identified astrocyte and oligodendrocyte recruitment all around the lesion site.