HAL
open science

Translocator protein comme marqueur de neuro-inflammation microgliale suite au traumatisme crânien : de l'imagerie en tomographie par émission de positons à l'analyse cellulaire

Clément Delage

To cite this version:

Clément Delage. Translocator protein comme marqueur de neuro-inflammation microgliale suite au traumatisme crânien : de l'imagerie en tomographie par émission de positons à l'analyse cellulaire. Pharmacologie. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP5001 . tel-03223083

HAL Id: tel-03223083

https://theses.hal.science/tel-03223083v1

Submitted on 10 May 2021

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.

Université de Paris

École Doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries
(ED 563 – MTCI)

EA 4475 – « Pharmacologie de la circulation cérébrale »
UMR-S 1144 – « Optimisation thérapeutique en neuropsychopharmacologie »

Translocator Protein comme marqueur de neuro-inflammation microgliale suite au traumatisme crânien : de l'imagerie en tomographie par émission de positons à l'analyse cellulaire.

Par Clément DELAGE

Thèse de doctorat de Pharmacologie

Dirigée par le Pr Valérie BESSON

Présentée et soutenue publiquement le 31 janvier 2020

Devant un jury composé de :

Vincent BEREZOWSKI, professeur des universités, Université de Lille	Rapporteur
Bruno GONZALEZ, directeur de recherche, Université de Rouen	Rapporteur
Carine ALI, professeur des universités, Université de Caen	Examinatrice
Philippe GARNIER, maître de conférences, Université de Dijon	Examinateur
Catherine MARCHAND-LEROUX, professeur des universités, Université de Paris	Examinatrice
Valérie BESSON, professeur des universités, Université de Paris	Directrice de thèse

Except where otherwise noted, this is work licensed under
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/

FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Université de Paris

EA4475

Inserm UMR-S 1144

Optimisation Thérapeutique en Neuropsychopharmacologie

Gueules Cassées
Sourire Quand Même

Union des Blessés de la Face et de la Tête
Fondation des "Gueules Cassées"

mtci

Ecole Doctorale
Médicament - Toxicologie
Chimie - Imageries

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à exprimer toute ma gratitude au Pr Vincent Bérézowski et au Dr Bruno Gonzalez pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs, ainsi qu'au Pr Carine Ali et au Dr Philippe Garnier pour avoir accepté de siéger dans ce jury en tant qu'examinateurs.

Je remercie également le Pr Valérie Besson pour la confiance qu'elle m'a accordé dès mon stage de Master 2, pour sa patience dans mon encadrement et ses conseils qui me seront précieux pour mon avenir professionnel.

Je remercie tout particulièrement le Pr Catherine Marchand-Leroux pour m'avoir ouvert les portes du monde universitaire, ainsi que pour l'attention, la gentillesse et la disponibilité dont elle a fait preuve envers moi, comme envers tous ses étudiants.

Je remercie le Pr Michel Vidal, sans qui cette aventure n'aurait pas eu lieu.

Je remercie tous les collaborateurs des travaux ayant fait l'objet de cette thèse, le Pr Laure Sarda-Mantel et les Drs Coralie Guérin, Benoit Hosten, Nathalie Rizzo-Padoin, Bruno Saubaméa et Nicolas Vignal pour leur contribution, leur aide et leur sympathie.

Je remercie le Dr Vanessa Bloch et le Pr Françoise Brion, ainsi que tous mes confrères hospitaliers, pour leur soutien et leurs encouragements.

Je remercie tout le personnel du laboratoire qui m'a accompagné pendant ces années de recherche. Les Drs Claire Leconte, Virginie Berthat, Raymond Mongeau et Dominique Lerouet pour m'avoir accompagné avec bienveillance sur la voie de l'enseignement, le Pr Isabelle Margaill et Mme Audrey Lesturgie pour les veillées nocturnes, M Bérard Coqueran pour son expertise chirurgicale, et, bien évidemment, le Dr Bruno Palmier et Mme Nicole Croci pour leur bonne humeur permanente, leur esprit d'équipe et leurs précieux conseils techniques.

Je remercie les anciens doctorants de l'unité, les Dr Kahina Khacef, Célia Mamma et Toufik Taib pour leur accueil et l'expérience qu'ils m'ont transmise.

Je remercie ceux sans qui un doctorant n'irait pas loin, les stagiaires, Paola Cristofari, Albert Gomez Morillaz, Clément Barboteau, Laia Iglesias Rebull et Ina Zanaj, pour leur aide et leur amitié.

Je remercie mes co-doctorants de la faculté, les Dr Rémi Corne et Geoffroy Goujon, ainsi que les Dr Alison Domingues et Lucie Valéro, sans qui ces années de thèse n'auraient pas eu la même saveur.

Enfin, j'ai une pensée toute particulière pour ma famille, mes parents, ma sœur, mon frère, mes beaux-frères, ma nièce, mes neveux et Aurélie, pour tout ce qu'ils m'ont apporté jusqu'à présent et depuis bien avant cette thèse.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS ..... **II**
SOMMAIRE ..... **III**
PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS ET ENCADREMENTS ..... **VII**
ABREVIATIONS ..... **IX**
LISTE DES FIGURES ..... **XIV**
LISTE DES TABLEAUX ..... **XVI**
INTRODUCTION **1**
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES **2**
CHAPITRE 1 : LE TRAUMATISME CRANIEN **2**
1. Définition 2
2. Epidémiologie 3
2.1. Incidence 3
2.2. Prévalence 4
2.3. Etiologies 4
2.4. Le TC dans la pratique sportive 4
2.5. Morbi/mortalité 6
2.6. Coûts 6
3. Symptômes et conséquences 7
3.1. Symptômes de la phase aiguë 7
3.2. Symptômes à plus long terme 7
4. Prise en charge du TC 8
4.1. Diagnostic et évaluation de la gravité 9
4.2. Prise en charge 10
4.2.1. Pré-hospitalière 10
4.2.2. A l'hôpital 10
4.3. Prévention 11
4.4. Cas du milieu sportif 12
5. Physiopathologie 13
5.1. Lésions primaires et physiques 13
5.2. Lésions secondaires 15
5.2.1. Composantes moléculaires et cellulaires 15
5.2.2. Composantes vasculaires 17
CHAPITRE 2 : LA NEURO-INFLAMMATION **19**
1. Définition 19
2. Mécanisme général 19
3. Initiation 19
4. Les éléments cellulaires 21

4.1. Les cellules gliales 21
4.1.1. La microglie 22
4.1.1.1. Origine et fonctions physiologiques 22
4.1.1.2. L'activation microgliale 24
4.1.1.3. Les différents phénotypes 24
4.1.1.4. Rôle et conséquence dans la NI 29
4.1.2. Les astrocytes 30
4.2. Les autres cellules 31
4.2.1. Neurones 31
4.2.2. Cellules immunitaires périphériques 32
5. Les cytokines, médiateurs moléculaires 34
6. Conséquences 37
6.1. In vitro 37
6.2. In vivo 39
6.2.1. Lésions de la substance blanche 39
6.2.1.1. Démyélinisation 39
6.2.1.2. Les lésions axonales diffuses 41
6.2.1.3. Implications de la microglie 42
6.2.2. Conséquences au long terme 42
6.2.2.1. L'encéphalopathie chronique post-traumatique 42
6.2.2.2. La maladie d'Alzheimer 43
6.2.2.3. La maladie de Parkinson 44
6.2.2.4. Autres pathologies neurodégénératives 44
6.2.2.5. Autres conséquences cliniques 44
CHAPITRE 3 : VISUALISATION ET SUIVI DE LA NEURO-INFLAMMATION ET DE L'ACTIVATION MICROGLIALE 46
1. Techniques d'imagerie 46
1.1. Méthode par tomographie par émission de positons 46
1.1.1. Marqueurs de la microglie 49
1.1.1.1. Translocator protein 49
1.1.1.2. Autres marqueurs 53
1.1.2. Marqueurs d'autres éléments liés à la NI 54
1.2. Méthode par résonance magnétique 55
1.2.1. L'imagerie par résonance magnétique 55
1.2.2. Spectroscopie par résonance magnétique 56
1.2.2.1. Evaluation de l'activation microgliale 56
1.2.2.2. Evaluation de la neuro-inflammation 57
2. Analyse des fluides 58
2.1. Techniques d'analyse 58
2.2. Marqueurs microgliaux 58

2.3. Marqueurs généraux de la NI 59
2.4. Autres fluides 60
3. Méthodes classiquement utilisées en préclinique 60
3.1. Techniques d'analyse 60
3.1.1. Techniques d'analyse directes 61
3.1.2. Techniques d'analyse indirectes 63
3.2. Marqueurs de suivi 64
3.2.1. Marqueurs microgliaux 64
3.2.1.1. Marqueurs de référence 65
3.2.1.2. Marqueurs expérimentaux 67
3.2.2. Marqueurs de NI 69
3.2.3. Gènes spécifiques de la microglie 69
BUT DU TRAVAIL 71
MATERIELS ET METHODES 72
1. Ethique et animaux 72
2. Modèle de traumatisme crânien 72
2.1. Principe, réglages et procédure chirurgicale 72
2.2. Evaluation de la prise en main du modèle 73
2.2.1. Evaluation de l'œdème cérébral 73
2.2.2. Evaluation des déficits neurologiques 74
3. Imagerie par tomographie par émission de positon 75
3.1. Définition et principe 75
3.2. Marqueur utilisé 76
3.3. Protocole 76
3.4. Matériel et logiciels utilisés 78
3.5. Quantification 78
3.6. Comparaisons statistiques 79
4. Immunohistochimie 80
4.1. Principe 80
4.2. Préparation des coupes de cerveaux 80
4.2.1. Mise à mort des animaux 80
4.2.2. Coupe des cerveaux 80
4.3. Protocole de marquage 81
4.4. Analyse et quantification des images 82
4.5. Anticorps utilisés 83
5. Immunocytochimie 85
5.1. Cultures de lignées de cellules endothéliales cérébrales murines (Bend3) 85
5.2. Cultures primaires de cellules microgliales 85
5.3. Protocole de marquage 86
5.4. Anticorps utilisés 86

6. Cytométrie en flux 87
6.1. Principe 87
6.2. Protocole 87
6.2.1. Titration 87
6.2.2. Passage des échantillons 87
6.3. Préparation des échantillons 87
6.4. Immunomarquages 90
6.5. Acquisition des données 92
6.5.1. Passage des échantillons 92
6.5.2. Analyse des données 92
6.5.2.1. Définition des populations cibles 92
6.5.2.2. Quantifications 95
7. Données et analyses statistiques 95
RESULTATS 96
1. Prise en main du modèle de TC chez la souris 96
1.1. Evaluation de l'œdème cérébral 96
1.2. Mesure du score neurologique 98
1.3. Bilan sur la prise en main du modèle 98
2. Etude de l'expression de TSPO 99
3. Phagocytose des débris de myéline 149
3.1. Phagocytose des débris de myéline 149
3.2. Nombre de microglies 151
3.3. Débris de myéline 151
3.4. Microglies ayant phagocyté des débris de myéline 152
3.5. Conclusion 153
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 155
BIBLIOGRAPHIE 159

PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS ET ENCADREMENTS

Publications

Delage C, Vignal N, Guerin C, Taib T, Barboteau C, Mamma C, Khacef K, Margaill I, Sarda-Mantel L, Rizzo-Padoin N, Hontonnou F, Saubamea B, Marchand-Leroux C, Lerouet D, Hosten B, Besson V. The 18-kDA translocator protein in traumatic brain injury: from positron emission tomography to cell analysis. [En préparation]

Delage C, Taib T, Mamma C, Badaut J, Gressens P, Lerouet D, Besson VC. Traumatic brain injury: an age-dependent view of post-traumatic neuroinflammation. [En préparation]

Mamma C, Gomez Morillas A, **Delage C**, Taib T, Lebon S, Palmier B, Leconte C, Van Steenwinckel J, Lawson R, Ishikawa A, Novak AC, Gressens P, Marchand-Leroux C, Besson VC, Lerouet D. Microglial polarization induced by myelin debris *in vitro.* [En préparation]

Communications affichées

Delage C, Vignal N, Taib T, Mamma C, Khacef K, Margaill I, Sarda-Mantel L, Rizzo-Padoin N, Hontonnou F, Saubamea B, Marchand-Leroux C, Lerouet D, Hosten B, Besson V. Temporal pet imaging of TSPO in a mice model of mild traumatic brain injury. *European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, 10-13 juillet 2019, Porto, Portugal.*

Encadrements

Paola CRISTOFARI (stage de 6 semaines) – Licence de biochimie et biologie moléculaire, Université de Corse – Pasquale Paoli – *Étude de l'expression de TSPO comme marqueur d'activation microgliale lors d'une neuro-inflammation induite par un traumatisme crânien chez la souris* (mai – avril 2017).

Albert GOMEZ-MORILLAS (stage de 7 mois) – Etudiant ERASMUS 5ème année de Pharmacie, Université de Barcelone – *Debris myelin phagocytosis by microglia after a mild TBI in mice* (septembre 2017 – février 2018).

Clément BARBOTEAU (stage de 2 mois) – Etudiant en DFGSP3 – *Cellules immunitaires et expression de TSPO après un traumatisme crânien chez la souris* (mai – juillet 2019).

Laia IGLESIAS REBULL (stage de 3 mois) – Etudiant ERASMUS 5ème année de Pharmacie, Université de Barcelone – *TSPO expression by central nervous system cells after a traumatic brain injury in mice.* (septembre – décembre 2019).

Ina ZANAJ (stage de 3 mois) – Etudiant ERASMUS 5ème année de Pharmacie, Université de Londres – *Immune cells and TSPO+ cells after traumatic brain injury in mice : a FACS analysis* (septembre – décembre 2019).

ABREVIATIONS

Aβ : β-amyloïde

Ac I : Anticorps primaire

Ac II : Anticorps secondaire

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

ANT : Translocase ATP/ADP

Arg1 : Arginase 1

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

ATP : Adénosine triphosphate

BDNF : Brain-derived neurotrophic factor

BHE : Barrière hémato-encéphalique

CB : Récepteur aux cannabinoïdes

CC : Commotion cérébrale

CCL : C-C motif ligand

CD : Cluster of differentiation

CF : Cytométrie en flux

CMH II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

COX : Cyclo-oxygénase

CXCL : C-X-C motif ligand

DAMP : Damage-associated molecular pattern

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

ECPT : Encéphalopathie chronique post-traumatique

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ERN : Espèces réactives de l'azote

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FEPPA : N-(2-(2-fluoroéthoxy)benzyl)-N-(4-phénoxypyridin-3-yl)acétamide

FMO : Fluorescence minus one

FSC : Forward scatter

GABA : Acide γ-aminobutyrique

GFAP : Glial fibrillary acid protein

GCS : Glasgow coma scale

HBSS : Hank's balanced salt solution

HMGB1 : High mobility group box 1

HSP : Heat shock protein

HTIC : Hypertension intracrânienne

Iba1 : Ionazide calcium-binding adapter molecule-1

ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule-1

ICC : Impact cortical contrôlé

IHC : Immunohistochimie

IFN-γ : Interféron-γ

IL : Interleukine

IRM : Imagerie par résonance magnétique

LAD : Lésion axonale diffuse

LCR : Liquide céphalorachidien

LPS : Lipopolysaccharide

LSB : Lésions de la substance blanche

MBP : Myelin basic protein

mI : Myo-inositol

MMP : Métalloprotéinase de la matrice extracellulaire

NGF : Nerve growth factor

NI : Neuro-inflammation

NLR : NOD-like receptor

NO : Non opéré

NOS : NO-synthase

NOSi : NO-synthase inductible

NOX : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxydase

OL : Oligodendrocyte

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPC : Précurseur oligodendrocytaire

PBR : Peripheral benzodiazepine receptor

PBS : Phosphate-buffered saline

PFA : Paraformaldéhyde

PLA2 : Phospholipase A2

PNN : Polynucléaire neutrophile

PRR : Pattern recognition receptor

rt-PCR : Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

SB : Substance blanche

Siglec-h : Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin H

SNC : Système nerveux central

SRM : Spectrométrie par résonnance magnétique

SSC : Side scatter

SUV : Standard uptake value

TC : Traumatisme crânien

TEP : Tomographie par émission de positons

TGF-β : Tumor growth factor-β

TLR : Toll-like receptors

TNF-α : Tumor necrosis factor-α

TO : Témoin opéré

TSPO : Translocator protein

VDAC : Canal ionique voltage-dépendant

WB : Western blot

Ym1 : Chitinase-3-like-3

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Lésions primaires et secondaires, et symptomatologie post-traumatique.... 15
Figure 2 : Mécanismes induisant les lésions secondaires à partir des lésions primaires. 17
Figure 3 : Mécanismes d'initiation de la NI. 20
Figure 4: Microglies observées au microscope 23
Figure 5 : Les différents phénotypes d'activation microgliale 25
Figure 6 : Propriétés et marqueurs des sous-types du phénotype M2 : M2a, M2b et M2c 28
Figure 7 : Astrocytes observés au microscope interagissant avec les capillaires sanguins 30
Figure 8 : Infiltration leucocytaire (d'après Lagarrigue et al., 2016). 33
Figure 9 : Principaux marqueurs et cibles utilisés dans le suivi des conséquences du TC par imagerie 48
Figure 10 : Structure et rôle du récepteur TSPO. 50
Figure 11 : Les différents radioligands de TSPO utilisés en TEP 51
Figure 12 : Illustration du principe des techniques immunochimiques. 61
Figure 13 : Principe de fonctionnement des analyses par cytométrie en flux. 63
Figure 14 : Marqueurs protéiques utilisables expérimentalement pour mettre en évidence les microglies et leurs différents phénotypes en immunofluorescence 66
Figure 15 : Illustration de la zone de la craniotomie et du site d'impact 73
Figure 16 : Protocole expérimental de l'étude statique en TEP 77
Figure 17 : Application des ROI, prédéfinies par le logiciel PMOD, sur les images d'un cerveau de souris obtenues en TEP après traitement. 79
Figure 18 : Régions de quantification des marquages de TSPO et d'Iba1 83
Figure 19 : Protocoles de dissociation tissulaire et d'immunomarquage. 88
Figure 20 : Stratégie de sélection des différentes populations cellulaires en CF. 94
Figure 21 : Etude de l'œdème cérébral dans le cortex ipsilatéral à J1 et J2 après le TC. 97
Figure 22 : Etude de l'œdème cérébral dans le cortex controlatéral à J1 et J2 après le TC. 97

Figure 23 : Etude du score neurologique à J2 et J7 après un TC. 98
Figure 24 : Photographies de cortex ipsilatéral de souris 3 jours après un TC. 150
Figure 25 : Ratio ipsi/controlateral du nombre de microglies (cellules iba1^{+}) dans le cortex 151
Figure 26 : Ratio ipsi/contralatéral de la surface de marquage de débris de myéline mesurée au niveau cortical. 152
Figure 27 : (A) Ratio ipsi/contralatéral du nombre de microglies ayant phagocyté des débris de myéline dans le cortex. (B) Ratio ipsi/contralatéral du pourcentage de microglies ayant phagocyté des débris de myéline rapporté au nombre total de microglies dans chaque cortex. 153

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Score de coma de Glasgow. 3
Tableau 2 : Marqueurs les plus prometteurs pour le suivi de la NI par des dosages dans le sang et/ou le LCR 60
Tableau 3 : Cytokines sécretées par les phénotypes microgliaux. 67
Tableau 4 : Expression des marqueurs immunitaires spécifiques des microglies humaines 68
Tableau 5 : Score attribué pour chaque paramètre du score neurologique sur 20 points 75
Tableau 6: Nombre de souris analysées en TEP en fonction du groupe et du temps étudié. 77
Tableau 7 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les études immunohisto- et cytochimiques. 84
Tableau 8 : Références et dilutions des anticorps, et de leurs cibles, utilisés pour la cytométrie en flux. 91

INTRODUCTION

Le traumatisme crânien (TC) est un problème majeur de santé publique. Qu'il soit sévère, modéré ou léger, unique ou répété, le TC peut laisser des séquelles parfois très lourdes à ceux qui y survivent. Epilepsie, maladies d'Alzheimer et de Parkinson, sclérose en plaques, dépression, anxiété, troubles addictifs font partie de la liste des pathologies que favoriseraient le TC, et qui s'allonge au fur et à mesure des études épidémiologiques. Le TC prend ainsi depuis quelques années une allure d'épidémie silencieuse pour laquelle il n'y a encore aucun traitement à l'heure actuelle.

L'évolution récente des connaissances sur la physiopathologie post-traumatique incrimine de plus en plus la neuro-inflammation (NI) dans la survenue au long terme des complications cognitives, psychiatriques et neurologiques. Bien qu'elle soit une réaction physiologique de défense du système nerveux central (SNC), la NI semble se déréguler en devenant chronique après le TC, et participer aux lésions de la substance blanche (LSB) à l'origine notamment des troubles neuropsychocomportementaux post-traumatiques. La modulation de la NI apparait dès lors comme une stratégie thérapeutique prometteuse pour la prévention des séquelles post-traumatiques. Plus précisément, la microglie, principale actrice du système immunitaire du SNC et chef d'orchestre de la NI, se révèle être une cible de choix. Si son implication dans les LSB ne fait plus de doute, la complexité de son activation suite à un TC rend difficile l'étude des conséquences de sa modulation. En effet, outre ses propriétés pro-inflammatoires et neurotoxiques, la microglie semble également posséder des propriétés neuroprotectrices, indispensables à la résolution de la NI.

Ainsi, pour poursuivre l'exploration du rôle des microglies et étudier plus spécifiquement les effets de leur modulation, il devient indispensable de disposer de méthodes spécifiques, sensibles et transposables en clinique. C'est dans ce contexte que mes travaux de thèse ont étudié par diverses techniques l'expression de translocator protein (TSPO), décrite jusqu'ici comme spécifique des microglies, et son utilisation comme marqueur pour le suivi de la NI microgliale.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE 1 : LE TRAUMATISME CRANIEN

1. Définition

Le traumatisme crânien (TC) désigne toute altération du fonctionnement cérébral ou autre évidence d'atteinte cérébrale induite par une force extérieure (Menon et al., 2010), en présence ou non d'impact et/ou de fracture.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit le TC comme « une lésion cérébrale aiguë résultant de l'exercice d'une pression mécanique sur la tête par une force externe ou causée par une lésion pénétrante de la boîte crânienne », à l'exclusion des manifestations « liées à la drogue, à l'alcool, aux médicaments ou causées par d'autres blessures (ex : blessures systémiques, blessures au visage ou intubation) ou d'autres problèmes (ex : traumatisme psychologique, barrière de la langue ou problèmes médicaux associés) ». Cette définition est largement utilisée, mais une ambiguïté subsiste en ce qui concerner la définition de « lésion cérébrale aiguë ». De plus, cette définition exclut les patients présentant une fracture de la boîte crânienne et se concentre ainsi sur les TC légers (Maas et al., 2017).

Le TC se caractérise par une grande hétérogénéité en termes d'étiologie, de mécanisme, de physiopathologie, de sévérité et de symptomatologie (Maas et al., 2015). Ces dernières décennies, l'appréhension de cette pathologie a évolué. Auparavant considérée comme une affection aiguë dont les symptômes étaient principalement passagers et ne nécessitant de prise en charge que lorsque le pronostic vital était engagé, le TC est maintenant vu de manière chronique, comme initiateur de phénomènes pathologiques sous-jacents pouvant progresser pendant des heures, des jours, des semaines voire des années et favoriser la survenue de neurodégénérescence à long terme.

La prise en compte de ces notions dans le milieu sportif, où le TC est appelé commotion cérébrale (CC), traduit probablement le mieux l'évolution de nos connaissances sur ces pathologies, en imposant de plus en plus d'équipements protecteurs et en allant jusqu'à modifier les règles dans certains sports.

D'un point de vue clinique, l'échelle de coma de Glasgow (GCS pour « Glasgow Coma Scale ») permet l'évaluation et la classification des TC selon l'état de conscience et la profondeur du coma. Développé en 1974 (Teasdale & Jennett, 1974), ce score est établi en fonction des réponses motrice, verbale et oculaire et permet de classifier les TC en léger, modéré ou sévère (Tableau 1).

Score	Réponse motrice	Réponse verbale	Réponse oculaire
6	Exécution des ordres simples		
5	Orientée à la douleur	Orientée	
4	Retrait à la douleur	Confuse	Spontanée
3	Flexion anormale	Inappropriée	A la parole
2	Extension à la douleur	Incompréhensible	A la douleur
1	Aucune	Aucune	Aucune

Tableau 1 : Score de coma de Glasgow.
Si le score total est ≥ 13, le TC est dit léger ; si le score total se situe entre 9 et 12, le TC est dit modéré ; si le score total est ≤ 8, le TC est dit sévère.

2. Epidémiologie

2.1. Incidence

Le TC est une pathologie largement répandue à travers le monde. On estime à plus de 50 millions le nombre de TC qui se produisent chaque année (Feigin et al., 2013 ; Maas et al., 2017). En Europe, malgré une grande disparité d'incidence en fonction des pays, on estime à 2,5 millions le nombre de TC chaque année (Maas et al., 2017), provoquant 1,5 millions de passage aux urgences et 57 000 morts (Majdan et al., 2016). En 2013, il a été estimé 375 000 années de vies perdues en Europe à cause du TC (Majdan et al., 2017).

Aux Etats-Unis, on estime à 3,5 millions le nombre annuel de TC (Coronado et al., 2012), qui seraient responsables de 2 millions de passage aux urgences, 282 000 hospitalisations et 56 000 décès (Taylor et al., 2017 ; Maas et al., 2017).

Avec l'âge, le risque de survenue de TC augmente, ainsi que la gravité de leurs conséquences. Les personnes de plus de 65 ans représentent 10% des TC, mais 50% des décès liés à un TC à 10 ans (Maas et al., 2017). Si le taux de mortalité lié aux TC est le plus important chez les plus de 60 ans (Steudel et al., 2005) dans les pays

développés, ce dernier reste la première cause de décès chez les enfants et les adolescents (Maas et al., 2017).

2.2. Prévalence

Certaines études ont estimé que (1) 30% des moins de 25 ans ont déjà subi dans leur vie un TC ayant nécessité une attention médicale (McKinlay et al., 2008) et (2) qu'à l'échelle d'une vie et vu l'augmentation de l'incidence chez les personnes âgées, 50% de la population en subira un au moins une fois dans sa vie (Maas et al., 2017).

2.3. Etiologies

Depuis la diminution des accidents de la route amorcée dans les années 70 dans les pays développés, les chutes y sont devenues la première cause de TC (Peeters et al., 2015 ; Maas et al., 2017 ; Brazinova et al., 2018). A l'inverse, dans les pays en voie de développement, le nombre de TC dus aux accidents de la route est en augmentation (Steudel et al., 2005).

Cependant, dans les pays développés, les causes varient en fonction de l'âge. De 0 à 4 ans la principale cause est la chute, de 5 à 14 ans ce sont les chutes et les chocs avec des objets, de 15 à 24 ans les accidents de la route prédominent (Taylor et al., 2017) et chez les personnes âgées, ce sont à nouveau les chutes qui sont mises en causes (Pearn et al., 2017).

Les adolescents et les jeunes adultes sont également de plus en plus concernés par les TC liés à la pratique sportive, bien qu'ils soient peu diagnostiqués, pris en charge et comptabilisées, ce qui rend difficile leur évaluation (cf. §2.4 du présent chapitre).

Enfin, les conflits militaires sont sources de TC, puisque 20 à 25% des militaires américains blessés lors du second conflit irakien ont subi un TC (Owens et al., 2008), dont 82 % de TC légers (Maas et al., 2017).

2.4. Le TC dans la pratique sportive

La CC, terme communément retrouvé dans le milieu sportif, qualifie un TC léger voire modéré, avec généralement perte de connaissance mais sans fracture du crâne et, en général, pas de blessure apparente à la tête à part de possibles coupures superficielles au visage, au front ou au cuir chevelu. Le collège des enseignants en neurologie décrit la CC comme un ébranlement du cerveau consécutif à une chute ou à un coup sur le crâne,

accompagné ou non d'une perte de connaissance temporaire ou initiale. Il peut y avoir des lésions, mais qui sont alors microscopiques et non visibles en imagerie conventionnelle.

Les CC peuvent entraîner un syndrome post-commotionnel constitué de symptômes cliniques visibles (céphalées, vertiges, troubles neuropsychiques variés, troubles du sommeil) dans les heures qui suivent, mais également des troubles de l'attention et de la mémoire qui peuvent persister jusqu'à 2 mois après le TC, malgré une apparente rémission et la disparition des symptômes (Hammeke et al., 2013).

Depuis quelques années, le TC dans le sport est au centre de l'attention du grand public, du fait de la découverte du syndrome de second impact (deux CC à moins de 48h d'intervalle) dont les conséquences sont potentiellement graves, voire vitales (Cantu, 1998 ; Bey & Ostick, 2009), et de la corrélation entre les CC et la survenue de déficits cognitifs tardifs, d'encéphalopathie chronique post-traumatique (ECPT) et de pathologies neurodégénératives, même plusieurs décennies après (Gavett et al., 2011). L'incidence de ces encéphalopathies a été montrée comme corrélée à la durée de la pratique de sports à risque (McKee et al., 2013).

Aux Etats-Unis, il est recensé entre 1,6 et 3,8 millions de CC par an dans ce cadre mais ce chiffre est semble-t-il largement sous-estimé, la majorité des CC n'étant pas diagnostiqués ou déclarés, de manière volontaire ou par manque de sensibilisation (Maas et al., 2017). Il est également difficile d'estimer statistiquement et avec précision quels sports sont les plus à risque de CC, à cause des variations de définition de la CC et de comptabilité du temps de pratique en fonction des sports et des pays. Cependant, il ressort nettement des différentes études menées sur ce sujet que les sports les plus à risque sont l'équitation, le cyclisme, le rugby, le football américain et le hockey sur glace (Maas et al., 2017).

A titre d'exemple de la recrudescence de cette problématique, selon la Ligue Nationale de Rugby, dans le championnat de Top 14, 102 CC avérées ont été recensées pour la seule saison 2016-2017, deux fois plus que 5 ans auparavant. Une revue de la littérature sur la survenue de CC au cours de la pratique sportive, professionnelle ou non, estime pour le rugby entre 1 et 2,5 CC par joueur pour 10 matchs entiers c'est-à-dire 800 minutes de jeu (Koh et al., 2009).

2.5. Morbi/mortalité

Le TC représente 30 à 40 % des décès par blessure, et les séquelles neurologiques qu'il engendre devraient représenter la première cause de pathologie neurodégénérative en 2030 (2 à 3 fois plus que la maladie d'Alzheimer ou les pathologies cérébrovasculaires) (Maas et al., 2017). L'OMS estime que le TC est la première cause de décès et d'invalidité chez l'enfant et le jeune adulte (OMS, 2006).

Depuis 150 ans, la mortalité liée aux TC sévère a diminué de 50 % grâce aux progrès de la médecine et aux mesures de prévention. Cependant, cette diminution semble stagner ces 25 dernières années (Stein et al., 2010 ; Maas et al., 2017).

Sur la base du GCS, les TC légers représentent 70 à 90% de l'ensemble des TC (Blennow et al., 2016 ; Maas et al., 2017). Si les TC sévères sont moins nombreux, ils sont en revanche caractérisés par un très fort taux de mortalité, de 30 à 40 % (Rosenfeld et al., 2012) voire 80% pour les GSC = 3, alors qu'il n'est que de 10% pour les TC non sévères (The Brain Trauma Foundation et The American Association of Neurological Surgeons, 2000). Cependant, la plupart des études ne s'intéressent qu'aux conséquences des TC sévères et le taux de décès au long terme provoqué par les complications des TC légers est difficile à évaluer.

Outre les décès qu'ils vont directement provoquer, les TC peuvent laisser des séquelles et favoriser la survenue de pathologies sous-jacentes, à court, moyen ou long terme. Ainsi, les personnes ayant subi des TC sont plus sensibles à certaines pathologies telles que l'épilepsie, les pneumonies, les septicémies et les troubles respiratoires et digestifs (Masel & DeWitt, 2010). Ce phénomène pourrait expliquer le taux de mortalité plus élevé chez les patients ayant subi un TC que pour le reste de la population (McMillan et al., 2014), jusqu'à 6 fois dans les 13 ans qui suivent le TC (McMillan et al., 2011). Le TC a par ailleurs été montré responsable d'une diminution de l'espérance de vie de 6 ans (Ventura et al., 2010).

2.6. Coûts

Le TC représente un fardeau économique à la fois pour les victimes de TC, leurs familles et les sociétés entières. Le TC représente un coût mondial annuel d'environ 400 milliards de dollars, ce qui représente 0,5% de l'économie mondiale (Maas et al., 2017).

En Europe, le coût estimé (direct et indirect) des TC est de 33 milliards de dollars pour la seule année 2017, et de 221 milliards aux Etats-Unis en 2009 (Maas et al., 2017). Environ 74% des années de vie perdues à cause des décès par TC touchent les individus en capacité de travailler (de 15 à 64 ans) (Majdan et al., 2017).

Cependant, il est très difficile d'estimer le coût exact des TC, à cause de l'hétérogénéité de ses manifestations et conséquences cliniques, ce qui donne une variabilité importante des estimations en fonction des études. De plus, la plupart des études évaluant l'impact économique du TC ne prennent en compte que les TC sévères.

3. Symptômes et conséquences

Le tableau clinique du TC est assez hétérogène, et dépend notamment de sa sévérité, de son étiologie, de la localisation des lésions, de l'âge et du sexe du patient. Ainsi, chaque tableau clinique pourra varier sensiblement d'un patient à l'autre en termes de sévérité, de durée et de type de symptôme.

3.1. Symptômes de la phase aiguë

Ils peuvent inclure des symptômes physiques, des troubles cognitifs et des troubles psychiques (Blennow et al., 2012 ; Lozano et al., 2015).

Dans les secondes voire les minutes après l'impact, une perte ou une diminution du niveau de conscience peut être présente et peut aller jusqu'au coma dans les formes les plus graves ; une altération des capacités cognitives (confusion, désorientation, ralentissement de la pensée…) ; une amnésie concernant des événements ayant précédé ou survenus juste après le TC ; et des déficits neurologiques transitoires, qui peuvent se prolonger pendant quelques semaines (troubles de la vision, troubles sensoriels, fatigue, perte de l'équilibre, parésie, plégie…). Ces symptômes peuvent s'accompagner de lésions intracrâniennes, mais qui ne sont pas systématiques.

3.2. Symptômes à plus long terme

A plus long terme, le TC pourrait être responsable de l'augmentation de la survenue de troubles comportementaux tels que dépression, agitation et irritabilité (Sayed et al., 2013), de démences et de pathologies neurodégénératives, renforçant la notion de pathologie d'évolution chronique (Wilson et al., 2017). En effet, des études ont mis en évidence une augmentation de l'incidence des pathologies relatives à l'accumulation des

protéines tau et amyloïde, marqueurs notamment de la maladie d'Alzheimer, chez un tiers des patients ayant subi un TC plusieurs décennies après (Johnson et al., 2012). De même après 55 ans, un TC est responsable d'une augmentation de 44% de l'apparition de maladie de Parkinson dans les 5 à 7 ans (Gardner et al., 2015). Il a également été estimé que 5 à 15% des démences dans la population générale pourraient être dues à un TC (Shively et al., 2012).

La répétition de TC légers, caractéristique de la pratique de certains sports violents, est à l'origine d'une ECPT qui provoque des changements métaboliques et cellulaires au niveau cérébral et qui serait responsable de la survenue à long terme de troubles neuropsychiatriques (Martland, 1928 ; Hay et al., 2016), tels que des troubles cognitifs, de l'humeur et du comportement (Stern et al., 2013 ; Mez et al., 2017).

Cependant, même les personnes exposées à un seul TC peuvent souffrir à moyen et long terme d'une augmentation de la survenue de déficits cognitifs (Li et al., 2016), d'ischémie cérébrale (risque multiplié par 2 ; Burke et al., 2013 ; Liao et al., 2014), d'épilepsie (risque multiplié par 1,5 à 17 fois ; Christensen, 2012) et de troubles neurologiques (Perry et al., 2016).

Ces conséquences du TC seront abordées plus en détail dans le §6. du chapitre 2 des rappels bibliographiques.

4. Prise en charge du TC

Etant donné l'hétérogénéité du tableau clinique des patients ayant subi un TC, leur prise en charge est complexe et doit être individualisée.

Les recommandations concernant la prise en charge du patient traumatisé crânien ont peu évolué depuis les recommandations de 1999 (Société Française d'Anesthésie et de Réanimation, 1999). Une récente mise à jour de ces recommandations est parue, bien qu'elle ne modifie pas les grandes lignes de la prise en charge (Geeraerts et al., 2018). Les éléments cités ci-après sont tirés de ces recommandations.

4.1. Diagnostic et évaluation de la gravité

Evaluation clinique et anamnèse

L'évaluation clinique d'un TC repose sur l'anamnèse, l'étude du niveau de conscience, l'examen des yeux et du reflexe pupillaire et la répétition dans le temps de cet examen, à intervalles réguliers qui permettront de surveiller l'évolution neurologique du patient et d'anticiper d'éventuelles complications neurochirurgicales.

L'anamnèse va permettre de situer le contexte clinique (âge, sexe, étiologie et circonstance, pathologies associées, alcoolémie, traitements sédatifs associés, etc…) et ainsi évaluer les facteurs pronostiques de gravité. Elle permet, en outre, une première évaluation de la sévérité du TC par la durée de la perte de conscience, la présence ou non de crises d'épilepsie et la progression des déficits neurologiques depuis le début de la prise en charge.

Ensuite, le GCS permet une description analytique simple et quantifiable des troubles observés et permet d'estimer la sévérité du TC. L'examen des yeux (pupilles et mouvements oculaires) et des fonctions motrices permettent d'évaluer plus précisément le degré de lésions cérébrales, d'atteinte du tronc cérébral et d'atteintes neurologiques, notamment la compression des nerfs crâniens.

Les examens d'imagerie

La radiographie n'est pas recommandée car si elle permet de visualiser une fracture du crâne, elle ne permet pas de prédire l'existence, ou non, d'une lésion cérébrale. En revanche, un examen tomodensitométrique sans injection (scanner) doit être réalisé pour tout patient victime d'un TC grave afin d'évaluer anatomiquement les lésions primaires et les indications neurochirurgicales. Il doit être réalisé sans délai en cas de coma ou d'anomalie de l'examen radiologique. Il doit être renouvelé dans les 24 heures si l'examen initial a été réalisé dans les trois heures suivant le TC, en cas de contusion cérébrale, lors d'absence d'amélioration ou de détérioration clinique, ou lors d'augmentation des valeurs de la pression intracrânienne. L'imagerie par résonance magnétique (IRM), quant à elle, n'a pas fait preuve de son intérêt dans la phase aigüe du TC. Enfin, l'exploration vasculaire (angiographie) peut être envisagée lors de TC sévère avec des facteurs de risque.

L'utilisation de biomarqueurs

L'utilisation de biomarqueurs a été proposée ces dernières années pour améliorer le diagnostic et la classification des TC sévères et palier aux limites de l'imagerie et du GCS. Ainsi, si une corrélation a été retrouvée entre le taux plasmatique de certains biomarqueurs de lésions cérébrales ou de neuro-inflammation, les anomalies détectées en imagerie, le GCS et le pronostic neurologique, ces marqueurs ne sont pas encore suffisamment performants à l'heure actuelle pour être utilisés en routine, car ils manquent de spécificité et de sensibilité (Geeraerts, et al., 2018). Les différents marqueurs étudiés sont détaillés dans le §2 du chapitre 3 des rappels bibliographiques.

4.2. Prise en charge

4.2.1. Pré-hospitalière

La prise en charge initiale du TC va consister à prévenir les agressions cérébrales secondaires d'origine systémique en maintenant ou en restaurant immédiatement les fonctions ventilatoires et cardiocirculatoires notamment par l'intubation, la ventilation artificielle et le maintien d'une pression artérielle systolique ≥ 110 mmHg : NaCl 0,9%, solutés de remplissage vasculaire et mannitol à 20% en cas de signes évocateurs d'hypertension intracrânienne (HTIC).

Après avoir assuré les fonctions ventilatoires et cardiocirculatoires, une sédation est préconisée lors d'un TC sévère.

La prise en charge doit ensuite s'effectuer dans un service de réanimation avec un plateau technique adapté voire, si possible, un service de neurochirurgie accessible facilement.

4.2.2. A l'hôpital

Suite au résultat du scanner, une intervention neurochirurgicale peut se révéler nécessaire, durant la phase précoce du TC, afin de drainer un hématome ou une hydrocéphalie, ou de retirer un éventuel fragment osseux qui compresserait ou lèserait le parenchyme cérébral.

L'HTIC étant un critère majeur de mauvais pronostic en cas de TC, en l'absence d'indication neurochirurgicale urgente le traitement doit être centré sur le contrôle de l'HTIC. Pour ce faire, une administration de mannitol 20 % ou un drainage du liquide

céphalorachidien (LCR) peuvent être réalisés si besoin, et la pression artérielle systolique doit être maintenue à une valeur ≥ 110 mmHg. La mesure de la pression intracrânienne peut être une aide à la prise de décision d'intervention neurochirurgicale. En cas d'HTIC réfractaire, une craniectomie décompressive pourra être envisagée.

4.3. Prévention

Le TC est très souvent évitable, et sa prévention permet déjà de sauver des vies et de réduire les coûts de sa prise en charge pour la société. Des mesures simples, telles que le port d'un casque dans les activités quotidiennes à risque (trajets en deux roues, sports à risque, etc…), ont une efficacité avérée dans la diminution de survenue de TC.

Des mesures ont été mises en place et ont montré leur efficacité, comme les mesures réglementaires et les campagnes de prévention dans le cadre de la sécurité routière et de la réduction des accidents de la route. A titre d'exemple, l'introduction à Taiwan de l'obligation de porter un casque lors de l'utilisation de deux roues a diminué de 33% le nombre de blessures à la tête chez les motards (Chiu et al., 2000). Cependant, en dépit des bénéfices avérés de ces réglementations, elles ne sont pas appliquées dans tous les pays, même développés, et de nombreux efforts sont encore à faire dans les pays en voie de développement (Maas et al., 2017).

Des mesures éducatives pourraient également être mises en place plus largement, notamment à l'égard des enfants et adolescents, population particulièrement vulnérable au TC, concernant les pratiques à risques et le port du casque dans les différentes activités le nécessitant.

Enfin, chez les personnes âgées, le risque lié au TC est de plus en plus pris en compte dans les services de gériatrie. Grâce à l'accompagnement des patients par l'éducation thérapeutique, ces derniers sont sensibilisés au fait d'avoir un environnement de vie adapté (éviter les tapis, escaliers, etc…). De même, les médecins sont de plus en plus sensibilisés à cette problématique et il leur est recommandé d'éviter la prescription de médicaments altérant la vigilance et l'équilibre (comme les benzodiazépines) ou ceux pouvant provoquer des réveils nocturnes (diurétiques le soir) chez les patients âgés à risque de chute.

4.4. Cas du milieu sportif

La publication de Gavett et ses collaborateurs (2011) à propos de l'ECPT a provoqué une prise de conscience du milieu sportif au niveau mondial concernant les risques liés aux CC. Le rugby est le premier sport en France à s'être emparé du sujet. La Fédération Française de Rugby a ainsi mis en place en 2012 un protocole « commotion cérébrale » : lors de présence de signes évidents de CC (perte de connaissance, convulsion, crise tonique posturale), le joueur doit quitter immédiatement et définitivement le terrain. Lors de signes évocateurs (troubles du comportement, de la mémoire, de l'équilibre ou de la vue, s'il se sent « dans le brouillard » ou s'il est obnubilé), l'arbitre ou le médecin d'équipe décide d'appliquer le protocole « commotion cérébrale ». Le joueur est alors obligé de sortir 5 minutes pour une évaluation neurologique de son état, afin de confirmer ou d'infirmer la CC. En cas de confirmation, le joueur est remplacé définitivement, arrête toute activité sportive, physique ou intellectuelle pendant 48 heures et doit consulter un neurologue dans ce délai. Il ne pourra reprendre son activité qu'après un délai fixé par une classification en fonction des symptômes, et par paliers progressifs.

Cependant, si la dangerosité de reprendre une pratique sportive dans la phase aigüe post-traumatique à cause du syndrome de second impact est bien connue, aucune étude scientifique n'a démontré de durée minimale à attendre avant la reprise de la pratique sportive. Ces durées ne sont fixées que de manière empirique. En effet, en l'absence de méthode clinique scientifiquement prouvée permettant le diagnostic ou le suivi du TC, il n'est pas certain que le repos soit une prise en charge suffisante des CC et que le délai préconisé pour ce repos soit suffisant pour obtenir la disparition de tous les effets immédiats post-commotionnels. De plus, aucune étude n'a, à ce jour, recherché le délai nécessaire pour permettre la diminution de l'incidence des ECPT. Compte-tenu de l'importance du problème clinique, des études à l'aide de modèles animaux de TC répétés se multiplient pour décrire les conséquences cellulaires et moléculaires dans le but de proposer des stratégies thérapeutiques (Kochanek et al., 2017 ; Vil & Atkinson, 2017).

Malheureusement, si certaines mesures préventives sont devenues obligatoires au niveau professionnel dans de nombreuses disciplines, telles que le port du casque dans le cyclisme ou le ski par exemple, le rugby est un des rares sports à avoir adopté une réelle politique préventive et de prise en charge de la CC. De plus, si les mesures prises le sont dans le milieu professionnel, elles ne sont pas forcément appliquées dans la pratique amateur, qui touche un nombre beaucoup plus important de personnes.

5. Physiopathologie

L'intensité des lésions engendrées par le TC à court ou long terme, leur localisation, et les tissus touchés vont dépendre de la sévérité et du type de TC. Au préalable et pour comprendre les types de lésions induites par un TC, il convient de comprendre les phénomènes mécaniques à l'origine de ces lésions.

5.1. Lésions primaires et physiques

Lors d'un TC avec contact, le cerveau va subir un phénomène de décélération et sa surface va venir heurter la partie interne de la boite crânienne. Cela va provoquer des lésions au niveau du point d'impact (lésions dites de « coup »), mais également du côté opposé lorsque le cerveau reprendra sa position initiale et heurtera la partie opposée de la boîte crânienne (lésions dites de « contrecoup ») (Mckee & Daneshvar, 2015 ; McGinn et Povlishock, 2016).

Cependant, les lésions post-traumatiques peuvent également survenir en l'absence de contact (Greve et Zink, 2009 ; Finnie, 2013). En effet, une accélération de la tête, sa décélération ou sa rotation peuvent provoquer la propagation à travers le parenchyme cérébral d'un gradient intracrânien de pression. Il va en résulter un étirement puis une destruction des constituants vasculaires, cellulaires et axonaux du cerveau (Finnie, 2013 ; Ling et al., 2015 ; Blennow et al., 2016).

Enfin, le TC peut également résulter d'objet pénétrant dans la boîte crânienne qui va directement léser le parenchyme cérébral. Cela peut-être un morceau de la boîte crânienne suite à une fracture, ou un objet extérieur (balle ou autre projectile, ou morceau de métal lors d'un accident de voiture) (Blennow et al., 2016). En plus des lésions directes liées à la pénétration et au contact de l'objet, les tissus adjacents vont être endommagés du fait de la propagation de l'onde de choc (Greve et Zink, 2009).

L'impact mécanique du TC, qu'il soit associé à une lésion de boîte crânienne ou non, va provoquer des lésions immédiates au niveau du parenchyme cérébral et du compartiment vasculaire (Algattas & Huang, 2014 ; Pearn et al., 2017 ; Kaur & Sharma, 2017 ; Stocchetti et al., 2017) (Figure 1).

Lésions de la boîte crânienne

Les lésions de la boîte crânienne peuvent être observées en cas de TC avec contact. Si elles traduisent l'intensité de l'impact mécanique, elles ne sont pas prédictives de la sévérité du TC. En effet, 20 à 30% des TC mortels ne sont pas associés à une fracture du crâne, et une fracture du crâne n'induit pas systématiquement de lésion cérébrale ou d'hématome (Mckee & Daneshvar, 2015).

Lésions du parenchyme

Les lésions du parenchyme peuvent être focales, multifocales ou diffuses (Finnie, 2013). Elles peuvent prendre la forme de lacérations (destruction du parenchyme le long de la surface cérébrale ; Mckee & Daneshvar, 2015) ou de destruction plus profonde du parenchyme cérébral (Pearn et al., 2016 ; Stocchetti et al., 2017), au travers de lésions axonales diffuses (LAD ; Finnie, 2013 ; McGinn & Povlishock, 2016). Le phénomène d'accélération/décélération va propager un gradient de pression, et l'étirement mécanique en résultant va provoquer ces LAD (Ling et al., 2015).

Lésions des vaisseaux sanguins

Les lésions du compartiment vasculaire se traduisent tout d'abord par des contusions, qui résultent d'une destruction de petits vaisseaux dans le cortex, sous l'effet des forces compressives. Les contusions peuvent être de coup et de contrecoup (Mckee & Daneshvar, 2015 ; McGinn & Povlishock, 2016).

Une rupture vasculaire plus importante, notamment par étirement des capillaires, va provoquer des pétéchies, qui, en se regroupant, vont provoquer des hématomes, voire des hémorragies. Ces dernières peuvent se produire entre le moment du TC et quelques jours après. En fonction de leur localisation, elles pourront être sous-arachnoïdiennes, responsables de la survenue de coma dans le cas des TC sévères. Les hémorragies intracraniennes peuvent être à l'origine d'HTIC et d'une diminution du débit sanguin cérébral, favorisant la survenue d'une ischémie cérébrale (Greve & Zink, 2009 ; Finnie, 2013 ; McGinn & Povlishock, 2016).

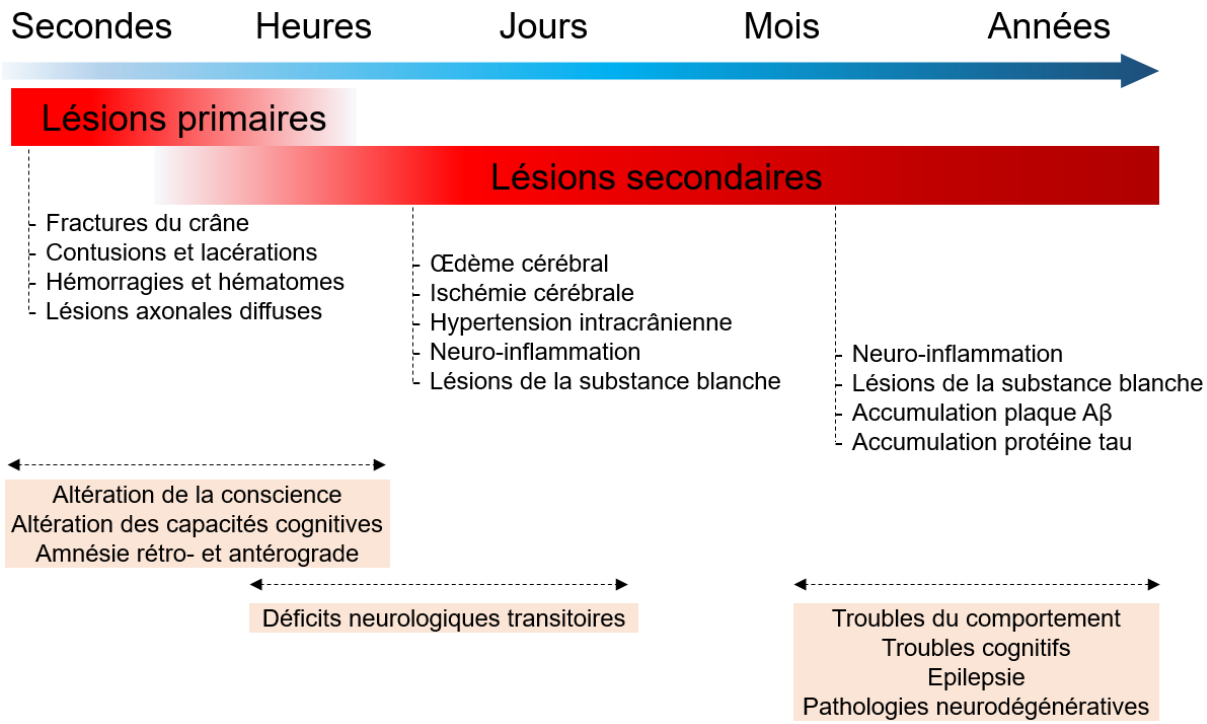


Figure 1 : Lésions primaires et secondaires,
et symptomatologie post-traumatique.

5.2. Lésions secondaires

Les lésions primaires vont être le point de départ de la cascade physiopathologique du TC, et engendrer, dès quelques heures jusqu'à plusieurs années après le TC, des lésions dites secondaires qui vont aggraver les dégâts initiaux (Finnie et al., 2013) (Figure 1). Comme les lésions primaires, les lésions secondaires peuvent se produire non seulement dans la région de l'impact, mais également à distance de celle-ci (Lozano et al., 2015).

5.2.1. Composantes moléculaires et cellulaires

L'étirement des membranes cellulaires et les contraintes physiques qu'elles subissent induisent une perturbation des transports ioniques et du potentiel membranaire (Prins et al., 2013 ; Pearn et al., 2017), avec un afflux de sodium, un efflux de potassium et une accumulation de calcium intracellulaire, qui vont provoquer un dysfonctionnement mitochondrial, une perturbation du métabolisme énergétique cellulaire et la production de radicaux libres (Prins et al., 2013 ; Pearn et al., 2017) (Figure 2).

L'augmentation du calcium intracellulaire va également activer des enzymes calcium-dépendantes, telles que la calpaïne et les caspases, qui vont favoriser la synthèse de monoxyde d'azote et des dégénéréscences axonales (Besson, 2009 ; Saatman et al., 2010 ; McGinn & Povlishock, 2016 ; Pearn et al., 2017) (Figure 2).

L'augmentation du calcium va également stimuler la libération de glutamate par les terminaisons nerveuses (Prins et al., 2013 ; McGinn & Povlishock, 2016). Cet excès de glutamate va induire une souffrance et une toxicité neuronales appelée excitotoxicité (Stocchetti et al., 2017), qui va provoquer un gonflement neuronal et une mort cellulaire par nécrose, aggravant ainsi l'augmentation de calcium intracellulaire et les destructions cellulaires (McGinn & Povlishock, 2016 ; Su & Bell, 2016) (Figure 2). Des études ont démontré que cette libération de glutamate est corrélée aux lésions post-TC (Enriquez & Bullock, 2004 ; McGinn & Povlishock, 2016).

La séquestration du calcium dans les mitochondries entraîne également un gonflement, une dépolarisation et un dysfonctionnement de ces dernières (Verweij et al., 2000 ; Cheng et al. 2012 ; Prins et al., 2013 ; Stocchetti et al., 2017), qui vont exacerber l'excitotoxicité et la diminution du métabolisme glucidique induit par la diminution du débit sanguin cérébral (Cheng et al., 2012 ; Prins et al., 2013 ; McGinn & Povlishock, 2016 ; Pearn et al., 2017 ; Morley 2018). Cette altération mitochondriale entraîne également la libération d'éléments apoptotiques dans le cytosol (Cheng et al., 2012 ; McConeghy et al., 2012 ; Su & Bell, 2016) et une surproduction d'espèces réactives de l'azote (ERN) et d'oxygène (ERO) (Enriquez & Bullock, 2004 ; Cheng et al., 2012 ; McConeghy et al., 2012 ; Prins et al., 2013 ; Pearn et al., 2017) conduisant à la mort cellulaire par apoptose et nécrose (Robertson et al., 2007 ; Cheng et al., 2012 ; Pearn et al., 2017). La nécrose va altérer la membrane plasmique cellulaire et le contenu des cellules ainsi libéré va entraîner une inflammation (Edinger & Thompson, 2004) (Figure 2).

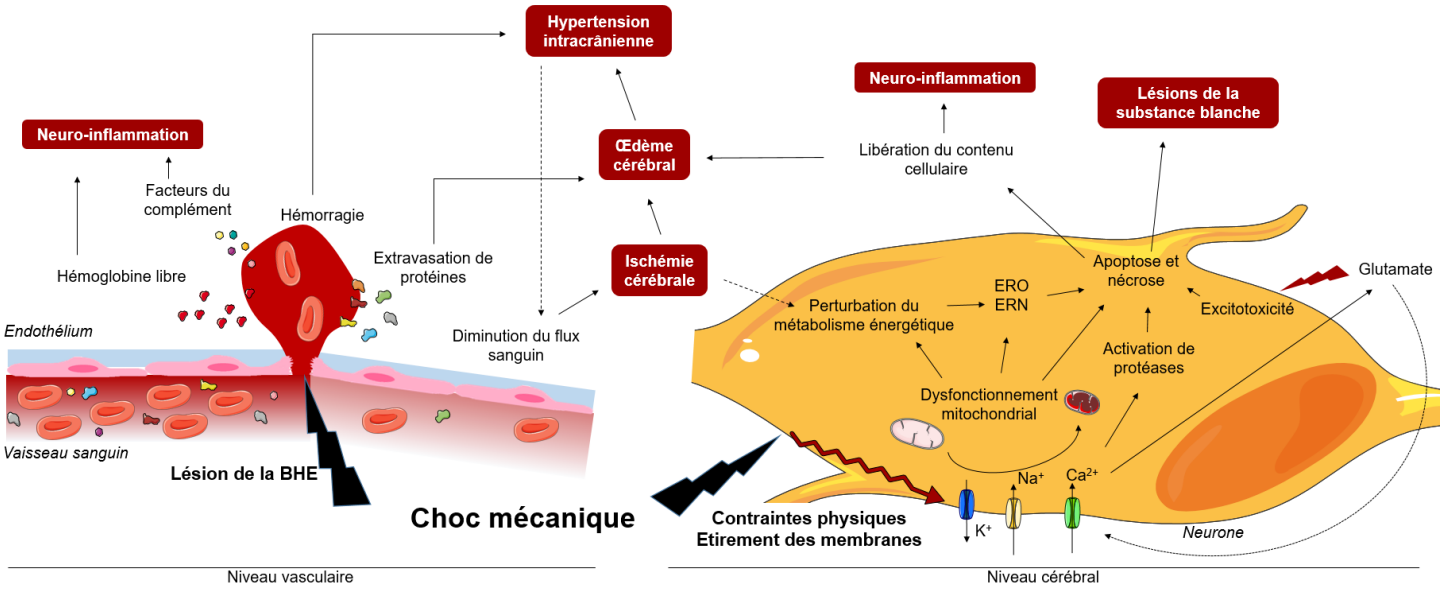


Figure 2 : Mécanismes induisant les lésions secondaires à partir des lésions primaires.
Abréviations : BHE : barrière hémato-encéphalique ; ERN : espèces réactives de l'azote ; ERO : espèces réactives de l'oxygène.

5.2.2. Composantes vasculaires

Les lésions vasculaires et les hémorragies, en diminuant le débit sanguin cérébral, vont diminuer l'apport en glucose et en oxygène des cellules, provoquant une ischémie cérébrale (Mckee & Daneshvar, 2015) (Figure 2). L'ischémie, elle-même, contribue de manière significative à la morbi/mortalité associée au TC (Mckee & Daneshvar, 2015).

Cette ischémie va également provoquer un œdème ischémique, qui va s'ajouter à l'œdème vasogénique engendré par l'extravasation de protéines suite à la dégradation de la barrière hémato-encéphalique (BHE), et à l'œdème cytotoxique en réponse aux lésions neuronales. Ces trois composantes vont ainsi provoquer un œdème cérébral (Finnie, 2013). L'œdème cérébral, associé à l'épanchement du sang en dehors du compartiment vasculaire, va augmenter la pression intracrânienne et provoquer une HTIC (Finnie, 2013) (Figure 2). L'HTIC, entraînant une diminution progressive de la perfusion cérébrale, va favoriser les lésions ischémiques et constituer la première cause de décès après un TC (Finnie, 2013). De plus, l'œdème va compresser le parenchyme et les différents compartiments intracrâniens ce qui va mécaniquement aboutir à des

compressions nerveuses (II, III, VI), vasculaires, ventriculaires (hydrocéphalie) et axiale du tronc cérébral, pouvant contribuer à l'apparition de modifications rapides et irréversibles du tableau clinique (Figure 2).

Les lésions de la BHE vont provoquer le passage de composés sanguins dans le parenchyme cérébral. Cette diffusion, associée à la libération du contenu cellulaire dans le parenchyme provoquée par l'apoptose et la nécrose cellulaire, va déclencher une cascade d'événements cellulaire et moléculaire qui va initier une réponse inflammatoire appelée neuro-inflammation (NI). Bien que physiologique, cette NI peut, à terme, aggraver les lésions primaires et secondaires consécutives au TC et amener, directement ou indirectement, à des lésions de la substance blanche (LSB) (Morganti-Kossmann et al., 2002 ; Finnie, 2013 ; Lozano et al., 2015 ; Chiu et al., 2016 ; McGinn & Povlishock, 2016 ; Stocchetti & Zanier, 2016 ; Pearn et al., 2017 ; Kaur & Sharma, 2017 ; Stocchetti et al., 2017).

Les mécanismes précis de la NI et de son implication dans les LSB sont étudiés plus en détail dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 2 : LA NEURO-INFLAMMATION

1. Définition

La neuro-inflammation (NI) est la réponse inflammatoire du système nerveux central (SNC), qui peut être déclenchée par différentes causes (ischémie cérébrale, hémorragie cérébrale, TC, épilepsie, etc…). C'est une réaction inflammatoire complexe, non spécifique et coordonnée, qui est parfois qualifiée de « stérile » car non causée par des agents pathogènes (Nizamutdinov & Shapiro, 2017 ; Simon et al., 2017). La NI apparaît pendant la phase aiguë du TC, dès les premières minutes qui suivent l'impact, et peut durer pendant des jours, des mois, voire même des années. Ayant initialement pour rôle la protection du SNC par l'élimination de pathogènes et par une action neuroprotectrice, la NI peut, dans certaines conditions, se déréguler, devenir pathologique et avoir des effets délétères sur l'environnement cellulaire du SNC.

2. Mécanisme général

La NI se caractérise par une cascade d'événements moléculaires consécutifs aux lésions tissulaires primaires, qui vont (1) activer certaines populations cellulaires, (2) provoquer une libération massive de médiateurs pro- et anti-inflammatoires et favoriser l'expression de molécules d'adhésion et (3) induire l'infiltration de cellules sanguines à travers une BHE potentiellement déjà lésée (Helmy et al., 2011a ; Finnie, 2013 ; Karve et al., 2016 ; Nizamutdinov & Shapiro, 2017).

3. Initiation

Les lésions tissulaires et les dysfonctionnements mitochondriaux consécutifs aux lésions primaires (cf. §5.2 du chapitre 1 et Figure 2) entraînent la libération passive par les cellules nécrotiques de glutamate et de molécules endogènes appelées « motifs moléculaires associés aux dégâts » (« damage-associated molecular patern » ; DAMP), telles que la protéine HMGB1 (« high mobility group box 1 »), les protéines S-100, les protéines de choc thermique (« heat shock protein », HSP), l'adénosine triphosphate (ATP), l'acide urique et l'acide désoxyribonucléique (ADN). Ces molécules vont activer les cellules gliales en stimulant les récepteurs appelés « pattern recognition receptor » (PRR ; Manson et al., 2012 ; Walko et al., 2014 ; Banjara & Ghosh, 2017) (Figure 3).

De plus, l'ATP et l'adénosine diphosphate (ADP) libérés dans le compartiment extracellulaire par les cellules en souffrance vont se lier aux récepteurs purinergiques P2 et les activer (Corps et al., 2015), en particulier le P2X7 exprimé par la microglie et dont le rôle est central (Figure 3). Expérimentalement, l'activation de ce récepteur, en favorisant la libération de cytokines qui stimulent les terminaisons nerveuses sensorielles, conduit à l'induction et au maintien de la douleur inflammatoire et neuropathique. De plus, l'activation des récepteurs P2X7 contribue à la libération d'interleukine (IL) 1β (Hughes et al., 2007 ; Tsuda et al., 2012).

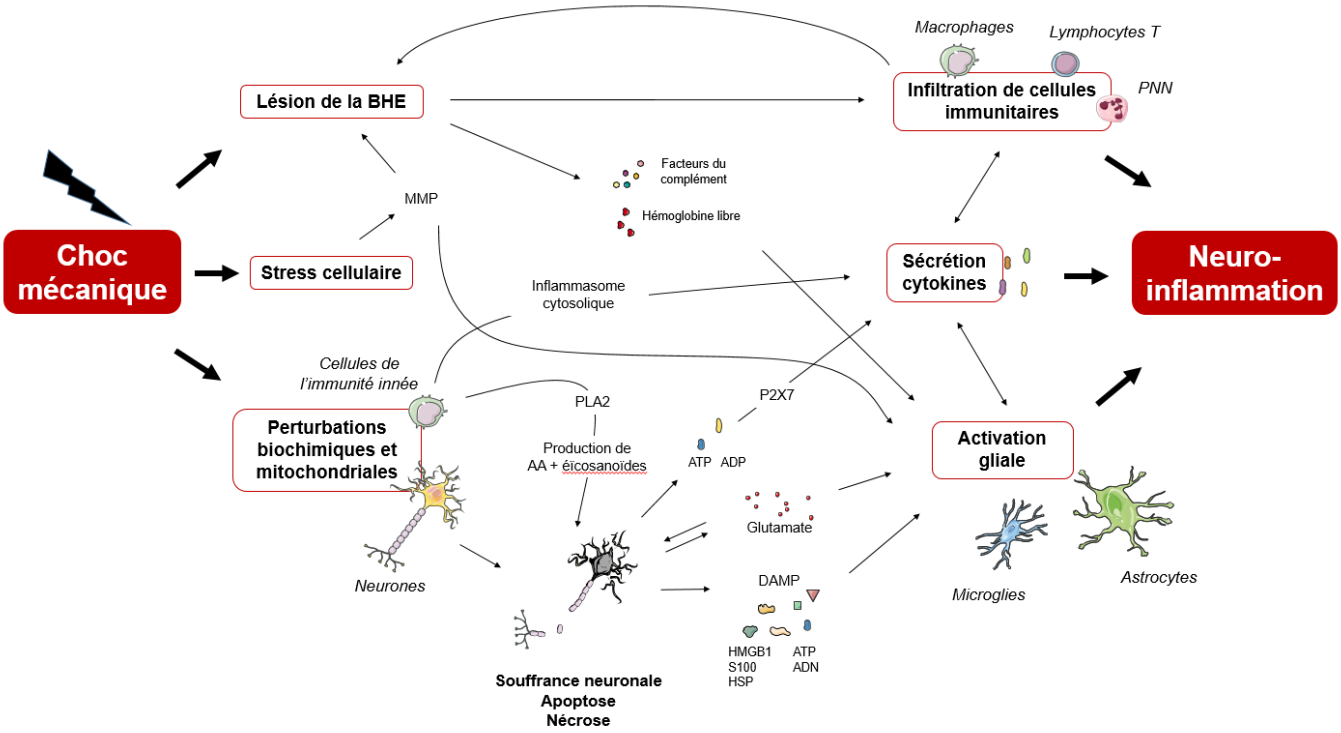


Figure 3 : Mécanismes d'initiation de la NI.
Abréviations : AA : acide arachidonique ; ADN : acide désoxyribonucléique ; ADP : adénosine diphosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; BHE : barrière hémato-encéphalique ; DAMP : motifs moléculaires associés aux dégâts ; HMGB1 : high mobility group box 1 ; HSP : heat shock protein ; MMP : métalloprotéinases ; PLA2 : phospholipase A2 ; PNN : polynucléaire neutrophile.

D'autres substances, telles que les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMP), sont impliquées dans l'initiation de la NI. Au cours d'une lésion du SNC, la synthèse de MMP est augmentée pour favoriser la réparation neuronale. Cependant, les MMP vont également dégrader les protéines de la BHE, contribuer à l'activation des cellules gliales et ainsi participer au maintien de l'inflammation (Mayer et al., 2013).

Les dysfonctionnements mitochondriaux induisent également l'externalisation de la cardiolipine, qui va activer l'inflammasome cytosolique et entraîner la production et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β et IL-8) (Lyer et al., 2013).

Les lésions de la BHE vont, pour leur part, induire l'infiltration dans le parenchyme cérébral d'éléments figurés du sang et de composants potentiellement pro-inflammatoires tels que l'hémoglobine et les facteurs du complément (Bellander et al., 2001 ; Walko et al., 2014 ; Rich et al., 2016) (Figure 3).

Enfin, le choc mécanique et les modifications biochimiques qu'il entraîne, telles que l'augmentation de la production de calcium intracellulaire et de radicaux libres (cf. §5.2.1 du chapitre 1), induisent la libération de lipases et de phospholipases. Ces enzymes vont hydrolyser des lipides membranaires. Ainsi, la phospholipase A2 (PLA2) va hydrolyser les phospholipides membranaires pour produire de l'acide arachidonique qui va à son tour produire des éicosanoïdes : prostaglandines et thromboxanes par l'action de cyclooxygénases (COX) et leucotriènes par l'action de lipoxygénases. L'acide arachidonique et ses produits, les éicosanoïdes, sont neurotoxiques. Leur synthèse induit également la production de radicaux libres et participent à l'augmentation de la perméabilité vasculaire et à l'infiltration leucocytaire (Figure 3). Le facteur d'activation plaquettaire, un médiateur lipidique également impliqué dans l'inflammation cérébrale, augmente l'agrégation plaquettaire, l'adhésion des polynucléaires neutrophiles (PNN) aux cellules endothéliales et la perméabilité vasculaire (Finnie, 2013).

4. Les éléments cellulaires

4.1. Les cellules gliales

Le terme de cellule gliale regroupe toutes les cellules non-neuronales du cerveau, qui forment l'environnement neuronal. Elles représentent 50 % de la population cellulaire totale du SNC (Azevedo et al., 2009), et comprennent :

- la microglie, principale cellule immunitaire du cerveau ;
- l'astrocyte, impliqué dans la neurotransmission, l'homéostasie du SNC et dans le maintien de la BHE ;
- l'oligodendrocyte (OL), responsable de la formation de la gaine de myéline dans le SNC ;

- la cellule épendymaire, cellule épithéliale assurant l'interface entre le SNC et le LCR, qu'elles produisent.

Par ailleurs, il existe une dernière cellule gliale, mais qui n'est pas retrouvée au niveau du SNC : la cellule de Schwann, qui constituent la gaine de myéline des axones dans le système nerveux périphérique.

Dans un contexte inflammatoire, tel que suite à un TC, les microglies et astrocytes vont être activés, subir des modifications morphologiques et jouer un rôle crucial dans la NI et ses conséquences. Les microglies et les astrocytes ainsi activés vont sécréter des facteurs trophiques et des cytokines qui vont agir de manière autocrine et paracrine sur leurs propres récepteurs, les « Toll-Like Receptors » (TLR). Ces médiateurs vont initier la réponse inflammatoire, l'amplifier puis la maintenir de manière autonome (Mayer et al., 2013 ; Cherry et al., 2014). Ainsi, les cellules gliales peuvent être activées directement par les lésions cérébrales, mais également par les cellules gliales périvasculaires et les cellules immunitaires infiltrantes (Mayer et al., 2013 ; Karve et al., 2016).

4.1.1. La microglie

La microglie est un acteur clé de la NI. Le développement des connaissances sur la fonction des microglies suite aux lésions cérébrales nous ont fait découvrir un rôle à la fois bénéfique et délétère de ces cellules, se traduisant par des capacités à la fois de réparation tissulaire et neurodégénérative (Loane & Kumar, 2016).

4.1.1.1. Origine et fonctions physiologiques

La microglie est la cellule immunitaire la plus abondante du SNC et représente environ 10% de sa population cellulaire chez l'adulte (Colonna & Butovsky, 2017). Souvent considérée comme le macrophage résidant du SNC, la microglie possède cependant une lignée et une signature moléculaire différentes des monocytes circulants (Loane & Kumar, 2016). La microglie adulte est issue des progéniteurs hématopoïétiques primitifs qui quittent le sac vitellin au début de la grossesse, pénètrent dans le tube neural *via* le flux sanguin primitif et se dirigent vers le SNC où ils acquièrent l'expression de gènes spécifiques à la lignée microgliale puis se différencient en microglie mature (Ginhoux et al., 2010).

Dans les conditions physiologiques, la microglie ramifiée qui était qualifiée jusqu'à récemment de « quiescente » et « inactive », apparait en fait très dynamique, surveillant en permanence son environnement. Ses ramifications « scannent » en permanence le parenchyme cérébral à la recherche de débris tissulaires, de métabolites en excès ou de tout autre composant susceptible de perturber l'homéostasie du SNC, pour les éliminer par la phagocytose (Loane & Kumar, 2016 ; Colonna & Butovsky, 2017) (Figure 4).

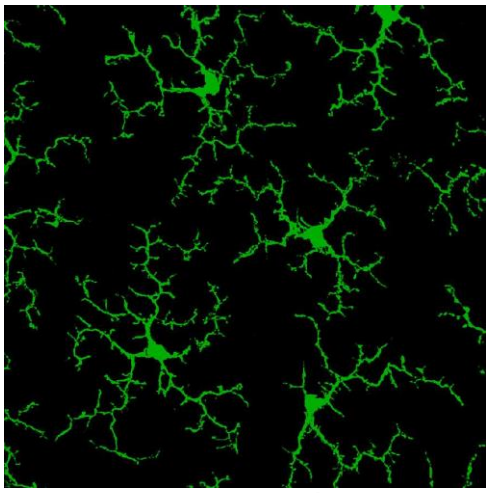


Figure 4: Microglies observées au microscope
(visualisées en vert grâce à un anticorps anti-Iba1)
(image issue de Zhang et al., 2018)

La microglie joue par ailleurs un rôle essentiel dans le développement cérébral, la plasticité synaptique et les processus d'apprentissage. Elle participe en effet à la régulation de la mort cellulaire, à l'élimination des synapses, à la neurogenèse et à la surveillance des neurones (Loane & Kumar, 2016).

A l'état physiologique, un certain nombre de médiateurs inflammatoires (cytokines, prostaglandines, neurotrophines, etc.) sécrétés localement par les astrocytes, neurones et microglies, entretiennent ces dernières dans un état de surveillance (Orihuela et al., 2016 ; Loane & Kumar, 2016).

A l'inverse, en réponse à une lésion ou une infection et *via* la stimulation de récepteurs spécifiques, la microglie va devenir activée et subir des modifications majeures en termes de morphologie et d'expression génique.

4.1.1.2. L'activation microgliale

Dans un contexte inflammatoire, la microglie va donc être activée par ses récepteurs PRR tels que les récepteurs TLR et NOD-like receptor (NLR). Ces récepteurs sont stimulés par les DAMP sécrétés par les neurones et d'autres cellules du SNC, ainsi que par d'autres facteurs libérés par les neurones endommagés tels que le glutamate, des facteurs de croissance et des cytokines (Loane & Kumar, 2016).

Au niveau morphologique, la microglie voit ses ramifications se raccourcir et son corps cellulaire s'élargir. Elle adopte ainsi une morphologie hypertrophiée, une morphologie amœboïde ou « bushy » (pour « touffue » ; Colonna & Butovsky, 2017). La microglie activée va gagner en mobilité, proliférer, coloniser le site de la lésion, exprimer des marqueurs de surface et libérer des médiateurs inflammatoires et potentiellement cytotoxiques : glutamate, cytokines, chimiokines, enzymes protéolytiques (MMP-2 3 et 9), ERO et ERN (Mayer et al., 2013 ; da Fonseca et al., 2014 ; Karve et al., 2016).

Jusqu'à récemment, la morphologie de la microglie était utilisée comme marqueur pour déterminer son activation, mais des découvertes récentes sur des profils d'activation variables ont remis en cause cette utilisation. D'une part, dans le cerveau du nouveau-né, les microglies sont initialement amœboïdes, même en l'absence de processus inflammatoire (Zusso et al., 2012). D'autre part, en fonction des stimuli auxquels la microglie est soumise, elle prendra différents états d'activation. On parle alors de la notion de polarisation microgliale et de phénotypes microgliaux (Orihuela et al., 2016 ; Loane & Kumar, 2016). Ces phénotypes semblent avoir des fonctions et des rôles différents, voire opposés. Ainsi, juger de l'activation des microglies par leur seule morphologie semble aujourd'hui avoir atteint ses limites et il est préféré l'utilisation de l'expression des marqueurs de surface et des médiateurs de l'inflammation pour évaluer de manière plus précise l'activation microgliale.

4.1.1.3. Les différents phénotypes

L'hétérogénéité de l'activation microgliale est décrite dans un grand nombre de pathologies du SNC (David & Kroner, 2011 ; Loane & Kumar, 2016 ; Song & Suk, 2017).

La microglie est généralement classée en deux types: M1 considérée comme pro-inflammatoire et pouvant favoriser la mort neuronale, et M2 considérée comme anti-inflammatoire et neurorégénérative (Donat et al., 2017) (Figure 5).

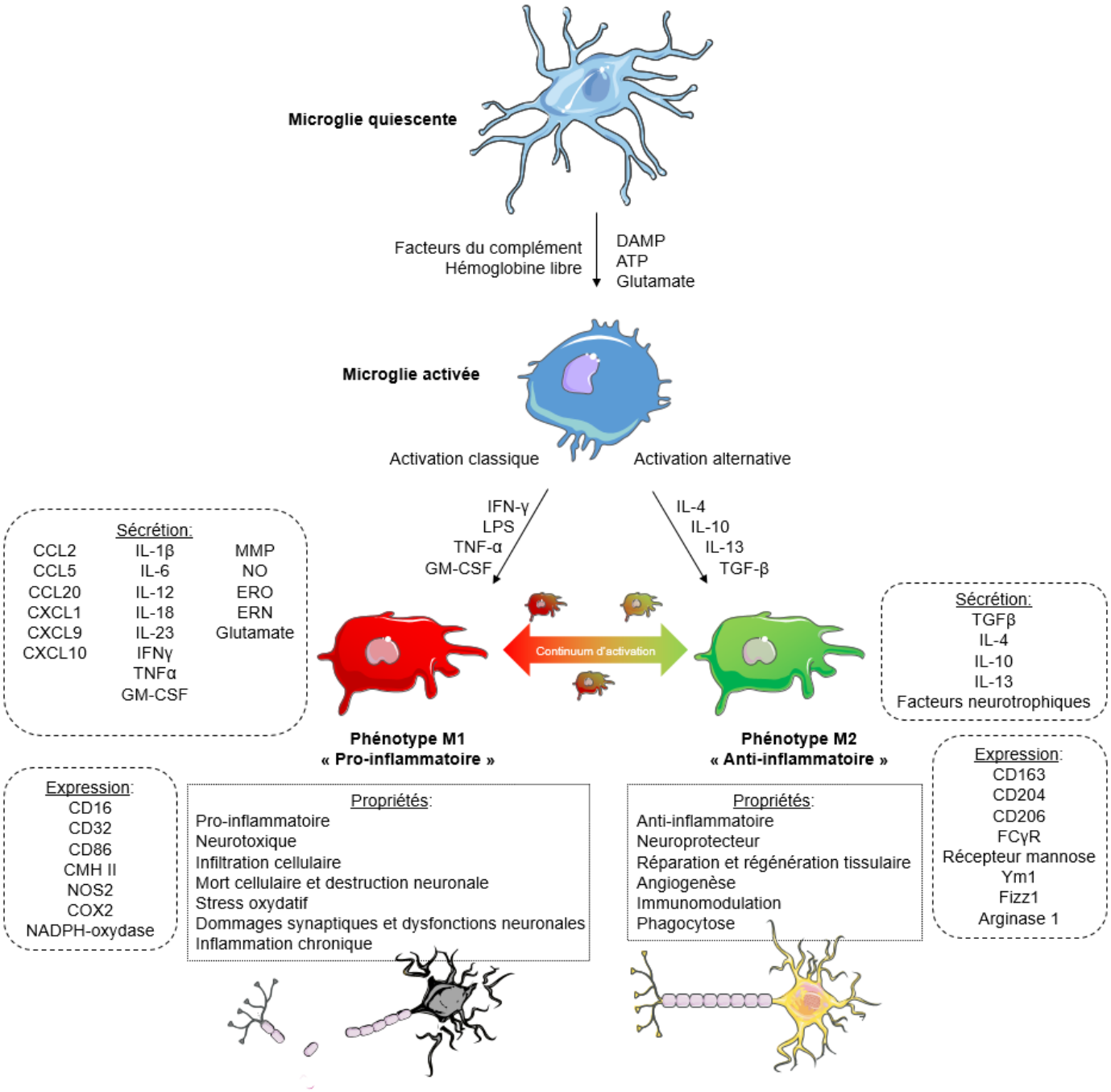


Figure 5 : Les différents phénotypes d'activation microgliale
(d'après Karve et al., 2015 ; Walker & Lue, 2015 ;
Loane & Kumar, 2016 ; Simon et al., 2017).
Abréviations : ATP : adénosine triphosphate ; DAMP : motifs moléculaires associés aux dégâts ; ERN : espèces réactives de l'azote ; ERO : espèces réactives de l'oxygène.

Phénotype M1

L'activation classique, dite en phénotype M1, au profil pro-inflammatoire, va être induite par l'action de molécules pro-inflammatoires, telles que le lipopolysaccharide (LPS) bactérien, l'IL-1, l'interferon-γ (IFN-γ) ou le tumor necrosis factor-α (TNF-α) (Figure 5).

Ce phénotype va alors produire des cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12, IL-18, IL-23, IFN-γ), des chimiokines (CCL2, 5 et 20; CXCL1, 9 et 10) et des ERO (Loane et Kumar, 2016 ; Orihuela et al., 2016 ; Donat et al., 2017). Le phénotype M1 se caractérise également par une augmentation des capacités de phagocytose (Loane et Kumar, 2016). Cet état d'activation s'accompagne d'une augmentation de l'expression d'un grand nombre de récepteurs, notamment ceux associés aux fonctions de phagocytose ou de présentation d'antigènes tels que les clusters de différenciation (CD) 16, 32 et 86, le complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II) et la NO-synthase (NOS) inductible (NOSi ou NOS2), ainsi que d'enzymes intracellulaires telles que les COX2 et nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxydase (NADPH-oxydase ; NOX ; Orihuela et al., 2016 ; Donat et al., 2017) (Figure 5).

Si la plupart du temps la réponse du phénotype M1 a une finalité protectrice et diminue lorsque les lésions ou les pathogènes diminuent, il arrive que cette réponse se dérégule et que la production de facteurs pro-inflammatoires engendre un cercle vicieux d'activation du phénotype M1 et de processus neurodégénératifs (Loane & Kumar, 2016).

Phénotype M2

A l'inverse, en réponse aux cytokines anti-inflammatoires (IL-4, 10 et 13, tumor growth factor-β ; TGF-β), la microglie adopte un autre phénotype d'activation, dit alternative aussi appelée M2 (Figure 5).

Ce phénotype a été identifié comme libérant des cytokines anti-inflammatoires (IL- 4, 10, 13 et TGF-β), exprimant l'arginase 1 (Arg1), le CD206 et le Chitinase-3-like-3 (Ym1 chez le rongeur ; Orihuela et al., 2016). Le phénotype, dit M2, possède des propriétés anti-inflammatoires et participe à la réparation et à la régénération tissulaire. Des effets sur l'immunomodulation, l'angiogenèse et la progression tumorale ont également été décrits avec ce phénotype d'activation (Orihuela et al., 2016) (Figure 5).

Ces dernières années, trois sous-phénotypes M2 ont été distingués: « alternatif » M2a, « immunorégulateur » M2b et « désactivé » M2c (Colton, 2009) (Figure 6).

- Le phénotype alternatif M2a est activé par les cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-13 (Orihuela et al., 2016) et produit à son tour des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, nerve growth factor (NGF), TGF-β) ainsi que des facteurs de croissance tels que le brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Le phénotype M2a dit « alternatif » est impliqué dans l'immunité contre les parasites et le recrutement de lymphocytes T helper Th2 et semble avoir une action de réparation tissulaire et de stimulation de la croissance cellulaire à long terme (Colton, 2009 ; Kigerl et al., 2009 ; Cao et al., 2012 ; Chhor et al., 2013 ; Kumar et al., 2013, 2016).
- En réponse à la formation de complexes immuns et à la stimulation des TLR, la microglie peut adopter le phénotype intermédiaire appelé M2b. Le rôle exact du phénotype M2b n'est pas encore clairement établi. Cependant, il semble jouer un rôle intermédiaire caractérisé comme « immunorégulateur », avec l'expression de marqueurs de surface se rapprochant du phénotype M1 plutôt que M2, un profil de sécrétion plus proche de M2 et une activité à la fois pro- et anti-inflammatoire (Cherry et al., 2014 ; Loane & Kumar, 2016 ; Bergold, 2016 ; Kumar et al., 2016).
- La microglie peut également adopter le phénotype M2c « inactivé » en réponse à l'IL-10, au TGF-β ou aux glucocorticoïdes (Orihuela et al., 2016). Ce phénotype semble impliqué dans le remodelage tissulaire consécutif à la diminution de l'inflammation (Loane & Kumar, 2016).

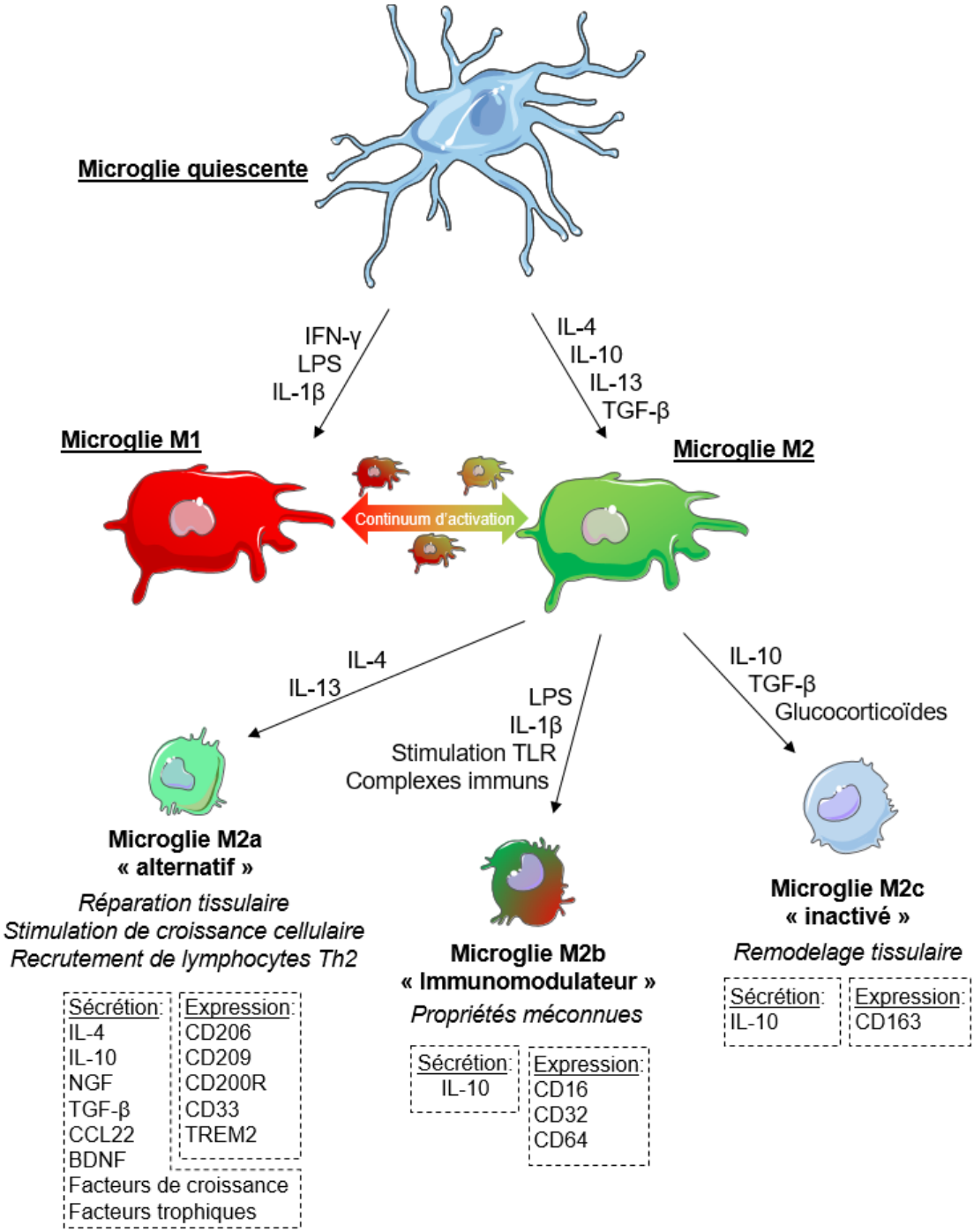


Figure 6 : Propriétés et marqueurs des sous-types du phénotype M2 : M2a, M2b et M2c
(d'après Karve et al., 2015 ; Walker & Lue, 2015 ; Loane & Kumar, 2016 ; Simon et al., 2017).

Un *continuum* d'états d'activation

Bien que cette polarisation microgliale soit bien décrite dans les modèles *in vitro*, le principe de l'existence *in vivo* de deux populations bien distinctes M1 et M2, est discuté (Ransohoff, 2016) et, au vu des dernières publications scientifiques, les activités pro- et anti-inflammatoires des deux phénotypes ne semblent pas aussi binaires (Loane & Kumar, 2016). L'environnement simplifié dans les expériences *in vitro* est loin de celui qui peut être observé *in vivo* après une lésion cérébrale. Ainsi, après une lésion du SNC, les microglies présentent souvent des phénotypes mélangés, témoignant de leur plasticité et de leur capacité à adopter différents phénotypes en adaptation aux signaux locaux et aux changements d'environnement inflammatoire. Face à des signaux tissulaires très complexes, la microglie pourrait ainsi adopter un phénotype mixte appelé "Mtrans", exprimant à la fois les marqueurs M1 et M2 (Kumar et al., 2016 ; Morganti et al., 2016). Le paradigme des phénotypes bien différenciés M1 et M2 semble donc traduire deux états extrêmes d'activation, entre lesquels vont se trouver un *continuum* d'états d'activation microgliale, avec la présence simultanée de marqueurs des différents phénotypes (Morganti et al., 2016 ; Loane & Kumar, 2016 ; Donat et al., 2017) (Figure 6). Ces différents phénotypes microgliaux semblent ainsi travailler de concert pour contrôler l'inflammation, éliminer les débris, favoriser la réparation et le remodelage des tissus.

4.1.1.4. Rôle et conséquence dans la NI

L'activation microgliale apparait très précocement après le TC, dès les premières heures, à la fois chez l'animal (Csuka et al., 2000) et chez l'Homme (Ramlackhansingh et al., 2011) et peut persister pendant des années (Johnson et al., 2013a). La localisation de l'activation microgliale coïncide souvent avec la dégénérescence neuronale et les lésions axonales (Maxwell et al., 2010 ; Giunta et al., 2012 ; Wang et al., 2013), ce qui suggère un rôle délétère de cette activation et une implication dans la survenue des pathologies neurodégénératives ultérieures. Cependant, le caractère neuroréparateur de certains phénotypes nécessite une investigation plus poussée du schéma d'activation microgliale avant de pouvoir envisager des approches thérapeutiques visant la modulation de l'activation microgliale.

4.1.2. Les astrocytes

Situés entre les cellules endothéliales et les neurones, les astrocytes contribuent au maintien de l'intégrité de la BHE grâce à leurs pieds astrocytaires qui entourent les cellules endothéliales (Risau & Wolburg, 1990 ; Abbott et al., 2006) (Figure 7). Ils maintiennent également les neurones en bon état de fonctionnement en régulant les concentrations de neurotransmetteurs tels que le glutamate et en participant à la formation et au bon fonctionnement des synapses (Chen & Swanson, 2003 ; Mayer et al., 2013 ; Karve et al., 2016 ; Burda et al., 2016).

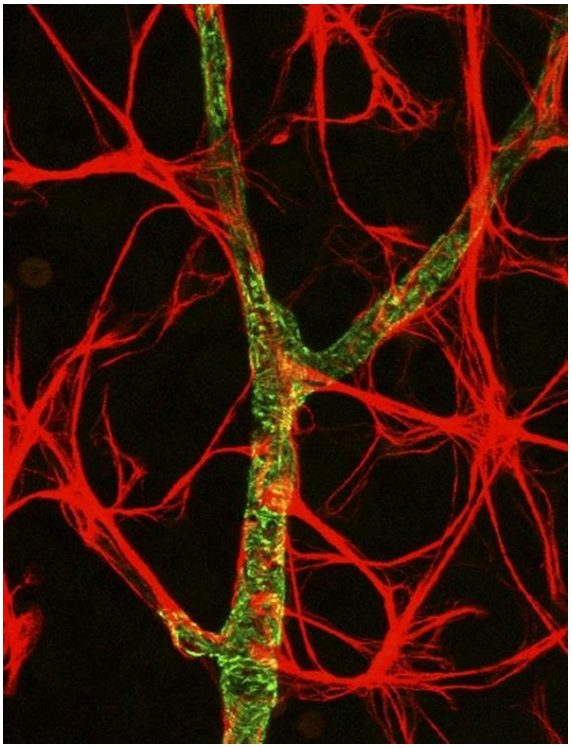


Figure 7 : Astrocytes observés au microscope interagissant avec les capillaires sanguins (Image issue de Pekny & Pekna, 2014)
Les astrocytes sont visualisés en rouge grâce à un anticorps anti-GFAP, les cellules endothéliales et les péricytes sont visualisés en vert, grâce à un anticorps anti-actine-α des muscles lisses

L'activation astrocytaire consécutive à une lésion cérébrale est désignée par le terme « astrogliose » (Sofroniew & Vinters, 2010). Une fois activés, les astrocytes vont proliférer, changer de morphologie pour devenir hypertrophiés (gonflement du corps cellulaire et allongement des extensions) et produire des médiateurs inflammatoires et des facteurs trophiques qui vont participer à la NI (Gorina et al., 2011 ; Zamanian et al., 2012 ; Paintlia et al., 2013 ; Mayer et al., 2013 ; Pekny & Pekna, 2014). Ils vont également être capable de migrer vers le site lésionnel pour former une cicatrice gliale, qui va

empêcher la diffusion des molécules pro-inflammatoires et cytotoxiques vers les tissus sains environnants et ainsi limiter l'extension du processus inflammatoire en dehors de la zone lésionnelle (Burda et al., 2016).

Par ailleurs, pendant la NI, la capacité de recapture du glutamate par les astrocytes est fortement altérée, amplifiant l'excitotoxicité et les dommages neuronaux (Viviani et al., 2014). Expérimentalement, l'excitotoxicité provoquée par un excès de glutamate stimule la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1β et le TNF-α (Hagan et al., 1996 ; Pearson et al., 1999 ; Jander et al., 2000 ; Viviani et al., 2014 ; Kochanek et al., 2015).

Cependant, l'astrogliose apparait comme un phénomène complexe, puisqu'à la fois des effets bénéfiques et des effets délétères lui ont été découverts (Mayer et al., 2013 ; Burda et al., 2016). En effet, l'activation astrocytaire va induire la différenciation en deux types différents d'astrocytes, qui peuvent être nommés « A1 » et « A2 » en suivant la même nomenclature que pour les macrophages et les microglies M1 et M2. Le phénotype A1 perd la plupart des fonctions physiologiques des astrocytes et acquiert une fonction neurotoxique, induisant rapidement la mort des neurones et des OL, alors que le phénotype A2 apparaît comme neuroprotecteur (Liddelow et al., 2017). Si la présence spécifique du phénotype A1 a été rapportée à la suite d'un TC (Clark et al., 2019), ses phénotypes et leurs effets n'ont encore que très peu été étudiés, notamment dans le TC.

4.2. Les autres cellules

4.2.1. Neurones

Les neurones ne sont pas uniquement figuratifs ou « victimes » dans la NI post-traumatique, mais ont également un rôle actif, en régulant et en orientant la réaction inflammatoire.

D'une part, lorsqu'un neurone est en souffrance (augmentation de calcium intracellulaire, manque d'ATP, stress oxydant, nécrose due à une rupture membranaire,…), il va exposer à sa surface la phosphatidylsérine, un phospholipide normalement confinée dans la partie interne de la membrane plasmique. Celui-ci va agir comme un signal « eat-me » pour induire sa phagocytose par les microglies (Brown & Neher, 2014).

D’autre part, lorsqu’un neurone est endommagé ou exposé au glutamate, la chimiokine CX3CL1 (également appelé fractalkine), présente sur leur membrane, va se détacher et aller stimuler le récepteur CX3CR1 des microglies, ce qui va inhiber leurs propriétés neurotoxiques (Suzumura 2013). Le CX3CL1 est donc appelé signal « find me ». Les neurones peuvent également produire une cytokine IL-34 qui, en agissant sur le récepteur au CSF de type 1 des microglies, va favoriser leur activation et leur capacité d’élimination du peptide β-amyloïde (Aβ ; Suzumura, 2013).

Inversement, à l’état physiologique, en l’absence de lésion cérébrale, les microglies sont maintenues dans un état quiescent par le biais d’un potentiel immunosuppresseur du SNC attribuable à la sécrétion de protéines immunosuppressives (neurotrophines, cytokines, prostaglandines) par les neurones, ou à l’expression de marqueurs à leur surface (CD200, CD47, entre autres). Ces signaux « off », en agissant sur les récepteurs des microglies, tendent à inhiber leur activation et à les maintenir dans un état non activé (Luo & Chen, 2012 ; Loane & Kumar, 2016).

4.2.2. Cellules immunitaires périphériques

Le recrutement et l'activation des cellules gliales vont provoquer la libération de facteurs trophiques, qui vont favoriser le passage dans le parenchyme cérébral de leucocytes circulants, à travers une BHE déjà potentiellement altérée et perméabilisée par l'action mécanique du TC (Mayer et al. 2013).

Les leucocytes vont être recrutés par les molécules chimiotactiques sécrétées par les cellules gliales. Ils vont alors rouler le long de l’endothélium, adhérer à ce dernier en se liant à des molécules de la famille des sélectines (notamment P, E et L), ce qui va activer les intégrines présentes à leur surface. Ces intégrines vont permettre aux leucocytes de se lier à des molécules d’adhésion (notamment intercellular adhesion molecule 1 ; ICAM-1), ce qui va entrainer le passage des leucocytes au travers de la BHE (Rhodes, 2011) (Figure 8).

Une fois dans le cerveau, les cellules immunitaires circulantes vont renforcer et stimuler l'activité inflammatoire des cellules résidentes du SNC et contribuer à leur tour au recrutement de nouvelles cellules immunitaires centrales et périphériques (Mayer et al., 2013). Ceci va renforcer la cytotoxicité, la mort neuronale, l'activation gliale et la production de médiateurs inflammatoires qui modifient la perméabilité de la BHE.

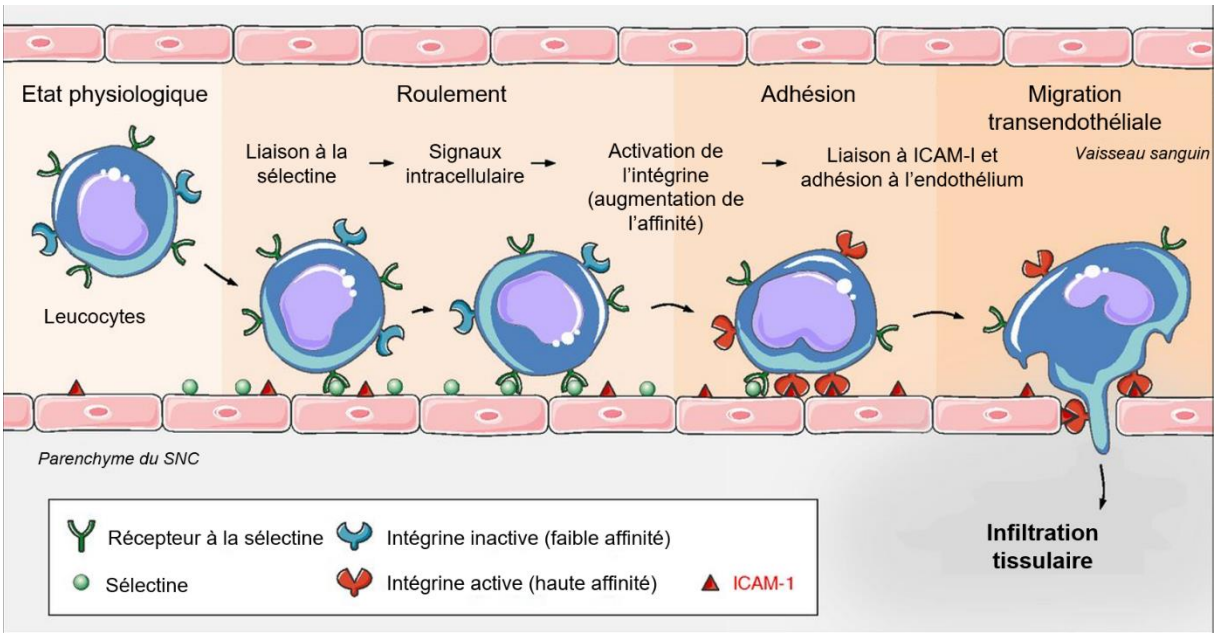


Figure 8 : Infiltration leucocytaire (d'après Lagarrigue et al., 2016).

Polynucléaires neutrophiles

Les PNN vont arriver rapidement sur le site lésionnel, recrutés grâce aux chimiokines CXCL1 et 2 (Liao et al., 2013 ; Corps et al., 2015) et vont aider à préparer la zone lésionnelle pour le remodelage tissulaire. Les PNN ont une activité phagocytaire et sont capables de produire des facteurs de croissance et d'aider au recrutement des autres cellules immunitaires circulantes. Ils vont produire des médiateurs cytotoxiques (myéloperoxydase, MMP, élastases, TNF-α, etc) et des ERO qui vont aggraver l'altération de la BHE et la mort neuronale (Corps et al., 2015 ; Nizamutdinov & Shapiro, 2017). Le rôle des PNN varie en fonction de leur localisation et de leur état d'activation (Corps et al., 2015). Cependant leur déplétion se traduit par une réduction de l'œdème, de l'activation de cellules gliales et des lésions tissulaires (Kenne et al., 2012) démontrant un rôle néfaste de ces cellules.

Monocytes et macrophages

Les monocytes sont des cellules circulantes qui sont capables de se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques après l'invasion d'un tissu infecté ou lésé (Corps et al., 2015). Sous l'influence de la chimiokine CCL2, les monocytes vont traverser la barrière hématoméningée, qui contrôle et régule les échanges entre le sang et le LCR, ainsi que la BHE, pour atteindre le site lésionnel. Ils vont y avoir, entre autre, des fonctions de phagocytose, de présentation d'antigène, de sécrétion de médiateurs inflammatoires et de réparation tissulaire. Cependant, bien que leur rôle précis dans le contexte du TC

est assez peu connu, les travaux ayant étudié l'effet de leur inhibition semble leur attribuer une activité plutôt délétère (Corps et al., 2015).

Lymphocytes T

Après un TC, le recrutement des lymphocytes T sur le site lésionnel pourrait être favorisé par les ERO produits par la NI (Corps et al., 2015). Les lymphocytes T sont impliqués dans la réponse immunitaire adaptative et dans la régulation de l'inflammation, mais leur rôle précis suite à un TC n'est, encore à l'heure actuelle, pas bien défini. S'ils ne semblent pas avoir de rôle majeur dans l'initiation et l'entretien de la NI à court terme (Wekbach et al., 2012), leur rôle n'a pas été étudié à long terme.

Implication des cellules circulantes dans les dégâts post-traumatiques

L'infiltration des cellules immunitaires circulantes joue un rôle important dans la NI et ses conséquences fonctionnelles (Corps et al., 2015). En effet, il a été démontré expérimentalement que l'inhibition du chimiotactisme (Semple et al., 2010 ; Rhodes, 2011) et la déplétion des PNN (Kenne et al., 2012), diminuent la production de cytokines (Semple et al., 2010), l'activation microgliale et macrophagique (Kenne et al., 2012). Cela va avoir pour conséquences la diminution de l'œdème cérébral, du volume lésionnel et de la perte tissulaire, de la mort cellulaire et des déficits fonctionnels, neurologiques et cognitifs (Semple et al., 2010 ; Rhodes, 2011 ; Kenne et al., 2012 ; Morganti et al., 2015).

5. Les cytokines, médiateurs moléculaires

La NI va induire la production d'une grande quantité de cytokines, des médiateurs protéiques pro- et anti-inflammatoires, à la suite du TC (Yatsiv et al., 2002 ; Morganti-Kossmann et al., 2007 ; Kumar & Loane, 2012). Les cytokines peuvent être sécrétées par tous les acteurs cellulaires de l'inflammation, ainsi que par les neurones, mais la microglie reste leur source principale dans le SNC (Kumar & Loane, 2012). En plus de leur rôle dans l'inflammation, les cytokines sont essentielles au développement et au fonctionnement du SNC (Morganti-Kossmann et al., 2007). Les cytokines sont sécrétées dans le cerveau, mais aussi dans le LCR et dans le sang (Woodcock & Morganti-Kossmann, 2013 ; Chiu et al., 2016).

Les chimiokines

Les chimiokines sont des cytokines chimiotactiques capables de réguler l'activation et la migration des leucocytes, sécrétées par les microglies et les neurones (Ziebell & Morganti-Kossmann, 2010).

Les chimiokines sont classées en 2 groupes : les C-X-C motif ligand (CXCL, ou chimiokines α) pour les PNN et les lymphocytes, et C-C motif ligand (CCL ou chimiokines β) pour les monocytes, les macrophages et les lymphocytes T (Ziebell & Morganti-Kossmann, 2010).

Cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines pro-inflammatoires incluent les IL-1β, 6 et 18, TNF-α et IFN-γ. Ces cytokines sont d'abord libérées par les cellules gliales suite à une lésion tissulaire (Chiu et al., 2016) et vont initier la réponse inflammatoire en augmentant l'expression des autres cytokines, des molécules d'adhésion cellulaire et des chimiokines pour recruter des cellules immunitaires périphériques (Finnie, 2013 ; Mayer et al., 2013 ; Chiu et al., 2016).

Les cytokines IL-1β et TNF-α augmentent la perméabilité de la BHE, contribuent au recrutement des cellules immunitaires périphériques (Finnie, 2013 ; Mayer et al., 2013 ; Chiu et al., 2016) et favorisent la formation d'œdème et la mort neuronale (Finnie 2013 ; Mayer et al 2013). Expérimentalement, l'IL-1β aggrave les lésions tissulaires post-traumatiques et son inhibition permet de les réduire. L'IL-1β favorise en particulier l'activation et la prolifération des astrocytes et des microglies, et l'apoptose des neurones. L'IL-1β participe aux dommages post-TC par son propre effet pro-inflammatoire, mais également en stimulant la production d'autres cytokines telles que le TNF-α ou des enzymes telles que la PLA2 ou la COX2 (Morganti-Kossmann et al., 2007 ; Kumar & Loane, 2012). Le TNF-α joue un rôle important dans l'inflammation et le processus auto-immunitaire, l'immunomodulation, la croissance et la réparation cellulaire. Dans le contexte de la NI, il contribue à l'activation microgliale, au recrutement des leucocytes circulants et à la perturbation de la BHE, et inhibe la régénération neuronale (Morganti-Kossmann et al., 2007).

En outre, les cytokines pro-inflammatoires ont un impact délétère démontré *in vitro* sur les OL, en provoquant leur apoptose ou en inhibant la différentiation des précurseurs d'oligodendrocytaires (OPC) (Bradl & Lassmann, 2010 ; Shi et al., 2015). Elles vont

également avoir un effet direct sur les neurones en inhibant la neurogenèse et en favorisant la mort neuronale (Luo & Chen, 2012 ; Suzumura et al., 2013) et vont ainsi augmenter le volume lésionnel et les dommages neuronaux post-TC (Yatsiv et al., 2002 ; Yang et al., 2011 ; Helmy et al., 2011 ; Kumar & Loane, 2012).

Outre leurs effets délétères directs, les cytokines vont provoquer la libération de glutamate par les microglies *via* un mécanisme autocrine/paracrine, qui va avoir un effet neurotoxique sur les neurones, synapses et dendrites (Takaki et al., 2012) et inhiber la neurogenèse (Monje et al., 2003).

Cytokines anti-inflammatoires

Les cytokines anti-inflammatoires, telles que les IL-4, -10, -13 et le TGF-β, apparaissent chronologiquement après les cytokines pro-inflammatoires et ont pour rôle de moduler et réduire l'inflammation par des mécanismes encore mal compris et parfois controversés (Finnie, 2013 ; Chiu et al., 2016). De manière générale, ils inhibent la production d'IL-1, IFN-γ, ERO et de TNF-α ainsi que l'activation des lymphocytes T, l'adhésion des leucocytes et la prolifération des astrocytes (Finnie, 2013).

Un rôle complexe

Cependant, les effets des cytokines sont multiples ce qui participent ainsi à la complexité de la NI. En effet, les cytokines pro-inflammatoires peuvent avoir des effets protecteurs bénéfiques, notamment à long terme. Par exemple, l'inhibition de l'IL-1β par l'administration d'anticorps anti-IL-1β s'est révélée neuroprotectrice dans des modèles expérimentaux de TC, mais l'IL-1β induit également la sécrétion de NGF par les astrocytes, essentiels à la régénération neuronale (Morganti-Kossmann et al., 2007).

De même, si la suppression du gène codant pour le TNF-α chez la souris s’est montrée bénéfique pendant la phase aiguë après le TC, elle devient délétère à long terme (Morganti-Kossmann et al., 2002 ; Kumar & Loane, 2012).

Ce double rôle est également décrit avec l'IL-6 pour laquelle des résultats contradictoires ont été obtenus sur le plan clinique concernant la corrélation de son niveau avec l'état neurologique de patients ayant subi un TC (Morganti-Kossmann et al., 2007). En effet, cette cytokine va, d’une part, favoriser le recrutement des leucocytes et ainsi participer à l’aggravation les dommages neuronaux, et d’autre part, exercer des propriétés anti-inflammatoires qui résultent de plusieurs mécanismes, notamment la stimulation de

la production d'antagoniste de l'IL-1 et la diminution de la synthèse de TNF-α, de l'excitotoxicité et du stress oxydant. L'IL-6 favorise également la survie et la différenciation neuronale, en particulier en stimulant la production de NGF (Morganti-Kossmann et al., 2002).

6. Conséquences

La NI post-traumatique est souvent qualifiée « d'épée à double tranchant » (Morganti-Kossmann et al., 2002) car en plus de son rôle dans la résolution des lésions primaires et secondaires post-traumatique, elle va amplifier ces mêmes lésions, en particulier la mort neuronale et les LSB. Cela a été mis en évidence par de nombreuses études, *in vitro* et *in vivo* (Finnie, 2013 ; Lozano et al., 2015 ; Pearn et al., 2017 ; Stocchetti et al., 2017).

6.1. In vitro

Des études de co-cultures cellulaires *in vitro* permettent de comprendre l'impact de la NI, et plus précisément celle des microglies activées sur l'environnement cellulaire cérébral. Cela a permis d'identifier les conséquences d'une activation microgliale de manière générale, et plus précisément des effets spécifiques des phénotypes M1 et M2, grâce à des milieux de culture conditionnés avec des médiateurs pro ou anti-inflammatoires.

Phénotype M1

Lorsqu'elles sont pré-incubées avec du LPS, les microglies inhibent la neurogenèse (Monje et al. 2003 ; Ekdahl et al., 2003) et l'oligodendrogenèse des cellules souches neurales avec lesquelles elles sont mises en culture (Butovsky et al., 2006). En condition pro-inflammatoire (LPS + IFN-γ), les microglies favorisent la mort neuronale, notamment par un mécanisme lié au monoxyde d'azote (Gibbons et al., 2006). De la même manière, les microglies activées selon un phénotype M1 (par stimulation avec l'association LPS + IFN-γ) vont exacerber la mort des OL et neurones mis en condition de privation de glucose et d'oxygène (Hu et al., 2012 ; Girard et al., 2013 ; Wang et al., 2013).

Les microglies M1 vont également provoquer la mort des OL et des neurones par l'intermédiaire de leur production de cytokines pro-inflammatoires (cf. §4.1.1.3 du présent chapitre) et de glutamate (Suzumura et al., 2013).

Enfin, les microglies de type M1 entravent la régénération des axones en augmentant l'expression de chrondroïtine sulfate protéoglycane, un inhibiteur de la régénaration axonale (Loane & Kumar, 2016).

Phénotype M2

A l'inverse du phénotype pro-inflammatoire, le phénotype M2 confirme *in vitro* ses propriétés neuroprotectrices. En effet, les microglies conditionnées avec des facteurs anti-inflammatoires vont favoriser la neurogenèse par la différenciation des progéniteurs neuraux (Butovsky et al., 2006 ; Luo et Chen, 2012 ; Loane et Kumar 2016). A l'inverse du phénotype M1, les microglies M2, mises en co-culture avec des OL, vont ralentir la mort cellulaire induite par une privation en glucose et en oxygène (Wang et al., 2013).

Les microglies M2 sécrètent du BDNF, facteur essentiel à la neurogenèse (Loane & Kumar 2016), ainsi que des facteurs impliqués dans l'angiogenèse et la neurogenèse tels que le VEGF et le FGF-2 (Thau-Zuchman et al., 2012 ; Loane & Kumar 2016).

Enfin, les cytokines anti-inflammatoires produites par le phénotype M2 vont également avoir un effet protecteur sur les OL soumis à une privation d'oxygène et de glucose (Wang et al., 2013).

Débris de myéline

Les débris de myéline provenant de la destruction des axones neuronaux myélinisés sont produits à la suite du TC et traduisent une agression neuronale (Armstrong et al., 2016). Or, il a été montré que ces débris de myéline inhibent la différenciation des OPC (Robinson & Miller 1999 ; Baer et al., 2009) dans un contexte pro-inflammatoire (Sun et al., 2010). Les débris de myéline inhibent la croissance neuronale et la régénération axonale (Geoffroy & Zheng, 2014), alimentant la NI dans un cercle vicieux. Cependant leur effet délétère est à nuancer, car suite à la phagocytose de ces débris de myéline, les macrophages semblent adopter un profil plutôt anti-inflammatoire (Boven et al., 2006). A l'heure actuelle, peu d'études ont porté sur l'implication de débris de myéline dans le NI, en particulier après un TC.

6.2. In vivo

6.2.1. Lésions de la substance blanche

La substance blanche (SB) est la partie du parenchyme cérébral constituée par les axones alors que la substance grise est composée des dendrites et des corps cellulaires des neurones. Le TC entraine des lésions de la SB, accompagnées d'une atrophie cérébrale (Ajao et al., 2012 ; Bigler et al., 2013 ; Laitinen et al., 2015 ; Harris et al., 2016 ; Taib et al., 2017). Dans le corps calleux, l'atrophie est retrouvée dans 63 à 86% des TC sévères jusqu'à 20 mois (Green et al., 2014) voire plusieurs années après le TC (Johnson et al., 2013a). Aujourd'hui, il est reconnu que les déficits cognitifs et émotionnels associées au TC sont, en grande partie, dus à un dysfonctionnement cérébral induit par les lésions de la SB (Kinnunen et al., 2011 ; Flygt et al., 2016 ; Wang et al., 2018).

Les lésions de la SB sont classées en deux grands types : la démyélinisation et les LAD.

6.2.1.1. Démyélinisation

La myéline

La myéline est une substance qui forme une gaine autour des axones neuronaux pour isoler et protéger les fibres nerveuses et accélérer la vitesse de propagation des influx nerveux. Plus précisément, la myéline consiste en la membrane de cellules spécifiques, qui vont s'enrouler autour des axones. Ces cellules sont les OL dans le SNC, et les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique. La myéline est composée à 70% de lipides non spécifiques et à 30% de protéines comme la myelin basic protein (MBP) qui, elle, ne se retrouve pas dans d'autres membranes cellulaires. Par ailleurs, la myéline va également avoir un rôle nutritif, en apportant des nutriments à l'axone (Nave, 2010).

La perte de myéline dans le TC

Différentes études ont mis en évidence une diminution globale de la quantité de myéline à court terme (2 jours ; Mierzwa et al., 2015), moyen terme (14 jours ; Taib et al., 2017) et long terme (2 mois ; Donovan et al., 2014) après un TC.

Cette démyélinisation pourrait s'expliquer par la mort des OL observée à la suite d'un TC (Bradl & Lassman 2010 ; Shi et al., 2015) dès 4 heures (Flygt et al., 2016) et

jusqu'à 21 jours après (Flygt et al., 2013). Les OL étant responsables de la synthèse de la myéline (Maki et al., 2013 ; Chang et al., 2016), leur destruction va induire une diminution de la myélinisation qui va ralentir la conduction nerveuse, entrainer une désynchronisation de la communication des circuits neuronaux et mener à une dégénérescence axonale (Simons et al., 2014). Comme il a été démontré que les axones non myélinisés sont plus sensibles que les axones myélinisés aux lésions post-TC (Reeves et al., 2005; Johnson et al, 2013b.), la mort des OL va donc aggraver la perte neuronale induite par les LAD (Mierzwa et al., 2015) et la dégénérescence Wallerienne provoquées par les hémorragies et les lésions tissulaires (Armstrong et al., 2016).

Implication des microglies

La mort des OL pourrait être imputable aux microglies, et notamment au phénotype M1, comme retrouvé dans les études *in vitro* (cf. §6.1 du présent chapitre). La corrélation entre le nombre de microglies et la sévérité de la démyélinisation et des lésions axonales (Wang et al., 2013), ainsi que la préservation de l'intégrité de la SB lors de l'inhibition de l'activation de M1 semblent confirmer cette hypothèse (Wang et al., 2015a). Des études expérimentales dans un contexte de TC ont révélé une activation microgliale associée à la présence de débris de myéline (Israelsson et al., 2014 ; Kelley et al., 2007 ; Mierzwa et al., 2015). Les microglies activées aggravant la mort des OL et la démyélinisation, elles vont donc indirectement induire la production de débris de myéline, qui vont à leur tour favoriser l'activation microgliale et créer un cercle vicieux, maintenant et amplifiant la NI délétère (Pinteaux-Jones et al., 2008 ; Jeon et al., 2008 ; Sun et al., 2010 ; Yang et al., 2011 ; Wang et al., 2015b).

Cependant, l'implication des microglies doit être nuancée en raison de la grande vulnérabilité des OL au stress oxydant, à l'excitotoxicité et à l'hypoxie consécutives aux lésions cérébrales primaires du TC, qui vont induire leur apoptose (Bradl & Lassmann, 2010 ; Dent et al., 2015 ; Shi et al., 2015). Ainsi, dans le contexte biochimique du TC, la microglie M1 ne serait pas seule responsable de la mort des OL et de la neurodégénerescence, mais serait peut-être une potentialisatrice de leur mort (Loane & Kumar 2016).

La remyélinisation

La démyélinisation n'est toutefois pas un phénomène irréversible, car une remyélinisation et une prolifération des OPC ont été observées à la suite d'un TC (Lotocki et al., 2011 ; Flygt et al., 2013 ; Dent et al., 2015 ; Mierzwa et al., 2015 ; Flygt et al., 2016 ; Armstrong et al., 2016). Le début de ce phénomène coïncide avec la transition du phénotype M1 au phénotype M2 (Miron et al., 2013). Ce déroulement est cohérent avec les effets du phénotype M2 retrouvés *in vitro* (cf. §6.1 du présent chapitre), sur la préservation de l'intégrité de la SB, la diminution de la démyélinisation des axones et l'amélioration de la transmission nerveuse (Wang et al., 2015a). Ceci explique que les déplétions indifférenciées de tous les phénotypes microgliaux, en empêchant la régénération tissulaire et la récupération fonctionnelle induits par les phénotypes M2, n'engendrent pas systématiquement d'effets bénéfiques, notamment à long terme (Bennet & Brody, 2014 ; Febinger et al., 2015).

6.2.1.2. Les lésions axonales diffuses

Quelle que soit la sévérité du TC, les LAD sont retrouvées quasi-systématiquement. Elles correspondent à la rupture (axotomie) ou à la lésion partielle de l'axone. Les LAD proviennent des contraintes physiques appliquées au parenchyme cérébral lors du TC (pression, accélération/décélération, étirements, etc.) (Johnson et al., 2013b). Ces contraintes mécaniques vont altérer le transport moléculaire, provoquer une cascade biochimique et une accumulation de métabolites dans l'axone, qui va également gonfler. Ce gonflement peut entrainer une déformation du cytosquelette et une fragmentation de la partie distale à la lésion de l'axone, et une séparation de l'axone et du corps neuronal (Johnson et al., 2013b). Si l'axone n'est pas réparé, il va être phagocyté par les cellules immunitaires, avec la gaine de myéline. Ce phénomène est appelé dégénérescence Wallérienne (Johnson et al., 2013b ; Hill et al., 2016). Une des voies de la cascade biochimique subie par l'axone va notamment résulter en l'accumulation de métabolites tels que le précurseur du peptide Aβ, dont les dépôts sont caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (Johnson et al., 2013b ; Hill et al., 2016).

Sur le plan clinique, les LAD sont à l'origine de perte de conscience pendant la phase aiguë du TC. L'étendue des LAD est d'ailleurs corrélée à la durée de la perte de conscience (Smith et al., 2000). Les LAD contribuent également aux séquelles chroniques cognitives et motrices, voire même à la survenue de pathologies neurodégénératives

(Johnson et al., 2013b). Ces lésions sont visualisées dès les premières heures après le TC, et peuvent persister des mois voire des années après, et sont dans ce cas annonciatrices de lésions de la SB (Johnson et al., 2013a,b).

6.2.1.3. Implications de la microglie

En raison de la corrélation spatio-temporelle entre (1) l'activation microgliale et les lésions axonales (Kelley et al., 2007), (2) l'augmentation précoce du taux d'IL-1β dans le LCR et le parenchyme cérébral et la sévérité clinique du TC (Morganti-Kossmann et al., 2007 ; Ziebell & Morganti-Kossmann, 2010 ; Kumar & Loane, 2012), et (3) l'association fréquente entre l'activation microgliale chronique et la dégénérescence de la SB et grise (Johnson et al., 2013 ; Aungst et al., 2014 ; Loane et al., 2014 ; Faden & Loane 2015), la NI chronique de manière générale et l'activation microgliale en particulier, semblent largement contribuer à la neurodégénérescence post-TC (Faden & Loane, 2015, Faden et al., 2016).

6.2.2. Conséquences au long terme

Les lésions de la SB et la neurodégénérescence post-TC (Smith et al., 1997 ; Loane et al., 2014) vont se traduire, à long terme, par l'augmentation de l'incidence de troubles neuropsychiatriques et de pathologies neurodégénératives (Gardner & Yaffe, 2015).

6.2.2.1. L'encéphalopathie chronique post-traumatique

L'ECPT est une pathologie neurodégénérative causée par l'exposition répétée à des TC, mêmes légers (Gavett et al., 2011).

Le TC va provoquer une accumulation de plaques Aβ, retrouvée chez environ 30% des patients ayant subi un TC (Roberts et al., 1994) et dans les tissus entourant les lésions traumatiques retirés lors d'interventions chirurgicales (Donat et al., 2017). Ces plaques peuvent être retrouvées des années après le TC (Johnson et al., 2012). Une accumulation anormale de protéines tau-phosphorylées est également retrouvée à la suite d'un TC (Makinde et al., 2017).

De multiples études suggèrent que les microglies, en promouvant une NI chronique, vont favoriser la phosphorylation des protéines tau et l'accumulation de plaques Aβ à long terme (Makinde et al., 2017). Le nombre de TC est ainsi corrélé à la

présence de microglies activées et de tauopathies, et ce, même plusieurs années après le TC (Cherry et al., 2016). Par ailleurs, l'incidence des ECPT est corrélée à la durée de la pratique de sports à risque et donc au nombre de TC subis (McKee et al., 2013).

L'ECPT se traduit cliniquement par une perte de mémoire à courte terme, et par une irritabilité, une impulsivité, une agressivité, une dépression et une augmentation du taux de suicide dans les 8 à 10 ans suivant la survenue des TC (McKee et al., 2009).

De manière expérimentale, il a été montré que l'activation microgliale est décelable à 7 jours et 1 mois après un TC léger unique chez des souris, mais a disparu à 6 mois, alors qu'elle est toujours présente et associée à la présence de protéines tau phosphorylées chez les souris ayant subi des TC légers répétés pendant une semaine (Ojo et al., 2013 ; Petraglia et al., 2014).

6.2.2.2. La maladie d'Alzheimer

Les plaques Aβ vont avoir une action toxique directe sur les neurones, mais vont également favoriser l'activation et la toxicité microgliale, laissant supposer un rôle majeur de la microglie dans la maladie d'Alzheimer (Block et al., 2007).

La répartition des plaques Aβ est semblable dans le TC et la maladie d'Alzheimer (Scott et al., 2016), de même que l'augmentation de protéines tau phosphorylées et le déficit en acétylcholine post-TC (Donat et al., 2017).

Le TC est historiquement considéré comme associé à une augmentation de la survenue de maladie d'Alzheimer, cependant, les résultats des différentes études sont discordants (Faden & Loane, 2015). Si certaines rapportent une augmentation de la survenue de la maladie d'Alzheimer suite à un TC (Fleminger et al., 2003) et un taux de mortalité par maladie d'Alzheimer multiplié par 4 chez les joueurs de football américains (Lehman et al., 2012), d'autres ne retrouvent pas le TC comme facteur de risque (Dams-O'Connor et al., 2013).

Cette discordance a également été retrouvée expérimentalement avec des études qui ont initialement mis en évidence par imagerie une activation microgliale corrélée aux déficits cognitifs et neurologiques, de manière plus importante que la quantité de plaques Aβ chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Edison et al., 2008 ; Yokokura et al., 2011), alors que des études ultérieures ont montré l'inverse (Schuitemaker et al., 2013).

6.2.2.3. La maladie de Parkinson

Pour la maladie de Parkinson également, les liens de causalité du TC ne sont pas clairement établis. Si de nombreuses études rapportent une augmentation d'environ 1,5 fois du risque de survenue de maladie de Parkinson suite à un TC (Jafari et al., 2013 ; Gardner et al., 2015) d'autres ne retrouvent pas ces résultats (Raj et al., 2017). Le(s) mécanisme(s) sous-jacent(s) à l'augmentation de la maladie de Parkinson suite à un TC n'est (ne sont) pas encore connu(s). Cependant, certaines études émettent l'hypothèse de l'implication de la NI et de l'activation microgliale dans la survenue de cette pathologie (Block et al., 2007 ; Qian et al. 2010).

6.2.2.4. Autres pathologies neurodégénératives

L'activation microgliale a également été associée à la survenue d'autres pathologies neurodégénératives, telles que la sclérose en plaque (Kutzelnigg et al., 2005), la sclérose latérale amyotrophique (McGeer & McGeer, 2002 ; Chen et al., 2007) et la maladie de Huntington (Sapp et al., 2001).

6.2.2.5. Autres conséquences cliniques

Il a été démontré que le degré de lésions de SB est souvent corrélé au degré de déficit comportemental plusieurs mois après une blessure (Mayer et al., 2013 ; Bartnik-Olson et al., 2014 ; Dennis et al., 2015).

Les personnes ayant subi un TC ont entre 1,5 et 17 fois plus de probabilité d'être atteint d'épilepsie, principalement lors de TC pénétrant (Masel et al., 2010). De même, 70% des patients ayant subi un TC rencontreront des troubles du sommeil (Masel et al., 2010).

Enfin, les personnes ayant subi un TC sont à plus haut risque de développer des troubles psychiatriques tels que les psychoses, la dépression, les troubles obsessionnels compulsifs, l'anxiété chronique, l'addiction, etc (Masel et al., 2010).

La physiopathologie de la NI post-traumatique est complexe. Elle implique de nombreux mécanismes biochimiques et de multiples acteurs cellulaires. Parmi ces derniers, la microglie apparait comme centrale dans l'initiation et la régulation de la NI. Différentes études expérimentales *in vivo* et *in vitro* ont mis en avant le rôle de la microglie, notamment activée, dans les conséquences pathologiques du TC, en termes de mort cellulaire et de LSB. De ce fait, la microglie apparait aujourd'hui comme un sujet de recherche majeur, que ce soit à visée diagnostique ou thérapeutique, dans le contexte des LSB post-traumatiques.

CHAPITRE 3 : VISUALISATION ET SUIVI DE LA NEURO-INFLAMMATION ET DE L'ACTIVATION MICROGLIALE

Comme nous venons de le voir, la NI est un élément clé dans la survenue des LSB et des conséquences cliniques post-TC, et la microglie en est un acteur cellulaire central. Pouvoir étudier, quantifier et suivre la NI et l'activation microgliale sont donc indispensables pour (1) mieux comprendre la physiopathologie des complications cliniques du TC et (2) envisager à terme des stratégies thérapeutiques préventives de la survenue de ces complications.

Dans ce chapitre, nous allons donc aborder les différentes méthodes de suivi de la NI et/ou de l'activation microgliale étudiées en clinique, et celles de références utilisées en préclinique.

1. Techniques d'imagerie

En clinique, les techniques d'imageries sont les plus adaptées pour le suivi de l'activation microgliale et de la NI. La tomographie par émission de positons (TEP), notamment, est la technique qui fait aujourd'hui référence en matière d'évaluation de l'activation microgliale. Elle permet un suivi longitudinal de l'activation microgliale et ainsi un suivi de son évolution et de l'efficacité de sa modulation.

1.1. Méthode par tomographie par émission de positons

La TEP est une technique d'imagerie fonctionnelle, largement utilisée en clinique dans diverses pathologies. Cette technique repose sur l'utilisation d'un radioligand qui va se fixer à un récepteur spécifique ou mimer une molécule biologique d'intérêt. La répartition du radioligand, et donc la présence de la cible, va ainsi être évaluée qualitativement et quantitativement.

En recherche expérimentale, l'utilisation de la micro-TEP adaptée aux modèles de petits animaux est relativement récente. Le développement d'appareils adaptés à leur taille ainsi que la découverte de radiotraceurs adaptés à leur métabolisme et capables de cibler de plus en plus de marqueurs biologiques ont permis d'étendre l'utilisation de la micro-TEP à de multiples domaines de la recherche, dont la NI. En outre, la facilité pour transposer les résultats chez l'Homme fait de la micro-TEP une méthode de choix en recherche préclinique.

Dans le cadre du TC, un certain nombre de cibles ont été identifiées et de ligand mis au point pour suivre la NI et ses conséquences (Figure 9).

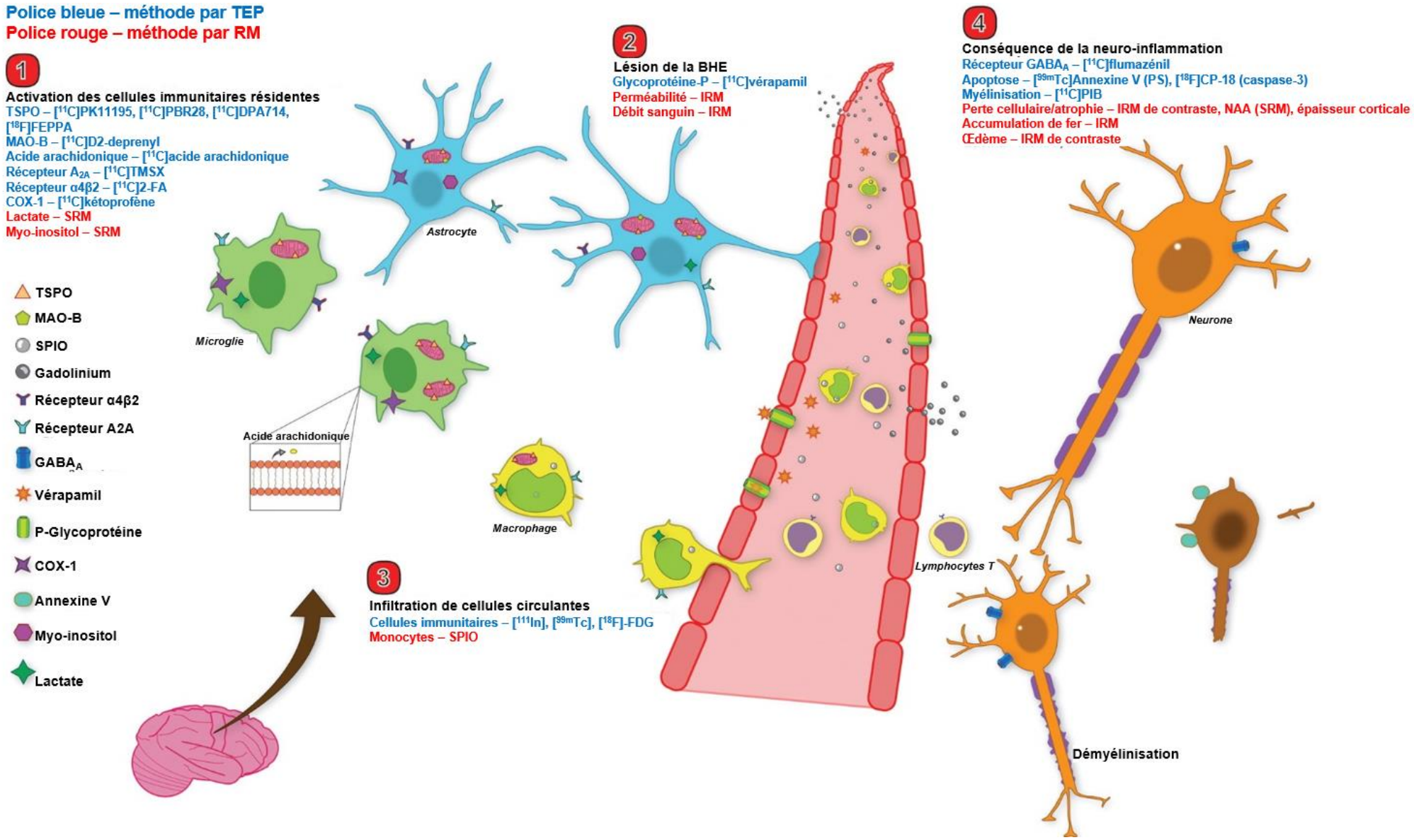


Figure 9 : Principaux marqueurs et cibles utilisés dans le suivi des conséquences du TC par imagerie (TEP et résonance magnétique, RM) (d'après Albrecht et al., 2016).

Abréviations : BHE : barrière hémato-encéphalique ; COX-1 : cyclo-oxygénase de type 1 ; IRM : imagerie par résonance magnétique ; MAO-B : monoamine oxydase de type B ; NAA : N-acétyl-aspartate ; PS : phosphatidylsérine ; RM : résonance magnétique ; SPIO : particule d'ion oxyde supramagnétique ; SRM : spectroscopie par résonance magnétique ; TEP : tomographie par émission de positons ; TSPO : translocator protein.

1.1.1. Marqueurs de la microglie

1.1.1.1. Translocator protein

Le récepteur translocator protein

Le récepteur « translocator protein » (TSPO) est un récepteur à 5 hélices transmembranaires de 18kDa situé dans la membrane externe de la mitochondrie, décrit comme spécifique de la microglie (Bribes et al., 2004 ; Figure 10). Découvert en 1977 lors de recherches de site de liaison au diazépam dans les tissus périphériques (Braestrup et al., 1977 ; Gavish et al., 1999 ; Lacapère & Papadopoulos 2003), le récepteur TSPO a longtemps été dénommé « peripheral benzodiazepine receptor » (PBR) (Papadopoulos et al., 2006). Retrouvé dans la majorité des espèces du règne animal (Veenman & Gavish, 2006), sa découverte en dehors du SNC lui a valu sa qualification de périphérique pour le différencier du « central benzodiazepine receptor » qui est le récepteur à l'acide γ-aminobutyrique de type A ($GABA_A$) comprenant un site de fixation pour les benzodiazépines. TSPO est répandu dans de nombreux tissus et organes (surrénales, gonades, reins, poumons, cœur et foie) mais aussi dans le cerveau, dans une moindre mesure (Galiegue et al., 2003 ; Veenman & Gavish, 2006). Au niveau du SNC, diverses études ont révélé sa présence principalement dans les cellules gliales (astrocytes et surtout microglies ; Gallager et al., 1981 ; Schoemaker et al., 1982 ; Zisterer & Williams 1997 ; Cosenza-Nashat et al., 2009 ; Scarf et Kassiou, 2011 ; Hillmer et al., 2017) et de manière moins importante dans les neurones du bulbe olfactif, les neuroblastes et glioblastes, ainsi que dans les cellules endothéliales (Tomasi et al., 2008 ; Rupprecht et al., 2010). Cependant, à l'état physiologique, TSPO est faiblement exprimé dans le SNC, contrairement aux situations neuro-inflammatoires, où son expression est augmentée, quasi exclusivement par les cellules gliales activées, notamment les microglies. Pour cette raison, certains l'utilisent et le qualifient de marqueur de référence de NI (Chen & Guilarte, 2008 ; Ramlackhansingh et al., 2011 ; Folkersma et al., 2011 ; Sandiego et al., 2015).

TSPO forme un complexe protéique avec un canal ionique voltage-dépendant (VDAC ; 32 kDa) situé sur la membrane mitochondriale externe et une translocase ATP/ADP (ANT ; 30 kDa) située sur la membrane interne de la mitochondrie (Veenman & Gavish, 2006). Bien que son rôle physiologique ne soit pas encore clairement élucidé à l'heure actuelle, TSPO semble impliqué dans plusieurs fonctions

cellulaires importantes. Sa principale fonction est liée au transport du cholestérol et à la biosynthèse des stéroïdes. Il est également impliqué dans le transport des protéines, le transport des porphyrines et la biosynthèse de l'hème, le transport ionique, la prolifération et la différenciation cellulaire, l'immunomodulation, la respiration cellulaire et le processus oxydatif, la régulation du métabolisme mitochondrial et l'apoptose (Papadopoulos et al., 2006).

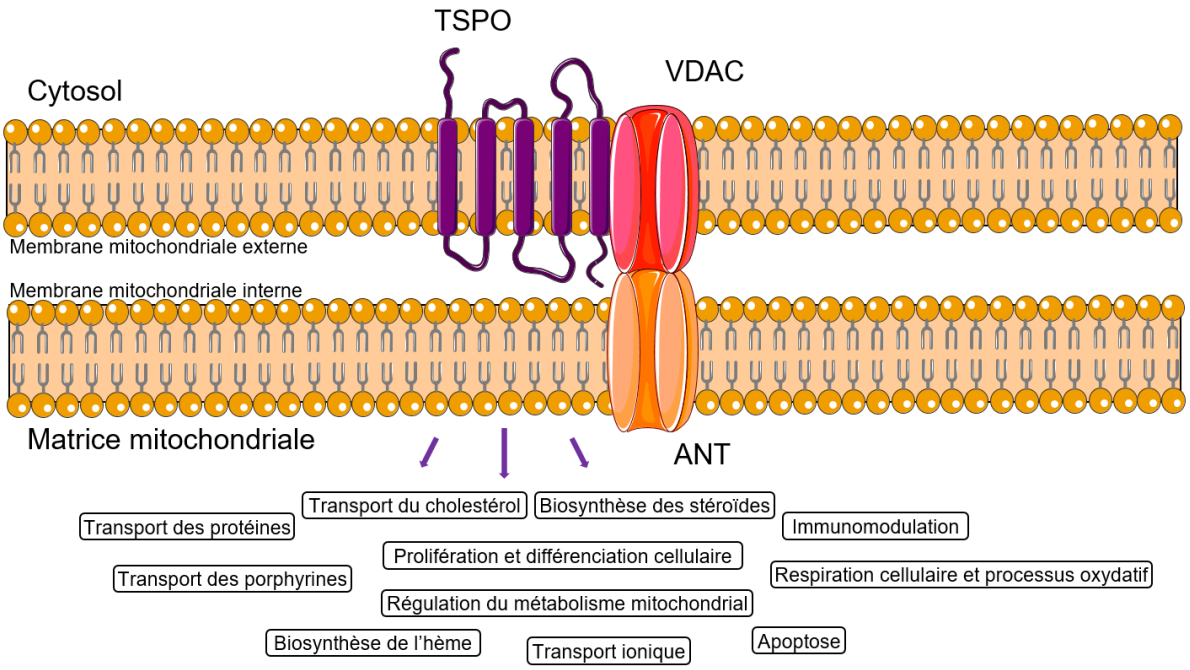


Figure 10 : Structure et rôle du récepteur TSPO.
Abréviations : ANT : translocase ATP/ADP ; TSPO : translocator protein ; VDAC : canal ionique voltage-dépendant.

Les radioligands de TSPO

Les radioligands de TSPO existent depuis les années 80. Le [^{11}C]PK11195, a été pendant des années le ligand le plus utilisé en TEP pour visualiser TSPO, dont il est un antagoniste (Venneti et al., 2006) (Figure 11). Initialement utilisé comme marqueur de TSPO au niveau cardiaque, il a depuis été couramment utilisé pour visualiser l'activation microgliale. Il est ainsi devenu un marqueur de référence pour visualiser la NI *in vivo* dans des situations pathologiques telles que l'ischémie, le TC, la sclérose en plaques et les maladies d'Alzheimer et Parkinson (Turkheimer et al., 2015).

Ces dernières années, une nouvelle génération de ligands de TSPO a été activement développée et diverses molécules ont été mises au point, dont certaines prometteuses : [^{11}C]DAA1106, [^{18}F]FE-DAA1106, [^{11}C]DPA-713, [^{18}F]DPA-714,

[^{18}F]FEPPA, [^{18}F]PBR28, [^{18}F]PBR111 et [^{18}F]PBR06 (Best et al., 2019) (Figure 11). Cette deuxième génération de radiotraceurs de TSPO présente une meilleure diffusion cérébrale, un moindre marquage non spécifique et une meilleure affinité pour le récepteur (Jacobs & Tavitian, 2012).

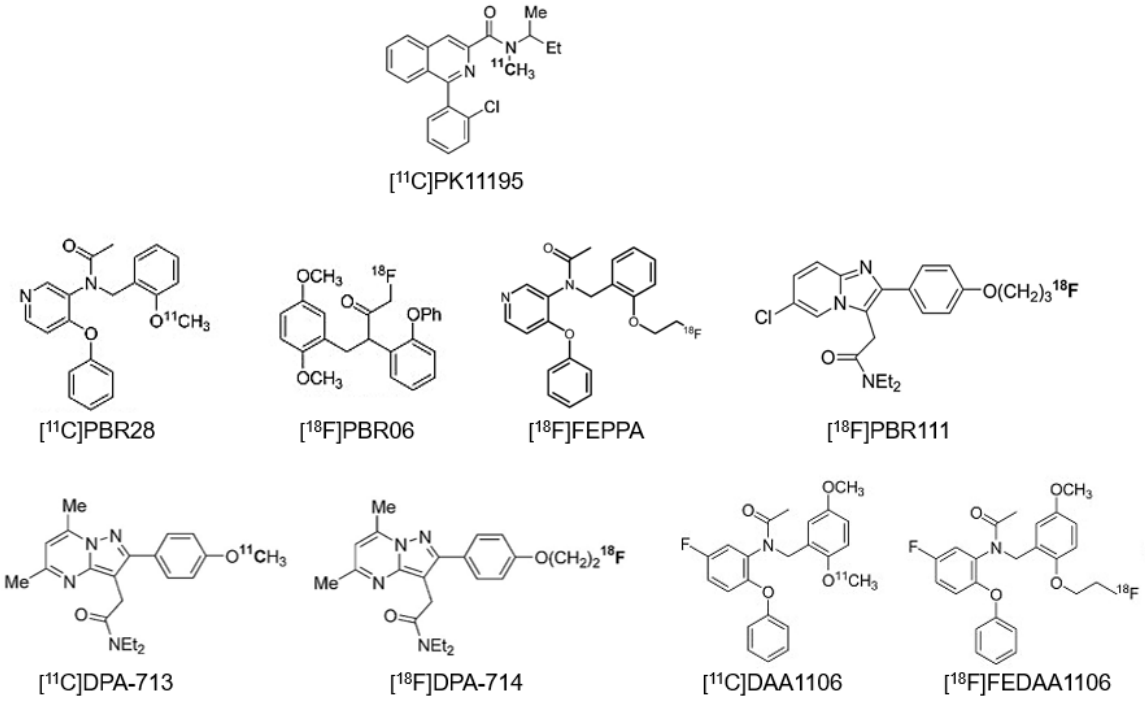


Figure 11 : Les différents radioligands de TSPO utilisés en TEP (d'après Wang et al., 2012 et Zanotti-Fregonara et al., 2014).

Cependant, il a récemment été découvert deux sites différents de fixations des ligands à TSPO, l'un avec une forte affinité et l'autre avec une faible affinité, dont l'expression de chacun varie d'un individu à l'autre (Owen et al., 2010). Par exemple, dans la population caucasienne, 50% des individus expriment uniquement le site à forte affinité, 10% uniquement le site à faible affinité et 40% une part égale les deux (Kreisl et al., 2013 ; Owen et al., 2015). Cette variabilité interindividuelle a ainsi pu biaiser l'interprétation des études ayant évalué jusqu'ici la fixation à TSPO, en attribuant potentiellement une différence entre 2 groupes à l'activation microgliale alors qu'elle était en réalité due à une différence d'affinité pour le récepteur. Si cette variation d'affinité peut être prédite par l'étude du polymorphisme du gène codant pour TSPO, il n'en reste pas moins que (1) elle a pu biaiser les précédentes études, (2) elle complique lourdement le recrutement de patients pour les prochaines études et (3) elle remet en question son utilité en routine

clinique (Owen et al., 2015 ; Albrecht et al., 2016). Il est à noter que ce polymorphisme génétique est absent chez l'animal.

Utilisation des radioligands de TSPO

Les premières études en TEP ont rapporté une augmentation de l'expression de TSPO au niveau cérébral, en réponse à des dommages neuronaux ou à des stimuli pro-inflammatoires, et dans des contextes de NI (Banati et al., 2000 ; Herranz et al., 2016). De nombreuses études ont ensuite démontré que l'expression de TSPO est directement proportionnelle à l'activation microgliale, et potentiellement astrocytaire, à la fois chez l'animal (Imaizumi et al. 2007 ; Chauveau et al. 2011 ; Boutin & Pinborg 2015 ; Serriere et al. 2015 ; Thomas et al. 2016 ; Sridharan et al. 2017) et chez l'Homme (Gulyas et al., 2009 ; Cosenza-Nashat et al., 2009 ; Su et al., 2013 ; Owen et al., 2017). De plus, la fixation de radiotraceurs de TSPO a été rapportée comme colocalisée avec les microglies chez l'animal (Altar et Baudry, 1990 ; Stephenson et al., 1995 ; Banati et al., 1997 ; Gehlert et al., 1997) et chez l'Homme (Banati et al., 2000 ; Sauvageau et al., 2002 ; Edison et al., 2008 ; Cosenza-Nashat et al., 2009).

Chez l'Homme, l'augmentation de l'expression cérébrale de TSPO a été décrite dans de multiples pathologies neuro-inflammatoires ces dernières années (Schweitzer et al., 2010 ; Garden & Campbell, 2016). Ainsi, une surexpression de TSPO dans le SNC a notamment été mise en évidence à l'aide de la TEP dans l'ischémie cérébrale (Pappata et al., 2000), les maladies d'Alzheimer (Cagnin et al., 2001a ; Suridjan et al., 2015 ; Chaney et al., 2019), de Parkinson (Gerhard et al., 2006) et d'Huntington (Tai et al., 2007), la sclérose latérale amyotrophique (Turner et al., 2004), la sclérose en plaques (Vas et al., 2008), l'épilepsie (Goerres et al., 2001) les encéphalopathies herpétiques (Cagnin et al., 2001b) et à VIH (Hammoud et al., 2005), et la schizophrénie (van Berckel et al., 2008).

Dans le contexte du TC, l'expression de TSPO est globalement augmentée, reflétant une NI plusieurs mois, voire plusieurs années après le TC (Ramlackhansingh et al., 2011 ; Folkersma et al., 2011 ; Coughlin et al., 2015, 2017).

Cependant, l'interprétation de la fixation de TSPO comme traduisant uniquement l'activation microgliale reste limitée par son expression par les autres cellules, notamment les astrocytes et les cellules endothéliales. Sa spécificité fait donc débat au sein de la

communauté scientifique (Thelin et al., 2017). Malgré cela, jusqu'aujourd'hui, l'analyse de TSPO en TEP reste la seule méthode d'évaluation de la NI et de l'activation microgliale *in vivo* chez l'Homme (Thelin et al., 2017 ; Chaney et al., 2019).

1.1.1.2. Autres marqueurs

Du fait de la non spécificité de TSPO évoquée précédemment, d'autres marqueurs microgliaux sont actuellement étudiés. Cependant, aucun n'a pour le moment suffisamment d'arguments pour devenir un marqueur de référence de la microglie.

Récepteur aux cannabinoïdes de type 2 (CB2)

Si le récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CB1) est présent en abondance dans le SNC, son isoforme inductible, le CB2, en est quasiment absent à l'état physiologique. Une faible expression du récepteur CB2 a été mise en évidence dans la microglie, les astrocytes fœtaux, et les cellules endothéliales cérébrales microvasculaires (Tronel et al., 2017).

Plusieurs études ont rapporté une augmentation de l'expression de ce récepteur par les microglies activées en conditions inflammatoires, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Benito et al., 2008 ; Stella, 2010), notamment suite à un TC (Lopez-Rodriguez et al., 2015).

Cependant, jusqu'à présent, les études cliniques de radiotraceurs de CB2 n'ont pas réussi à faire leurs preuves pour identifier l'activation microgliale dans des pathologies connues pour l'induire (Vandeputte et al., 2012 ; Ahmad et al., 2013 ; Tronel et al., 2017). Néanmoins, des radiotraceurs de CB2 nouvellement développés sont en cours d'étude préclinique et pourraient s'avérer efficaces pour le suivi de l'expression du récepteur CB2 (Tronel et al., 2017).

Cyclo-oxygénases (COX)

L'enzyme COX-1 est exprimée dans le cerveau sain par les microglies. A l'inverse, l'enzyme COX-2 est exprimée par les neurones et les cellules endothéliales (Deininger & Schluesener, 1999). L'augmentation de l'expression de la COX-1 observée en condition inflammatoire, notamment à la suite d'un TC (Aïd & Bosetti, 2011), semble due aux microglies d'après les études immunohistochimiques (Schwab et al., 2002).

Plusieurs études ont rapporté une bonne efficacité de ces radiotraceurs dans le suivi de l'activation microgliale en conditions pathologiques (Tronel et al., 2017), mais des doutes subsistent encore sur la spécificité microgliale de COX-1, puisque d'autres études ont rapporté une augmentation de son expression par les astrocytes activés (Takashima-Hirano et al., 2010). Par ailleurs, ces ligands n'ont pas encore été expérimentés chez l'Homme en conditions pathologiques (Albrecht et al., 2016).

Récepteurs purinergiques

Récemment, certains sous-types de récepteurs purinergiques ont été identifiés comme des marqueurs spécifiques des phénotypes M1 et M2. Le P2X7, spécifique du phénotype M1, et le P2Y12, spécifique du phénotype M2, apparaissent comme des candidats intéressant pour l'analyse en TEP. Cependant, un radiotraceur de P2X7 venant seulement d'être développé, l'étude de ces marqueurs en TEP n'en est qu'à ses débuts (Shen et al., 2018).

1.1.2. Marqueurs d'autres éléments liés à la NI

L'acide arachidonique

Comme vu précédemment, l'acide arachidonique est un élément clé de la NI, et donc un candidat intéressant pour son suivi, en dépit de son manque de spécificité cellulaire. Une étude a mis en évidence une augmentation du métabolisme de l'acide arachidonique dans un contexte de maladie d'Alzheimer (Esposito et al., 2008), qui pourrait être attribuable à la NI. Cependant, du fait de l'implication de l'acide arachidonique dans une grande quantité de mécanismes physiologiques, il est difficile, à l'heure actuelle et au vu des études disponibles, de conclure sur l'utilisation de ce marqueur dans le suivi de la NI (Albrecht et al., 2016).

Le récepteur nicotinique à l'acétylcholine α4β2

Le récepteur nicotinique a récemment été associé au processus de NI depuis qu'une équipe a mis en évidence un schéma d'augmentation d'expression similaire entre TSPO et le récepteur nicotinique α4β2 dans les microglies et les astrocytes activés dans un modèle expérimental d'ischémie (Martin et al., 2015 ; Sabri et al., 2015). Ces résultats encourageants restent isolés, et l'étude de ce récepteur sur davantage de modèles est nécessaire (Albrecht et al., 2016).

Récepteur à l'adénosine A2AR

Plusieurs récepteurs à l'adénosine sont impliqués dans le phénomène de NI, même si leur action spécifique n'est pas très claire. Le récepteur A2A, en particulier, pourrait être un marqueur de NI, puisque l'imagerie en TEP l'a montré colocalisé avec des lésions de la SB, et localisé dans des régions connues pour être riches en microglies (Albrecht et al., 2016).

1.2. Méthode par résonance magnétique

1.2.1. L'imagerie par résonance magnétique

L'IRM est une technique d'imagerie basée sur la composition en hydrogène et les propriétés magnétiques et quantiques des tissus analysés. Le principe de base est qu'un noyau atomique soumis à une impulsion de radiofréquence va réémettre l'énergie reçue sous forme d'onde électromagnétique dont la fréquence dépend de l'intensité du champ magnétique et de l'environnement moléculaire du proton. Les atomes d'hydrogène présents dans l'eau, les lipides et les autres molécules émettent donc des signaux de fréquence différente (Galanaud et al., 2008). L'IRM permet ainsi la visualisation des tissus par contraste d'intensité suite à l'application d'un champ magnétique. L'IRM permet une bonne visualisation des tissus mous, en revanche, elle ne permet pas un bon contraste des tissus osseux, trop pauvres en hydrogène.

Dans le contexte du TC et de la NI, ses utilisations sont restreintes comparées aux autres méthodes d'imagerie, et s'en tiennent principalement aux conséquences de la NI, par la visualisation de l'œdème, de la perte tissulaire, de la démyélinisation, et des lésions de la BHE et de la SB (Albrecht et al., 2016). Si l'IRM est ainsi la méthode de référence pour l'évaluation de l'atrophie cérébrale, des lésions des SB et grises, et des lésions de la BHE en clinique, elle est peu utile à l'évaluation et au suivi de l'activation microgliale et/ou de la NI en comparaison à la TEP (Albrecht et al., 2016).

La présence de microglie n'a pu être identifiée en IRM que dans un contexte de maladie d'Alzheimer, par l'intermédiaire de la visualisation de l'accumulation de ferritine. En effet, dans la maladie d'Alzheimer, la microglie est connue pour être colocalisée avec la ferritine et les sites de lésions cérébrales. L'IRM, en visualisant l'accumulation de ferritine, permet ainsi de détecter la présence de microglies (Zeineh et al., 2015).

Cependant, cette méthode reste très expérimentale et semble difficile à transposer à d'autres modèles (Shen et al., 2018).

1.2.2. Spectroscopie par résonance magnétique

La spectrométrie par résonance magnétique (SRM) est une technique analytique permettant l'étude de macromolécules, sur la base de leurs propriétés magnétiques, sur le même principe que l'IRM. Alors que l'IRM utilise ce principe pour cartographier les protons de l'eau et de leurs conditions locales, la SRM cherche à quantifier les molécules présentes dans un tissu, notamment cérébral (Galanaud et al., 2008). Grâce à un champ magnétique puissant appliqué de manière tridimensionnelle, la SRM va permettre de déterminer de manière non invasive la composition qualitative et quantitative en protéine d'un tissu ou d'une zone cérébrale définie par l'étendue des trois champs magnétiques appliqués.

Elle permet ainsi d'étudier des protéines et des acides nucléiques à des concentrations millimolaires, ce qui va permettre d'identifier et de suivre les changements biochimiques sous-jacents à la survenue ou à l'évolution de phénomènes physiopathologiques (Chaney et al., 2019).

Cependant, la SRM a ses limites dans le suivi de la NI, notamment du fait que les concentrations de métabolites mesurés sont rapportées à la créatine, qui fait office de référence interne, et qui pourrait être altérée lors de la NI (Chang et al., 2013). Par ailleurs, la définition de la SRM est moins bonne que celle de l'IRM, rendant imprécise l'analyse de petites régions et ne permettant pas de distinguer les compartiments intra- et extracellulaires. Les futurs développements technologiques de la SRM pourraient palier à ces problèmes dans les années qui viennent et potentialiser son utilisation dans le suivi de la NI (Albrecht et al., 2016).

1.2.2.1. Evaluation de l'activation microgliale

Couplé à l'IRM, une étude en SRM a permis de détecter une augmentation de certaines macromolécules et classes de lipides liées à l'activation microgliale dans un contexte pro-inflammatoire (Pardon et al., 2016), qui pourrait permettre de suivre l'activation microgliale *in vivo*. Cependant, cette méthode nécessite d'être confirmée par de plus amples études (Shen et al., 2018).

1.2.2.2. Evaluation de la neuro-inflammation

La SRM, couplée à l'IRM, permet de quantifier certains métabolites cérébraux, impliqués dans les processus immunitaire et inflammatoire. C'est notamment le cas du myo-inositol (mI), du lactate et de la choline.

Myo-inositol

Le mI est un métabolite ayant des fonctions de second messager, d'osmolyte et de précurseur de la membrane phospholipidique (Woodcock et al., 2019). Rapporté comme un marqueur spécifique des cellules gliales puisqu'il a été retrouvé dans les astrocytes et associé à la microglie en culture cellulaire (Brand et al., 1993), il est considéré comme un biomarqueur de la réponse immunitaire du SNC (Woodcock et al., 2019).

Une augmentation du mI a ainsi été rapportée lors de l'activation du système immunitaire dans le SNC, associée à l'hypertrophie et la prolifération des cellules gliales (Bitsch et al., 1999). Cliniquement, une augmentation de mI a été retrouvée chez des patients souffrant de pathologies inflammatoires (Chang et al., 2013).

Cependant, le mI n'est pas encore validé comme un marqueur de la NI à cause de son manque de spécificité, puisqu'une augmentation de mI n'est pas systématiquement rapportée (Foy et al., 2011), et que les augmentations du mI ont également été retrouvées dans des pathologies connues pour ne pas être associées à une NI (Fisher et al., 2002). De plus, peu d'études récentes ont établi le lien direct entre le mI et les cellules gliales. Des études plus poussées sont donc nécessaires avant de considérer le mI comme un marqueur fiable de la NI, notamment associé avec d'autres marqueurs de la NI (Albrecht et al., 2016 ; Chaney et al., 2019).

Lactate et choline

Le lactate augmente dans des conditions hypoxique ou ischémique et est considéré comme un bon marqueur de ces conditions. Sa spécificité cellulaire est à l'heure actuelle mal définie, et des études *in vivo* et d'immunohistochimie (IHC) sont nécessaires pour mieux comprendre son implication dans la NI (Albrecht et al., 2016).

De même, la choline est impliquée dans le processus d'activation gliale et dans l'inflammation, et a été rapportée comme augmentée suite à un TC (Maudsley et al., 2009 ; Govind et al., 2010 ; Babikian et al., 2018 ; Holshouser et al., 2019). Son

augmentation reflète cependant de multiples phénomènes (activation microgliale, déficit énergétique, infiltration macrophagique, démyélinisation) la rendant difficilement utilisable dans le suivi de la NI (Albrecht et al., 2016). De même, une récente étude clinique n'a pas retrouvé de différence dans les taux de ces métabolites chez des militaires ayant subi un TC modéré, en comparaison à des témoins sains, remettant en cause l'utilité de ces marqueurs dans le suivi de la NI (Cartwright et al., 2019).

2. Analyse des fluides

En marge des techniques d'imagerie, les chercheurs s'intéressent depuis plusieurs années à des moyens d'évaluer, explorer et suivre la NI par l'analyse de fluides corporels, comme le LCR et le sang. Ces fluides étant facile d'accès par rapport aux tissus cérébraux, des analyses basées sur de tels échantillons permettraient, tout comme la TEP, un suivi longitudinal de la NI, et représenteraient une méthode diagnostique et pronostique très utile en routine clinique, en évitant les difficultés logistiques liées aux passages en TEP ou IRM.

Un grand nombre de marqueurs diagnostics de la gravité des TC et pronostics des conséquences cliniques à venir ont été étudiés dans le contexte de TC, en protéomique, lipidomique et transcriptomique. En revanche, les marqueurs de NI ont été jusqu'ici peu étudiés, et ils souffrent tous à l'heure actuelle d'un important manque de spécificité (Kornguth & Rutledge, 2018).

2.1. Techniques d'analyse

L'analyse des fluides corporels utilise des méthodes immunologiques ELISA (de l'anglais « enzyme-linked immunosorbent assay ») ou la spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse permet l'analyse de petites molécules telles que les acides aminés, hormones et vitamines, n'impliquant pas de réaction antigène-anticorps (Strathmann & Hoofnagle, 2011).

2.2. Marqueurs microgliaux

Il n'existe pas à l'heure actuelle de marqueurs microgliaux spécifiques exploitables pour le suivi de leur activation par dosage dans le LCR ou le sang. Des biomarqueurs potentiels de l'activation microgliale telles que les cytokines, les chimiokines ou les produits du métabolisme microglial de la kynurénine (kynurénine, tryptophane, acide

quinolénique) peuvent être retrouvés dans le sang et/ou le LCR. Cependant, ces marqueurs manquent de spécificité, et les métabolites de la kynurénine n'ont été que très peu étudiés jusqu'à présent (Garden & Campbell, 2016).

2.3. Marqueurs généraux de la NI

Cytokines

Une augmentation des cytokines dans le LCR et/ou le sang est également observée à la suite d'un TC. La cinétique des cytokines varie à la fois de l'une à l'autre et entre le sang et le LCR (Kossmann et al., 1995 ; Csuka et al., 1999 ; Gruber et al., 2000 ; Stein et al., 2011 ; Garden & Campbell, 2016 ; Thelin et al., 2017). Parmi les différentes cytokines, TNF-α, IL-6 et IL-10 sont celles qui ont été le plus retrouvées après un TC (Kwon et al., 2010 ; Stockhammer et al., 2000) (Tableau 2).

Cependant, en dehors du SNC, les cytokines peuvent être produites par de nombreuses cellules ou tissus. Si l'augmentation des cytokines sériques est bien la preuve d'un dérèglement de la réponse inflammatoire (Garden & Campbell, 2016), la question est d'identifier la part de la NI dans cette augmentation de cytokines sériques. En effet, une partie des cytokines pourrait provenir des cellules périphériques suite au TC (1) lorsque d'autres traumatismes physiques sont associés au TC et (2) du fait du recrutement des cellules immunitaires périphériques observé après le TC. Ainsi, le déséquilibre inflammatoire observé est probablement à la fois un reflet et un contributeur de l'altération de la régulation du système inflammatoire du SNC (Liu et al., 2014), ce qui pourrait expliquer la divergence des résultats des études ayant étudié la corrélation des cytokines sériques avec les conséquences cliniques (Woodcock & Morganti-Kaussmann, 2013).

Ces marqueurs n'ont jusqu'ici jamais été utilisés en routine clinique, et seulement certains ont été utilisés pour évaluer l'efficacité de nouveaux traitements dans le cadre d'essais cliniques (Garden & Campbell, 2016).

Autres marqueurs inflammatoires

D'autres molécules comme les prostaglandines, l'acide arachidonique et les ERO ont été étudiés dans le sang et le LCR lors de dommages cérébraux (Clausen et al., 2012 ; Bjork et al., 2013 ; Yu et al., 2014 ; Hu et al., 2015). Mais ici encore, ces marqueurs ne

sont actuellement que des outils expérimentaux qui doivent démontrer leur validité (Garden & Campbell, 2016).

2.4. Autres fluides

Il est possible que certaines protéines dérivées du SNC puissent être excrétées dans d'autres liquides biologiques tels que les larmes, la salive ou les urines. Si plusieurs marqueurs de lésions y ont été identifiés (Zetterberg & Blennow, 2016), seul le S100β a été retrouvé dans les urines suite à un TC (Berger & Kochanek, 2006 ; Rodríguez-Rodríguez et al., 2012 ; Adrian et al., 2016).

Protéine	Origine cellulaire	Pic de concentration	Temps de retour à la normale
S100B	Astrocyte	12-27 heures	96 h
GFAP	Astrocyte	3-20 heures	>24 h
TNFα	Multiple		
IL-6	Multiple	2 heures à 2 jours	
IL-10	Multiple	2 heures à 2 jours	

Tableau 2 : Marqueurs les plus prometteurs pour le suivi de la NI par des dosages dans le sang et/ou le LCR (d'après Kornguth et al., 2018).

3. Méthodes classiquement utilisées en préclinique

Les techniques utilisées en clinique pour suivre la NI et l'activation microgliale sont de développement relativement récent. Elles ont pu être mises au point grâce aux méthodes précliniques qui sont, encore aujourd'hui, les méthodes de référence. Malheureusement, si ces méthodes ne sont pas transposées en clinique, c'est parce qu'elles impliquent la mort du sujet, et ne peuvent donc être utilisées chez l'Homme qu'en *post-mortem*. En outre, elles ne permettent pas un suivi longitudinal de la NI.

3.1. Techniques d'analyse

Les techniques utilisées en laboratoire se basent sur deux principes d'identification cellulaire : directe ou indirecte. Dans les deux cas l'identification cellulaire est liée à la spécificité d'une cellule donnée concernant l'expression de protéines (médiateurs, enzymes, récepteurs, etc.), qui la différencie des autres types cellulaires qui ne produisent pas ces protéines. Les protéines spécifiques de la microglie seront utilisées pour le suivi de son activation, et les protéines communes aux différentes cellules impliquées dans le

processus inflammatoire seront utilisées pour le suivi de la NI. La protéomique étudiera la présence des protéines, et la transcriptomique étudiera la présence d'acide ribonucléique messager (ARNm) codant pour ces protéines.

Ainsi, les cellules peuvent être identifiées :

- en identifiant directement les cellules par ciblage de leurs protéines constitutives spécifiques, soit membranaires, soit intracellulaires,
- en mesurant l'expression dans un homogénat tissulaire de protéines produites (sécrétées ou non) ou de leur ARNm qui vont indirectement refléter la présence des cellules recherchées.

3.1.1. Techniques d'analyse directes

Le ciblage de protéines constitutives passe par des méthodes immunochimiques, dans lesquelles un anticorps primaire (Ac I) va se fixer spécifiquement à un antigène, et dont la présence sera révélée par la fixation d'un anticorps secondaire (Ac II) couplé à un fluorochrome. Cela permet d'évaluer qualitativement et semi-quantitativement l'expression de l'antigène, et *in fine*, la présence de la cellule, dans l'échantillon (Figure 12).

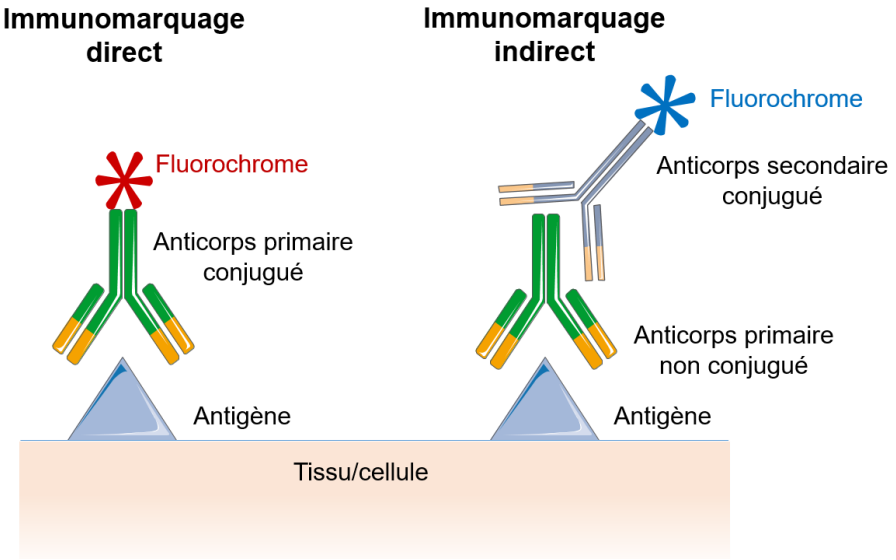


Figure 12 : Illustration du principe des techniques immunochimiques.

Les méthodes varient en fonction de l'échantillon, qui pourra être un tissu, tel que le cerveau, (immunohistochimie ; IHC), une culture cellulaire (immunocytochimie) ou une suspension cellulaire (cytométrie en flux ; CF). Ces techniques sont actuellement parmi

les plus répandues dans la recherche expérimentale sur le TC car en plus d'avoir fait leurs preuves depuis de nombreuses années, elles impliquent du matériel et un coût relativement faible par rapport à d'autres méthodes.

L'immunohistochimie

L'analyse en IHC va permettre d'évaluer la présence, ainsi que la répartition et la localisation des cellules dans un tissu, au moment précis où l'animal aura été mis à mort. Si les antigènes ciblés sont membranaires, l'IHC permettra également une évaluation de la morphologie de la cellule.

L'immunocytochimie

L'analyse en immunocytochimie suit le même principe que l'IHC, mais l'échantillon diffère. Les marquages sont ainsi pratiqués sur une culture cellulaire au lieu d'un tissu, et permettent d'identifier la présence d'un type cellulaire dans la culture et de préciser son profil d'expression des protéines étudiées.

La cytométrie en flux

La CF va permettre l'analyse individuelle de cellules contenues dans une suspension cellulaire, provenant soit de fluides corporels, soit de tissu dissocié et mis en suspension, soit de cultures cellulaires mises en suspension. Les cellules vont passer une par une devant une succession de lasers et capteurs, permettant de déterminer la présence, ou non, des marqueurs sur chaque cellule de l'échantillon (Figure 13). La CF va ainsi permettre une analyse qualitative et quantitative des cellules exprimant le (ou les) antigène(s) ciblé(s), présent(s) dans l'échantillon. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir discriminer avec plus de spécificité les populations cellulaires, puisqu'elle permet d'analyser jusqu'à 18 longueurs d'onde (et donc marqueurs) différents sur un même échantillon pour les appareils les plus récents. Ainsi un co-marquage de différents antigènes permet l'identification plus précise des cellules ne possédant pas de marqueurs totalement spécifiques, comme c'est le cas pour les microglies. De plus, elle permet de quantifier le niveau d'expression de l'antigène par les cellules ce qui permet de différencier des populations cellulaires exprimant le même antigène, mais à des niveaux d'expression différents.

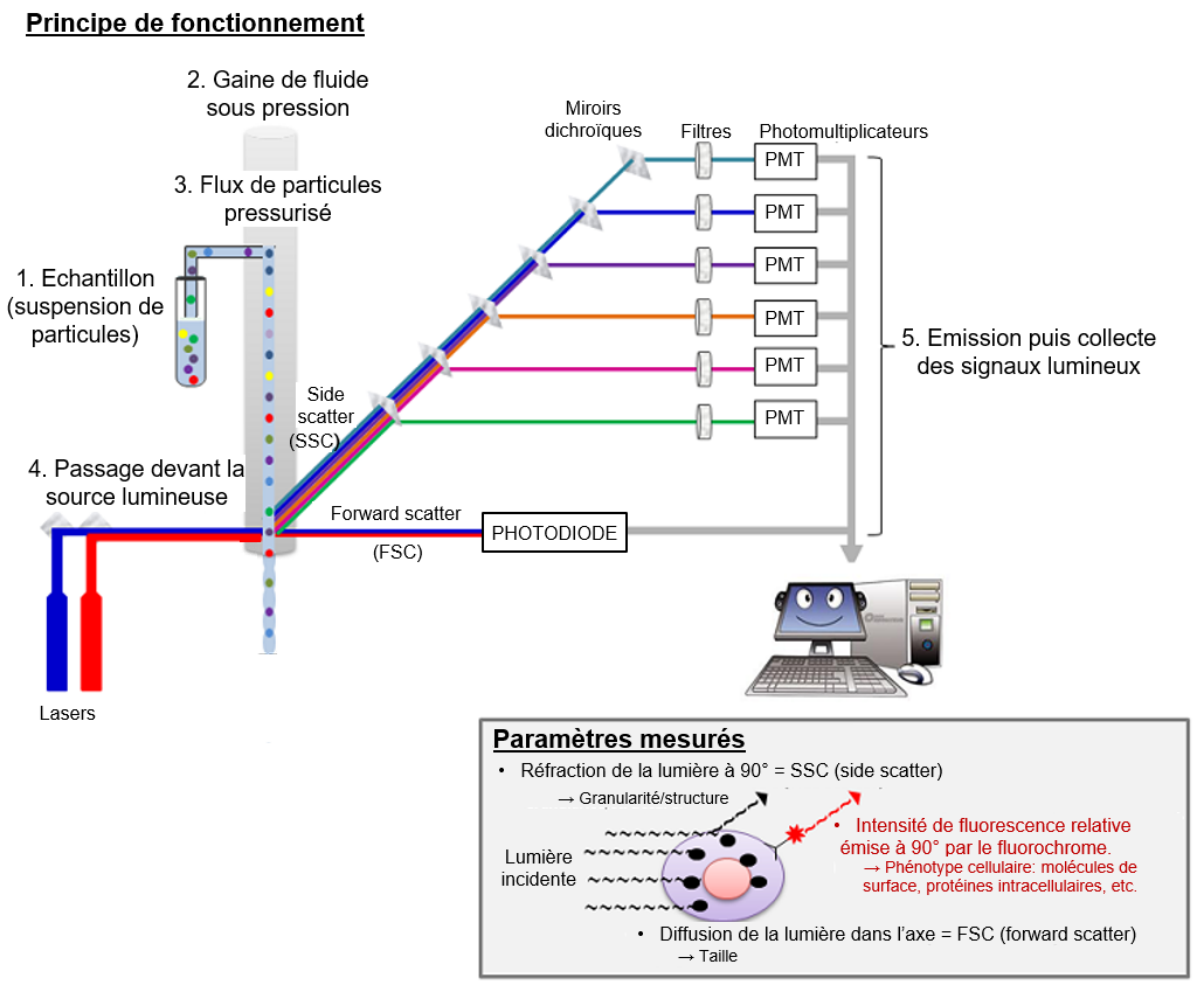


Figure 13 : Principe de fonctionnement des analyses par cytométrie en flux. (image tirée de « principe de la cytométrie en flux et tri cellulaire », CNRS UMR 8251, http://bfa.univ-paris-diderot.fr/cytometrie-en-flux-et-tri-cellulaire/)

3.1.2. Techniques d'analyse indirectes

La présence des microglies peut également être évaluée indirectement par la quantification de l'expression globale d'une protéine (protéomique), ou de l'ARNm correspondant (transcriptomique), dans un fluide ou un tissu dissocié (tel qu'un homogénat de cerveau ou de région cellulaire). La présence d'une protéine spécifique de la microglie ou d'un de ses phénotypes d'activation permettra de mettre en évidence la présence de microglie ou de ses phénotypes.

Le suivi général de l'évolution de la NI et des types cellulaires impliqués peut par ailleurs se faire en identifiant des médiateurs inflammatoires généraux communs à plusieurs cellules ou des éléments impliqués dans le processus et le métabolisme inflammatoire.

Protéomique

L'analyse des protéines d'un échantillon se fait principalement par Western Blot (WB) ou par ELISA.

Le WB consiste à séparer des protéines d'un échantillon en fonction de leur taille, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, puis à réaliser un immunomarquage permettant de révéler et de quantifier la présence de la protéine.

La méthode ELISA est quant à elle une méthode immuno-enzymatique dans laquelle la fixation de l'Ac I à l'antigène cible sera révélée à l'aide d'une enzyme portée par l' Ac II (et non un fluorochrome comme en IHC et CF) qui va catalyser une réaction libérant un composé coloré mesuré par spectroscopie.

Transcriptomique

Ce type d'approche a vu le jour plus récemment, grâce au développement des nouvelles technologies d'analyses. Les ARNm, transcription de gènes nécessaires à la production de protéines, peuvent être identifiés par transcriptase inverse (rt-PCR, pour « reverse transcriptase polymerase chain reaction ») dans un homogénat tissulaire. La transcriptase inverse est une technique d'amplification génique *in vitro* qui permet de dupliquer un grand nombre de séquences d'acide ribonucléique (ARN) connue. Elle permet ainsi de détecter et de quantifier les ARNm présents dans un échantillon, qui reflètent l'activité de transcription d'un gène donné et d'en déduire la traduction de la protéine correspondante.

En connaissant les ARNm correspondant à des gènes spécifiques des microglies, il est ainsi possible d'identifier leur présence dans un tissu. De la même manière, en connaissant les ARNm correspondant aux différents médiateurs de l'inflammation, il est possible de suivre l'évolution de la NI.

3.2. Marqueurs de suivi

3.2.1. Marqueurs microgliaux

Peu de marqueurs totalement spécifiques des microglies ont été identifiés à l'heure actuelle. Les marqueurs de références utilisés depuis des années et encore communément employés sont des marqueurs communs à la lignée monocytaire. La microglie étant le macrophage du SNC, l'utilisation de ces marqueurs est efficace en

conditions physiologiques. Cependant lors d'un TC, l'infiltration de macrophages circulants altère la spécificité de ces marqueurs pour la microglie. Si leur utilisation est toujours possible dû à la faible proportion d'infiltration macrophagique en comparaison de la présence constitutive des microglies, ce manque de spécificité représente un biais dont il faut tenir compte et pousse à la recherche de nouveaux marqueurs, plus spécifiques.

La présence de marqueurs utilisables en IHC et CF pour cibler ou différencier les microglies est résumée dans la Figure 14.

3.2.1.1. Marqueurs de référence

Association de marqueurs

Les microglies expriment CD11b, comme toutes les cellules immunitaires, et expriment faiblement CD45, au contraire des macrophages qui l'expriment fortement. Elles pourront ainsi être différenciées grâce à leur profil CD11b positif/CD45 faible, des macrophages CD11b positif/CD45 fort et de toutes les autres cellules (CD11b négatives/CD45 négatives) (Ford et al., 1995 ; Becher & Antel, 1996 ; Li et al., 2018).

Cependant, cette discrimination nécessitant un comarquage et une quantification précise du CD45, elle n'est pas utilisable en IHC. De plus, la frontière entre l'expression forte et l'expression faible de CD45 est parfois imprécise et est fixée arbitrairement par le manipulateur, ce qui peut conduire à un biais.

Marqueurs des lignées macrophagiques

Les microglies présentent les mêmes caractéristiques d'expression que les macrophages et, à ce titre, peuvent être identifiées par les marqueurs de la lignée monocytaire (Figure 14).

La protéine Iba1 (pour « ionazide calcium-binding adapter molecule 1 »), aussi appelée AIF-1 (pour « allograft inflammatory factor-1 ») est une protéine cytoplasmique spécifique des microglies et macrophages, qui augmente lors de leur activation (Ito et al., 1998). Iba1 est l'antigène le plus utilisé jusqu'à présent pour cibler la microglie en IHC.

D'autres marqueurs de la lignée monocytaire sont utilisés pour marquer les microglies. Le CD68, fortement exprimé par la microglie activée, l'est assez peu par la microglie à l'état quiescent. Le récepteur à la fractalkine, CX3CR1 exprimé à la surface

cellulaire, la glycoprotéine F4/80 et le CMH II également appelé HLA-DR, sont plus fortement exprimés par les microglies activées que par les microglies quiescentes. Le récepteur au CSF1 (le CD115) et le récepteur au Fcγ (CD64) ne sont présents qu'à l'état quiescent (Greter et al., 2015 ; Hendrickx et al., 2017 ; Prinz et al., 2017) (Figure 14).

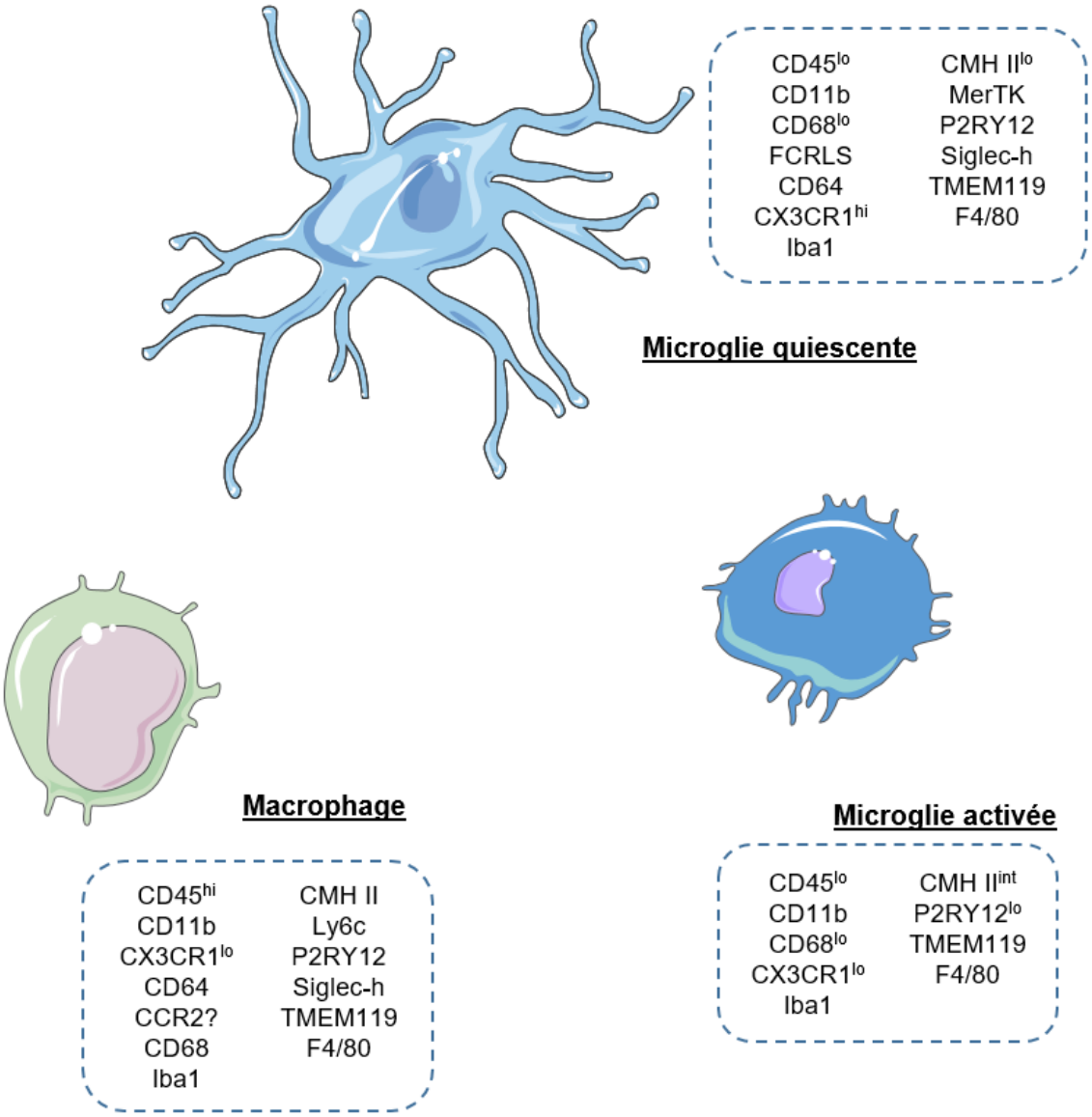


Figure 14 : Marqueurs protéiques utilisables expérimentalement pour mettre en évidence les microglies et leurs différents phénotypes en immunofluorescence (d'après Greter et al., 2015 et Walker & Lue, 2015).

Abréviations : ^{hi} : forte expression du marqueur ; ^{int} : expression intermédiaire du marqueur ; ^{lo} : faible expression du marqueur

A l'état physiologique, ces marqueurs permettent donc de cibler spécifiquement les microglies. Cependant, leur présence dans les macrophages, qui vont infiltrer le parenchyme suite au TC, pousse à la recherche de marqueurs totalement spécifiques de la microglie et de ses différents états d'activation.

Marqueurs des phénotypes

Les différents phénotypes microgliaux peuvent également être identifiés par les cytokines qu'elles expriment, soit en protéomique, soit en transcriptomique. En effet, et comme dit précédemment, les phénotypes microgliaux expriment plus spécifiquement différentes cytokines, qui sont regroupées dans le Tableau 3. Cependant, au vu du nombre de cellules capable de produire des cytokines, cette identification phénotypique doit préalablement passer par l'isolement des microglies d'un échantillon.

Médiateur	Expression microgliale
Facteurs anti-inflammatoires	
TGF-β	M2 ; M2a
IL-4	M2 ; M2a
IL-10	M2 ; M2a ; M2b ; M2c
IL-13	M2
Facteurs pro-inflammatoires	
IFN-γ	M1
TNF-α	M1
IL-1β	M1
IL-6	M1
IL-12	M1
IL-18	M1
IL-23	M1

Tableau 3 : Cytokines sécretées par les phénotypes microgliaux.
(d'après Greter et al., 2015 ; Walker & Lue, 2015).

3.2.1.2. Marqueurs expérimentaux

Marqueurs de microglie quiescente

Récemment, il a été identifié des marqueurs de surface exprimés spécifiquement par la microglie quiescente. C'est ainsi le cas de la protéine sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin H (siglec-h) exprimée à l'état physiologique (Chiu et al., 2013 ; Konishi et al., 2017) mais qui est diminuée dans un contexte inflammatoire (Sousa et al., 2018), du récepteur purinergique P2RY12, diminué par l'administration de LPS (Sousa et al., 2018) et du récepteur MerTK (pour « myeloid-epithelial-reproductive

tyrosine kinase ») exprimé à l'état physiologique et dont l'expression varie dans un contexte inflammatoire (Greter et al., 2015 ; Narayanaswami et al., 2018).

Enfin, la protéine transmembranaire Tmem119, dont les fonctions sont encore méconnues, apparait comme prometteuse car semble hautement spécifique de la microglie (Bennett et al., 2016 ; Satoh et al., 2016). Elle semble cependant diminuée lors d'administration de LPS (Sousa et al., 2018), et n'apparait qu'au cours du développement cérébral, au 7ème jour post-natal pour être totalement exprimé au 14ème jour post-natal chez la souris (Bennett et al., 2016).

Marqueurs des phénotypes inflammatoires

Encore assez peu d'études se sont intéressées et ont réussi à identifier des marqueurs des phénotypes d'activation microgliaux. Cependant, il semblerait que le phénotype M1 exprime spécifiquement les marqueurs CD80, CD86 et CCR7, alors que le phénotype M2 exprime plutôt les marqueurs CD163, CD206 et CD209 (Jin et al., 2012 ; Butovsky et al., 2014 ; Satoh et al., 2016) (cf. §4.1.1.3. du chapitre 2 et Figure 5).

Walker et Lue (2015) ont tenté de résumer les études *in vivo* et *in vitro* de marqueurs de phénotypes microgliaux (Tableau 4), mais ces résultats restent parcellaires et isolés, et des études expérimentales exhaustives de l'expression des marqueurs de chaque phénotype sont nécessaires.

Désignation	M1	M2
CD14	++	–
CD45	++	+
TLR2	++	+
Ferritine	++	Incertain
CD16, CD32, CD64	Incertain	++
CD36	Incertain	++
TREM2	–	+
CD33	–	+
CD163	–	++
CD209	–	++
CCL22	–	++
Cyclo-oxygenase-1	–	++

Tableau 4 : Expression des marqueurs immunitaires spécifiques des microglies humaines
(d'après Walker & Lue, 2015).

3.2.2. Marqueurs de NI

La NI peut donc être suivie par l'intermédiaire des médiateurs de l'inflammations produits par les différentes cellules impliquées dans ce processus. Au premier rang de ces marqueurs, les cytokines apparaissent comme des marqueurs de référence du suivi de la NI. Du fait des propriétés pro- ou anti-inflammatoires des différentes cytokines, leur identification et leur dosage à travers le temps, ou celui de leurs ARNm codants, permet de suivre l'évolution de la NI, à la fois quantitativement et qualitativement.

Il existe de nombreuses cytokines différentes, mais les plus utilisées dans le suivi de l'inflammation sont les cytokines anti-inflammatoires TGF-β, IL-4, IL-10 et les pro-inflammatoires IL-1β, IL-6, IL-12, IFN-γ et TNF-α.

3.2.3. Gènes spécifiques de la microglie

Au-delà des gènes codant pour les protéines spécifiques des microglies décrites précédemment, le développement des méthodes de séquençage ont permis d'identifier des gènes spécifiques aux microglies. La première base de données de séquençage (la « signature ») des gènes de microglies à l'état physiologique permettant de les différencier des autres cellules du SNC et des autres macrophages, a été mise au point en 2012 (Gautier et al., 2012). Depuis, 7 autres études majeures ont été menées (Chiu et al., 2013 ; Hickman et al., 2013 ; Gosselin et al., 2014 ; Lavin et al., 2014 ; Butovsky et al., 2014 ; Bennett et al., 2016 ; Kim et al., 2016), permettant d'établir avec précision la signature génétique des microglies. Ainsi, il est maintenant connu qu'elles contiennent entre autre les gènes *Sall1, Hexb, Fcrls, Gpr43, Cx3cr1, Tmem119, Trem2, P2ry12, Mertk, Pros1 et SiglecH,* qui sont exprimés seulement ou de manière plus importante par les microglies, et pas ou peu par les autres cellules cérébrales et de la lignée myéloïde (Dubbelaar et al., 2018).

Des études menées chez l'Homme ont ensuite montré une signature génétique semblable entre les microglies murines et humaines, avec quelques gènes exprimés uniquement chez l'Homme, tels que les gènes *Apoc1, Mpzl1, Sorl1, CD58, Erap2, Gnly et S100a12* (Dubbelaar et al., 2018).

Il est à noter que la signature génétique des microglies semble évoluer avec l'âge le sexe, le temps et les facteurs environnementaux (Dubbelaar et al., 2018).

Bien qu'ayant fait leurs preuves et étant communément utilisées en laboratoire, ces dernières méthodes présentent le désavantage majeur de nécessiter de travailler sur des échantillons de cerveaux. Elles ne peuvent donc être mises en œuvre qu'en pré-clinique ou en *post-mortem* chez l'Homme Cette impossibilité d'extension à la clinique représente un frein majeur à la recherche sur la NI post-traumatique.

BUT DU TRAVAIL

Ces dernières années, les études s'intéressant aux conséquences du TC ont mis en évidence une corrélation entre la NI et les séquelles post-traumatiques à long terme. Plus précisément, les études *in vivo* et *in vitro* ont révélé le rôle majeur de la microglie dans la régulation de la NI, et son implication dans les LSB. Cependant, la microglie a un rôle complexe puisqu'elle se révèle à la fois neurotoxique et neuroprotectrice, en fonction de son phénotype d'activation. Les mécanismes influant sur l'activation microgliale ne sont pas encore entièrement connus. Cependant, les débris de myéline produits à la suite d'un TC pourraient participer à l'activation microgliale. Il apparait aujourd'hui nécessaire de disposer de méthodes suffisamment spécifiques et sensibles pour la détermination et le suivi de l'évolution de son activation afin (1) de mieux comprendre le rôle de la microglie dans la NI et les mécanismes à l'origine de son activation, et (2) d'évaluer les conséquences de sa modulation.

La protéine TSPO étant décrite dans la littérature comme spécifique de la microglie, l'objectif principal de ces travaux a été d'évaluer l'utilisation de cette protéine pour le suivi de l'activation microgliale dans le TC. Pour cela, un modèle de TC chez la souris a été utilisé car le laboratoire a précédemment décrit la présence de phénotypes microgliaux (Taib et al., 2017). Dans un premier temps, ce marqueur a donc été étudié en TEP afin d'évaluer son utilisation sur ce modèle et sa potentielle transposabilité en clinique. Dans un second temps, afin de valider sa spécificité pour la microglie, des études immunohistochimiques, immunocytochimiques et de CF ont ensuite été menées avec une multitude de marqueurs pour identifier précisément les types cellulaires à l'origine de l'expression de TSPO. Enfin, le dernier objectif a été d'étudier l'effet de la phagocytose des débris de myéline sur l'activation microgliale et sa différenciation, dans ce modèle de TC chez la souris.

MATERIELS ET METHODES

1. Ethique et animaux

Toutes les expérimentations utilisant l'animal ont été approuvées par le comité d'éthique de l'Université Paris Descartes (CEEA34) et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFiS#4765) en accord avec la directive européenne relative à la protection des animaux à des fins scientifiques (2010/63/UE). Elles ont été réalisées sur des souris mâles Swiss d'environ 30 g (Janvier Labs ; Le Genest St-Isle), stabulées au sein de l'animalerie satellite du laboratoire dans un environnement à température contrôlée (22 ± 2°C) en alternance jour/nuit par cycle de 12 heures, avec accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*.

2. Modèle de traumatisme crânien

2.1. Principe, réglages et procédure chirurgicale

Le modèle de TC est induit par un impact cortical contrôlé (ICC). Précédemment développé au sein du laboratoire (Taib et al., 2017), il a été réalisé suivant le modèle décrit dans la littérature (Smith et al., 1995 ; Hall et al., 2005). Les premiers TC ont été réalisés par le doctorant Toufik Taib, le temps que je prenne en main ce modèle.

L'anesthésie a été réalisée par inhalation d'isoflurane, à une concentration de 3,5%/100% air pendant 2 minutes pour l'induction de l'anesthésie, puis de 1,5%/100% air pour son maintien pendant la chirurgie. Placé en contention stéréotaxique à l'aide de barres d'oreilles, l'animal est maintenu à une température corporelle de 37,5°C ± 0,5°C grâce à une couverture chauffante. La peau a été incisée afin de dégager la boîte crânienne et une craniotomie d'un diamètre de 4 mm a été réalisée au niveau de l'hémisphère gauche, entre le bregma et le lambda (Figure 15), en prenant soin de ne pas endommager la dure-mère. L'impact cortical a ensuite été réalisé à l'aide d'un piston pneumatique d'un diamètre de 3 mm délivrant un impact direct sur la dure-mère avec un angle de 15°, une vitesse de 3,5 m/s, une profondeur de 1 mm et un temps de contact de 50 ms. La craniotomie a ensuite été rebouchée par de la cire de Horsley puis la plaie a été suturée. Les animaux ont ensuite été maintenus en couveuse thermostatée à 26-28°C jusqu'à leur réveil, puis remis dans leurs cages initiales.

Les souris ayant subi toutes ces étapes ont été appelées TC. Les témoins opérés (TO) ont subi les mêmes étapes (y compris la craniotomie), à l'exception de l'impact. Ces animaux ont servi de témoins pour dissocier l'effet de l'impact de celui de la craniotomie. Les animaux non opérés (NO) n'ont subi aucune manipulation.

Bien que chez l'Homme, la sévérité d'un TC est évalué à l'aide du GCS non transposable aux rongeurs, nous avons considéré que notre modèle de TC est de sévérité légère au regard des paramètres d'impact des autres modèles de TC retrouvés dans la littérature (Washington et al., 2012). Les faibles déficits neurologiques induits dans notre modèle (Taib et al., 2017) permettent également de définir ce TC d'une sévérité légère.

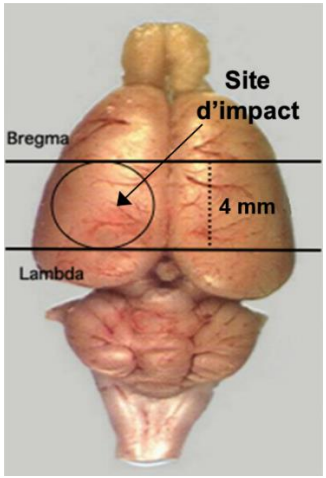


Figure 15 : Illustration de la zone de la craniotomie et du site d'impact

2.2. Evaluation de la prise en main du modèle

2.2.1. Evaluation de l'œdème cérébral

L'œdème cérébral a été évalué par la mesure du contenu cortical en eau, qui a été obtenue par la différence entre le poids humide et le poids sec du cortex (Hellal et al., 2003). A 1 et 2 jours après la chirurgie (respectivement J1 et J2), les animaux ont été euthanasiés, les cerveaux ont été prélevés et les hémisphères séparés. Sur une tranche coronale de 3 mm centrée sur le site d'impact, chaque demi-cortex a été prélevé, pesé et déposé à l'étuve pendant 24 heures. Les échantillons ont ensuite été, à nouveau, pesés pour obtenir le poids sec. Le pourcentage d'eau contenue dans le cortex au moment du

prélèvement, utilisé comme témoin d'un œdème cérébral, a été calculé de la façon suivante :

$$\% \text{ en eau } = \left(1 - \frac{\text{poids sec}}{\text{poids humide}}\right) \times 100$$

2.2.2. Evaluation des déficits neurologiques

Les déficits neurologiques ont été évalués à l'aide d'un score neurologique sur 20 points. Le score neurologique chez l'animal est inspiré des échelles utilisées chez l'homme pour évaluer les déficits neurologiques. Ce score permet d'évaluer différents réflexes et réactions sensorimotrices. Cette version de score neurologique est une version modifiée de celle décrite par Bederson et collaborateurs (1986). Il consiste à attribuer un grade allant de 0 à 2 suivant la réponse de l'animal (0 : pas de réponse; 1 : réponse anormale, c'est-à-dire peu intense ou différée ; 2 : réponse normale), évaluée par les items suivants (Tableau 5 ; Leconte et al., 2009):

- l'asymétrie et la perte du réflexe postural mesurées lorsque la souris est suspendue par la queue par l'expérimentateur; la souris saine ne présente pas de flexion du corps avec pour référence l'axe vertical, et pas de flexion des pattes également;
- la résistance à la poussée vers le côté gauche ou droit;
- le comportement rotatoire;
- la sensibilité de l'oreille gauche ou droite par stimulation tactile à l'aide d'un pinceau.

<table>
<tr><th colspan="3">Paramètres mesurés</th><th>Score</th><th>Score maximal</th></tr>
<tr><td rowspan="5">Asymétrie et perte du réflexe postural</td><td colspan="2">Torsion du corps</td><td>2 points : pas de retournement
1 point : retournement partiel
0 point : retournement complet</td><td>2 points</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Flexion des pattes</td><td>Avant droite</td><td rowspan="4">2 points : pas de flexion
1 point : légère flexion
0 point : flexion</td><td rowspan="4">8 points</td></tr>
<tr><td>Avant gauche</td></tr>
<tr><td>Arrière droite</td></tr>
<tr><td>Arrière gauche</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Résistance à la poussée latérale</td><td colspan="2">Poussée vers le côté gauche</td><td rowspan="2">2 points : résistance
1 point : faible résistance
0 point : pas de résistance</td><td rowspan="2">4 points</td></tr>
<tr><td colspan="2">Poussée vers le côté droit</td></tr>
<tr><td colspan="3">Comportement rotatoire</td><td>2 points : ne tourne pas
1 point : tendance à tourner
0 point : tourne sur elle-même</td><td>2 points</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Sensibilité de l'oreille</td><td colspan="2">Oreille gauche</td><td rowspan="2">2 points : retournement de l'animal
1 point : légère flexion de l'oreille
0 point : ne réagit pas</td><td rowspan="2">4 points</td></tr>
<tr><td colspan="2">Oreille droite</td></tr>
<tr><td colspan="4">TOTAL</td><td>20 points</td></tr>
</table>

Tableau 5 : Score attribué pour chaque paramètre du score neurologique sur 20 points

3. Imagerie par tomographie par émission de positon

3.1. Définition et principe

La TEP est une technique d'imagerie fonctionnelle permettant d'évaluer *in vivo* la distribution d'une molécule marquée par un émetteur de positons (ex : ^{18}F, ^{11}C, ^{18}O). La TEP permet ainsi une analyse fonctionnelle d'un organe si la molécule est un substrat métabolique, mais également une analyse qualitative et quantitative de la distribution d'une cible si la molécule est un ligand spécifique d'une cible, telle qu'un récepteur par exemple (cf. §3 du chapitre 3 des Rappels Bibliographiques).

L'émetteur de positon consiste en un atome radio-actif possédant un excès de charge positive dans son noyau, qui va subir une réaction β+ et émettre un positon (e^+). Le positon parcourt quelques millimètres dans le tissu jusqu'à rencontrer un électron (e^-), provoquant une réaction d'annihilation. Deux photons de 511 keV sont alors émis dans des directions opposées et détectés en coïncidence par les anneaux disposés autour du sujet, ce qui permet la localisation précise de leur émission. La mesure du nombre d'impacts et de leur provenance permet de déterminer la concentration du ligand, et donc de la cible, en chaque point de l'organisme, et d'établir ainsi une modélisation en trois dimensions de l'activité métabolique ou moléculaire d'un organe.

3.2. Marqueur utilisé

Pour l'imagerie en TEP, nous avons utilisé un radiotraceur de TSPO de 2ème génération, le N-(2-(2-fluoroéthoxy)benzyl)-N-(4-phénoxypyridin-3-yl)acétamide (FEPPA) marqué au fluor 18.

La radiosynthèse du [^{18}F]FEPPA a été réalisée au sein de l'unité Claude Kellershohn à l'hôpital Saint-Louis (AP-HP) à Paris par les Drs Hosten et Vignal. L'émetteur de positons a été fabriqué à l'aide d'un cyclotron à l'hôpital Saint-Louis, puis assemblé au ligand sur place, le matin de chaque jour d'analyse, suivant le protocole décrit par Vignal et collaborateurs (2018).

Pour chaque souris, une dose de radiotraceur correspondant à une activité de 11 à 12 MBq a été prélevée, puis complétée par du NaCl 0,9% afin d'atteindre un volume d'injection de 1 mL.

3.3. Protocole

L'acquisition a été lancée, 1h30 après l'injection du radiotraceur, pour une durée totale de 30 minutes.

L'étude a été effectuée sur 3 groupes de souris :

- le premier groupe (G1) est passé en TEP à J1 puis J3 après la chirurgie ;
- le deuxième groupe (G2) est passé à J3 puis J7 ;
- le troisième groupe (G3) est passé à J7 puis J14.

Dans la mesure du possible, les analyses ont été effectuées sur les mêmes souris entre J1 et J3, J3 et J7, et J7 et J14 (Figure 16). Cependant, l'injection intraveineuse chez les souris s'effectuant par la veine caudale dont l'accès parfois difficile, a rendu impossible 2 injections à quelques jours d'intervalle chez quelques souris. Ainsi, certaines n'ont pas pu être injectées deux fois. Dans ces cas-là, une souris différente, mais opérée le même jour et conservée dans la même cage a été utilisée.

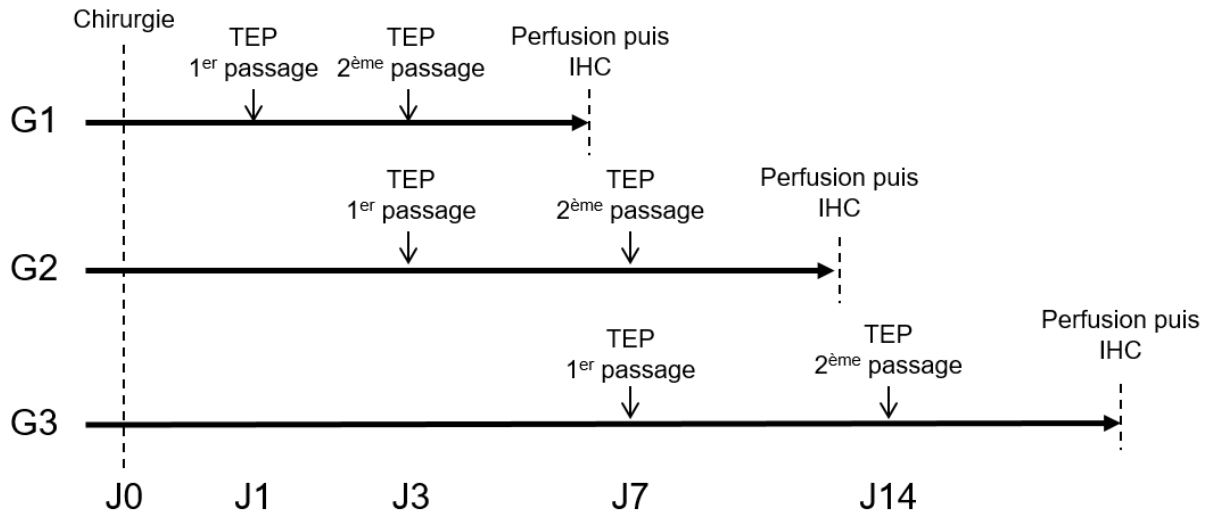


Figure 16 : Protocole expérimental de l'étude statique en TEP
Huit souris ont pu être passées en TEP chaque jour.

Au total, 48 analyses TEP ont ainsi été effectuées (Tableau 6). Le nombre de souris a été volontairement augmenté pour les passages à J3 et J7 du fait de la NI plus importante à ces temps (Taib et al., 2017).

Souris	J_1	J_3	J_7	J_{14}	Total
Non opérées	1	2 *(dont celle passée à J1)*	2	1 *(dont celle passée à J7)*	6 *(dont 2 passées 2 fois)*
Témoins opérées	3	6 *(dont 1 passée à J1)*	6 *(dont 3 passées à J3)*	3 *(toutes passées à J7)*	18 *(dont 7 passées 2 fois)*
TC	4	8 *(dont 3 passées à J1)*	8 *(dont 4 passées à J3)*	4 *(toutes passées à J7)*	24 *(dont 11 passées 2 fois)*

Tableau 6: Nombre de souris analysées en TEP
en fonction du groupe et du temps étudié.

Pour des raisons de sécurité lors des manipulations, les souris ont été perfusées le lendemain du 2ème jour de passage en TEP, le temps pour l'émetteur de perdre toute activité radioactive.

Les animaux ayant servi pour la TEP ont ensuite été utilisés pour l'IHC (cf. §4 de la partie Matériel et Méthodes).

3.4. Matériel et logiciels utilisés

Les manipulations de TEP ont été effectuées avec un appareil « INVEON µPET/CT scanner » de la marque Siemens. Les images ont été acquises à l'aide du logiciel INVEON Research Workplace®, puis traitées et quantifiées par le logiciel PMOD technologies LLC® version 3.806.

3.5. Quantification

Après une évaluation visuelle de la bonne qualité de l'imagerie, les images obtenues en TEP ont été couplées à celles obtenues par le scanner, et rognées pour ne conserver que l'image de la tête de l'animal. Les images du scanner ont été automatiquement ajustées pour correspondre à un atlas de cerveau de souris (modèle « M. Mirrione », inclus dans PMOD). Cet ajustement a été appliqué aux images TEP correspondantes. Cet atlas de cerveau de souris contient 20 régions d'intérêts (ROI) prédéfinies et permet de mesurer les valeurs de fixation du radiotraceur en fonction des différentes régions du cerveau (Figure 17). Cet atlas a permis de dissocier 6 régions (cortex, striatum, hippocampe, amygdale, mésencéphale et *colliculus* inférieur) dans les hémisphères gauche (ipsilatéral) et droit (controlatéral), et 8 régions non différenciées latéralement (thalamus, cervelet, septum basal cerveau antérieur, bulbe olfactif, hypothalamus, tronc cérébral, noyaux gris centraux et *colliculus* supérieur).

La valeur du pourcentage de dose injectée par gramme de tissu (%ID/g) a été calculée pour évaluer la qualité de la diffusion et de la fixation du radiotraceur dans l'organisme de l'animal et pour traiter les images (Figure 17), à l'aide de la formule suivante :

$$\% \frac{\text{ID}}{\text{g}} = \left(\frac{\text{activité mesurée (kBq)/dose injectée (kBq)}}{\text{masse de tissu (g)}} \right) \times 100$$

La valeur de fixation standardisée (Standard Uptake Value : SUV), qui permet de normaliser les valeurs de radioactivité mesurées par la dose injectée et le poids de la souris, a été utilisée pour les quantifications et les comparaisons statistiques. La SUV a été calculée de la manière suivante (le poids de la souris est considéré selon l'équivalence: 1 g = 1 mL) :

$$\text{SUV} = \frac{\text{fixation (kBq/mL)}}{\text{dose injectée (kBq)/poids de la souris (g)}}$$

En considérant que le radiotraceur se répartit de manière homogène dans le corps de l'animal, une SUV supérieure à 1 exprime une surfixation du traceur dans la zone définie.

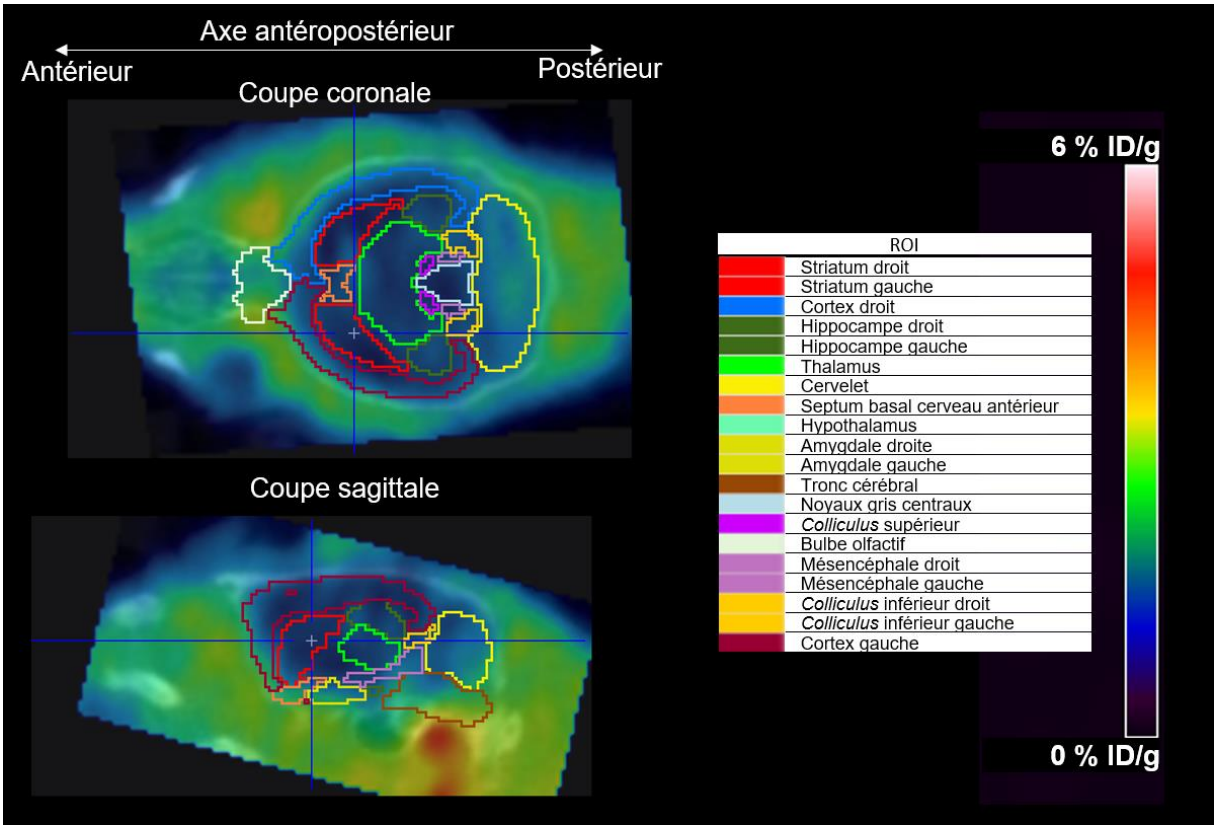


Figure 17 : Application des ROI, prédéfinies par le logiciel PMOD, sur les images d'un cerveau de souris obtenues en TEP après traitement.

3.6. Comparaisons statistiques

Les valeurs moyenne (SUVmean) et maximale (SUVmax) des SUV au sein de chaque ROI ont été relevées, ainsi que la somme totale et les variances des SUV.

Malgré la standardisation des mesures de SUV, il persistait une grande variabilité des résultats au sein des groupes, ce qui empêchait les comparaisons directes entre les groupes de souris. Par conséquent, nous avons calculé un ratio de SUV ipsilatéral/controlatéral pour 1) étudier la variation induite par le TC et 2) pouvoir effectuer les comparaisons statistiques.

Les moyennes des ratios des valeurs moyennes et maximales de SUV des différents groupes de souris ont été comparées à l'aide d'une ANOVA à un facteur suivi

d'un test de Bonferroni. Les valeurs de probabilité inférieures à 5 % ($p < 0,05$) ont été jugées significatives.

4. Immunohistochimie

4.1. Principe

L'immunohistochimie (IHC) est une technique d'immunomarquage permettant de révéler la présence d'une protéine au sein de coupes tissulaires, grâce à sa reconnaissance par un Ac I spécifiquement dirigé contre cette cible. Par la suite, un Ac II couplé à un fluorochrome marque la présence de l'Ac I. L'émission de la fluorescence par le fluorochrome de l' Ac II permet de visualiser la fixation de l'Ac I et donc la présence et la localisation de la protéine cible. L'IHC permet ainsi une analyse qualitative et semi-quantitative de la présence d'une protéine sur une coupe de tissu ou organe.

4.2. Préparation des coupes de cerveaux

4.2.1. Mise à mort des animaux

Les animaux, ayant été passé pour l'imagerie en TEP, ont ensuite été mis à mort pour réaliser des études IHC de la protéine TSPO. Afin d'obtenir des résultats d'IHC à J1, une série supplémentaire de souris a été opérée puis perfusée à J1 sans avoir subi d'imagerie par TEP.

Les animaux anesthésiés ont été perfusés par voie intracardiaque par du NaCl 0,9% pendant 2 minutes puis par du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 4 minutes, avec une pression constante de 100 mm Hg. Les cerveaux ont ensuite été prélevés et placés dans une solution de sucrose à 30% pendant 72 heures à 4°C. Après avoir été égouttés, les cerveaux ont été placés pendant 5 minutes dans du 2-méthylbutane à -40°C pour les congeler rapidement, mis en sachets puis laissés 48 heures à -40°C, avant d'être stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

4.2.2. Coupe des cerveaux

Avant de procéder à leur coupe au cryostat, les cerveaux ont été placés à -20°C pendant au moins une heure. Ils ont été ensuite coupés à l'aide d'un cryostat (JUNG CM3000, Leica Microsystems). Les coupes de 20 µm d'épaisseur ont été déposées sur des lames gélatinées stockées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

4.3. Protocole de marquage

Préparation des lames

Dès le retour à température ambiante, les coupes ont été fixées dans un bain d'acétone sur glace pendant 5 minutes. Elles ont ensuite été réhydratées dans une solution de tampon phosphate (phosphate-buffered saline – PBS) (NaCl à 137 mM, KCl à 2,7 mM, Na_2HPO_4 à 8,1 mM, KH_2PO_4 à 1,5 mM) pendant 15 minutes à température ambiante. Les lames ont ensuite été entourées de Dakopen® pour maintenir les solutions d'anticorps sur la lame pendant l'incubation.

Incubation des anticorps primaires

Les Ac I ont été dilués dans une solution de PBS- gélatine (0,2%) – triton X- 100 (0,25%). La gélatine, en saturant les sites de fixation non spécifiques, permet de diminuer la fixation non spécifique des Ac I et ainsi le bruit de fond. Le triton X-100 perméabilise les membranes cellulaires et ainsi permet la fixation des Ac I dont la cible est intracellulaire.

Pour le marquage avec l'anticorps anti-dMBP, du sérum d'âne (5%) a été utilisé à la place de la gélatine, pour une saturation des sites non spécifiques plus efficace à cause de la faible présence de débris de myéline dans le cerveau. Une fois l'incubation terminée, les lames ont été lavées avec du PBS (1 x 5 minutes) puis avec un mélange de PBS-Tween 0,1% (3 x 5 min).

Incubation des anticorps secondaires

Les coupes ont ensuite été incubées avec les Ac II dilués dans une solution de PBS-gélatine (0,2%)-triton-X100 (0,25%), pendant 1h30 à température ambiante et dans l'obscurité. Pour le marquage avec l'anticorps anti-dMBP, du sérum d'âne (5%) a été utilisé à la place de la gélatine. A la fin de l'incubation, les lames ont été lavées dans du PBS-Tween 0,1% (3 x 5 minutes) puis dans du PBS seul (1 x 5 minutes) et incubées avec du DAPI (Calbiochem; 268298; 1:20 000) pendant 10 minutes à température ambiante. A la fin de cette incubation, les lames ont été lavées avec du PBS (3 x 5 minutes). Les lames ont ensuite été montées avec du Fluoromount-G (Southern Biotech) puis lutées avec du vernis à ongle transparent.

Pour le marquage de l'isolectine B4, suite aux 3 rinçages après l'incubation avec le DAPI, les lames ont été incubées avec une Isolectine B4 de *Bandeiraea simplicifolia*

(*Griffonia simplicifolia*) couplé à du FITC (Sigma, L2895, 1:100) pendant 90 minutes à température ambiante.

Pour le marquage réalisé avec l'anticorps anti-AQP4, seul un Ac I réalisé chez la souris était disponible, il a donc été nécessaire de bloquer les anticorps de souris naturellement présents sur la coupe, préalablement à l'incubation avec l'Ac I Un kit de blocage Klear Mouse HRP® a été utilisé selon les recommandations du fournisseur (GBI Labs ; D52-6). Les lames ont été recouvertes par 3 gouttes de réactif 1 MS Blocking A (250 µL par lame environ) pendant 30 minutes puis rincées 3 x 2 minutes avec du PBS. Elles ont ensuite été recouvertes par 3 gouttes de réactif 2 MS Blocking B (250 µL par lame environ) pendant 5 minutes puis rincées 3 x 2 minutes avec du PBS.

A chaque manipulation, un témoin négatif a été réalisé sur une lame identique à l'une de celle déjà utilisée dans la manipulation. Les lames « témoin négatif » ont suivi le même protocole que les autres lames à l'exception de l'incubation avec les Ac I, pendant laquelle elles ont été incubées avec le mélange PBS-gélatine (0,2%)-triton X-100 (0,25%) seul.

4.4. Analyse et quantification des images

Les coupes marquées ont été étudiées avec un microscope confocal SP8 (Leica Microsystems, Nanterre, Nanterre) sur la plateforme d'Imagerie Cellulaire et Moléculaire (UMS 3612 CNRS – US25 Inserm) de la Faculté de Pharmacie de Paris.

Pour la quantification des marquages de TSPO et Iba1, les cerveaux de 4 souris TO et 11 souris TC à J14 ont été photographiés en mosaïque pour obtenir une image de l'ensemble de la moitié inférieure du cerveau (Figure 18), sur une coupe à environ – 2 mm du bregma (d'après l'atlas de Paxinos et Watson, 2001), afin d'avoir les deux amygdales sur la même image. Deux ROI de 0,5 x 0,5 mm, correspondant aux amygdales droite et gauche (Figure 18), ont ensuite été définis avec Leica Application Suite (v3.3.0.0.16799, Leica Microsystems, Nanterre, France). La surface d'expression de TSPO (mm²) et le nombre de cellules Iba1^{+} ont été quantifiés dans les deux ROI après application d'un filtre médian (rayon : 5, itération : 1) et d'un seuil pour supprimer le bruit de fond.

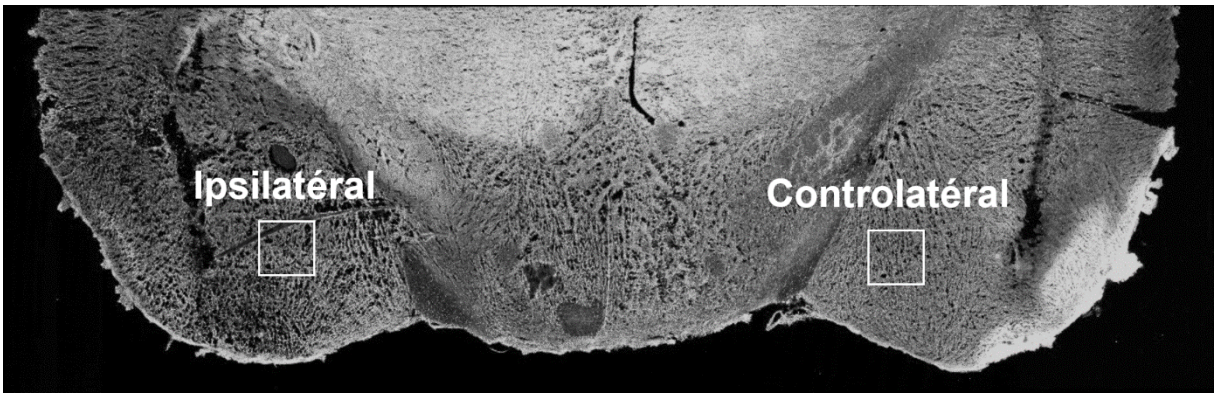


Figure 18 : Régions de quantification des marquages de TSPO et d'Iba1

4.5. Anticorps utilisés

Les Ac I et secondaires utilisés dans les différents marquages d'IHC sont listés dans le Tableau 7.

	Anticorps primaire					Anticorps secondaire				
	Cible	**Espèce hôte**	**Dilution**	**Fournisseur**	**Référence**	**Espèce hôte**	**Fluorochrome**	**Dilution**	**Fournisseur**	**Référence**
	Immunohistochimie									
Etude de l'expression microgliale de TSPO	Iba1	Chèvre	1:500	Abcam	ab5076	Âne	Cy3	1:1 000	Jackson ImmunoResearch	705-165-147
	TSPO	Lapin	1:500	Abcam	ab109497	Âne	AF488	1:1 000	Molecular Probes	A21206
Vérification de l'expression de TSPO avec un second clone d'Ac	Iba1	Chèvre	1:500	Abcam	ab5076	Âne	Cy3	1:1 000	Jackson ImmunoResearch	705-165-147
	TSPO	Lapin	1:150	Invitrogen	SA90-03	Âne	AF488	1:1 000	Molecular Probes	A21206
Etude de la localisation vasculaire de TSPO	TSPO	Lapin	1:500	Abcam	ab109497	Âne	Cy3	1:400	Jackson ImmunoResearch	711-165-152
	Collagène IV	Chèvre	1:200	Southern Biotech	1340-1	Âne	Cy5	1:400	Jackson ImmunoResearch	705-175-147
	IB4	*Bandeiraea simplicifolia*	1:100	Abcam	ab9512		FITC			
	AQP4	Souris	1:100	Abcam	ab9512	Âne	AF647	1:400	Jackson ImmunoResearch	715-605-140
Etude de la phagocytose des débris de myéline par les microglies	dMBP	Lapin	1:500	Abcam	ab5864	Âne	AF488	1:1 000	Molecular Probes	A21206
	Iba1	Chèvre	1:500	Abcam	ab5076	Âne	Cy3	1:1 000	Jackson ImmunoResearch	705-165-147
	CD68	Rat	1:200	Abcam	ab53444	Âne	Cy5	1:800	Jackson ImmunoResearch	712-175-150
	Immunocytochimie									
Etude de l'expression de TSPO sur une lignée de cellules endothéliales cérébrales	TSPO	Lapin	1:200	Abcam	ab109497	Âne	AF488	1:1 000	Molecular Probes	A21206
	ICAM-1	Chèvre	1:20	R&D Systems	AF796	Âne	Cy3	1:1 000	Jackson ImmunoResearch	705-165-147
Etude de l'expression de TSPO sur une culture primaire de microglie	TSPO	Lapin	1:200	Abcam	ab109497	Âne	AF488	1:1 000	Molecular Probes	A21206
	Arginase 1 (M-20)	Chèvre	1:200	Santa Cruz Biotechnology	Sc-18355	Âne	Cy3	1:1 000	Jackson ImmunoResearch	705-165-147

Tableau 7 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les études immunohisto- et cytochimiques.

5. Immunocytochimie

L'imunocytochimie est une technique d'immunomarquage semblable à l'IHC décrite au paragraphe §3., la différence se faisant sur le substrat du marquage, qui n'est pas un tissu mais une culture cellulaire placée au fonds de puits de plaque de culture. L'immunocytochimie permet donc d'évaluer l'expression d'une protéine par un type cellulaire bien défini, dans différentes conditions de culture.

5.1. Cultures de lignées de cellules endothéliales cérébrales murines (Bend3)

La culture des cellules endothéliales cérébrales de souris a été réalisée au laboratoire par le Dr Khacef. Des lignées cellulaires endothéliales de cerveau de souris bEnd.3 (ATCC® CRL-2299™, Manassas, Virginie, États-Unis) ont été mises en culture dans un tampon (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM) supplémenté à 2 mM de L-glutamine, 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1mM de pyruvate de sodium, 1% d'acides aminés non essentiels, 50 U/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine dans un incubateur humidifié à 37°C et 5% de CO_2. Les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre préalablement traitées à la poly-D-lysine dans des plaques à 24 puits à une densité de 200 000 cellules/mL. Certains puits de cellules ont été traitées avec du LPS (5 µg/mL) ou du TNF-α (20 ng/mL) pendant 24 heures, afin de les placer dans un contexte inflammatoire. Les autres cellules ont été utilisées comme contrôle. Après 24 heures, les cellules ont été lavées dans 500 µL de PBS puis fixées avec 400 µL de PFA à 4% pendant 12 minutes à température ambiante, puis rincées 3 x 5 minutes avec 500 µL de PBS.

5.2. Cultures primaires de cellules microgliales

Le protocole de culture primaire de cellules microgliales a été mis au point au laboratoire par les Drs Lerouet et Mamma sur la base des travaux préliminaires du Dr Leconte et de protocoles de la littérature (Ni et Aschner, 2010; Chhor et al., 2013, Yang et al., 2014). Le Dr Mamma a réalisé les cultures primaires de microglies ayant servi aux marquages immunocytochimiques de mes travaux de thèse.

Les cultures primaires de cellules microgliales ont été obtenues à partir de culture mixte de cellules gliales préparée à partir de cortex de souriceaux Swiss nouveaux-nés (jour post-natal P0 à P3 ; Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France). Après dissection, les cortex ont été mis en culture dans un milieu DMEM High Glucose (DMEM HG 4,5 g/L,

Sigma-Aldrich, D5796, St Quentin Fallavier, France) supplémenté avec 10% de SVF (le SVF est préalablement décomplémenté par incubation dans un bain-marie à 56°C pendant 45 minutes, puis filtré), 2 mM de glutamine (Sigma-Aldrich, G3126) et 0,01% (V/V) d'un mélange de streptomycine à 10 mg/mL et pénicilline à 10 000 U/mL (Sigma-Aldrich, P4333). Après dissociation mécanique, les cortex sont ensemencés, à raison de 2 à 3 cortex/15 mL de milieu de culture 10/1, dans un incubateur (SANYO, Panasonic group, MCO-19AIC, Bonneuil sur Marne, France) à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO_2.

Après 14 jours de culture, les microglies ont été isolées par agitation orbitale, dans un incubateur-agitateur (INFORS HT, Massy, France), à 140 rpm (rotations par minute) pendant 30 minutes à 37°C. Le surnageant contenant la microglie a ensuite été récupéré, centrifugé (1 200 g, 10 minutes, 4°C) puis ensemencé dans des puits préalablement traités à la poly-D-lysine, à raison de 400 000 cellules/mL. Après 24 heures à 37°C sous 5% de CO_2, le milieu de culture 10/1 était remplacé par du milieu DMEM HG supplémenté avec 2mM de glutamine et 0,01% (V/V) du volume de mélange streptomycine/pénicilline. A ce moment, certaines cellules ont été incubées simultanément pendant 24 heures avec du LPS (*E. coli* 0127:B8, Sigma-Aldrich, L3129) à la concentration de 100 ng/mL afin de les placer dans un environnement pro-inflammatoire. Les autres cellules, traitées normalement, ont servi de contrôle. Vingt-quatre heures après ce changement de milieu, soit 2 jours après l'ensemencement, les cellules ont été lavées dans 500 µL de PBS puis fixées avec 400 µL de PFA à 4% pendant 15 minutes à température ambiante, puis rincées 3 x 5 minutes avec 500 µL de PBS.

5.3. Protocole de marquage

Le protocole de marquage d'immunocytochimie a été identique au protocole de marquage utilisé pour l'IHC et décrit au §4.3, à l'exception de la fixation à l'acétone qui n'est pas nécessaire pour l'immunocytochimie.

5.4. Anticorps utilisés

Les différents anticorps utilisés avec les cultures cellulaires sont regroupés et détaillés dans le Tableau 7 du §4.5.

6. Cytométrie en flux

6.1. Principe

La CF est une technique d'analyse permettant de caractériser les cellules en suspension dans un liquide, en les faisant passer individuellement devant le faisceau d'un laser. Les signaux émis, lorsque les cellules coupent le laser, permettent d'obtenir des informations relatives à leurs propriétés physiques telles que leur dimension et leur granulosité, ainsi que des informations liées aux marquages d'immunofluorescence spécifiques de protéines. La CF permet ainsi une analyse quantitative et qualitative des cellules issues d'une culture ou d'un tissu (cf. §6. du chapitre 3 des rappels bibliographiques).

6.2. Protocole

Pour les analyses en CF, les hémisphères des cerveaux de souris ont été séparés et chaque hémisphère a été analysé séparément, constituant un échantillon.

6.2.1. Titration

Afin de procéder à la titration des anticorps et définir leur dilution optimale pour les analyses, 4 échantillons ont été préparés séparément, à partir de souris non opérées, puis regroupés pour être incubés avec une gamme de chaque anticorps dilué au 1/2, 1/5e et 1/10e selon les recommandations du fabricant. La concentration retenue était celle la plus faible pour laquelle le signal était suffisamment intense pour pouvoir discriminer les différentes populations cellulaires.

6.2.2. Passage des échantillons

L'objectif de la manipulation a été d'évaluer l'expression de TSPO par les microglies et les autres types cellulaires, à l'état physiologique ainsi que dans un contexte de TC. Que l'inflammation proviennent de la chirurgie, ou du TC lui-même, ne nous important pas, l'analyse de souris TO n'a donc pas été réalisée.

6.3. Préparation des échantillons

Le protocole de dissociation tissulaire et d'immunomarquage est synthétisé dans la Figure 19.

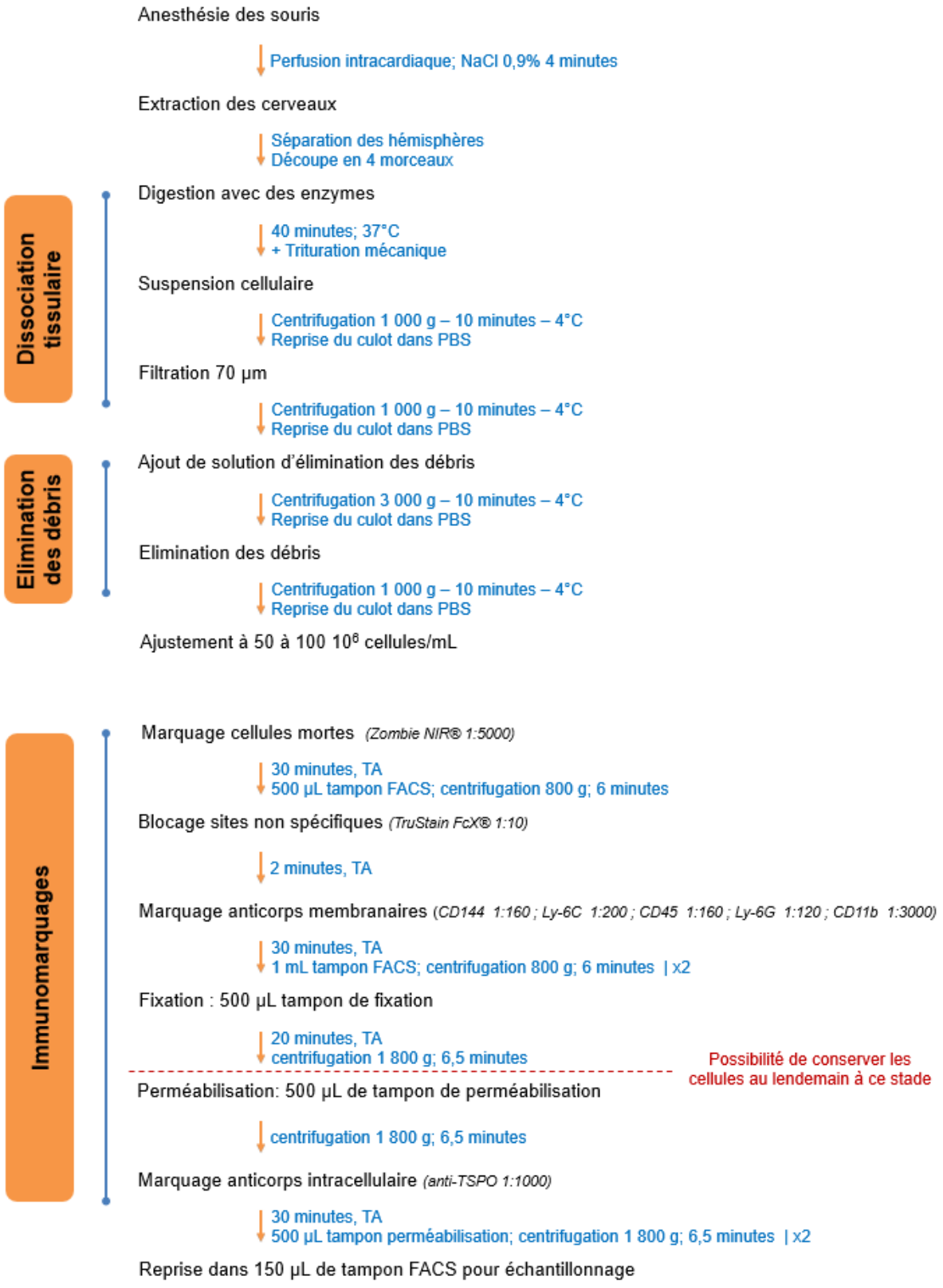


Figure 19 : Protocoles de dissociation tissulaire et d'immunomarquage.
Abréviation : TA : température ambiante.

Euthanasie des souris

Les souris anesthésiées ont été perfusées par voie intracardiaque par du NaCl 0,9% à une pression constante de 100 mmHg pendant 4 minutes. Les cerveaux ont ensuite été prélevés et les hémisphères séparés l'un de l'autre. Chaque hémisphère a été découpé en 4 morceaux et placé dans une solution de tampon HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution ; Gibco ; 14185-052) sur de la glace, le temps que tous les cerveaux soient prélevés.

Digestion enzymatique

Les échantillons ont été transférés dans des tubes contenant 1 980 µL du mélange de digestion enzymatique préparé à l'aide des solutions d'un kit commercial (Adult Brain Dissociation Kit, Miltenyi Biotec, Allemagne) conformément aux instructions du fabricant. La dissociation tissulaire a été réalisée à 37°C dans un bain-marie pendant 40 minutes avec trituration mécanique manuelle à l'aide de pipettes P5000 puis P1000 (10 allers-retours toutes les 5 minutes). Les échantillons ont été centrifugés (1 000 g, 10 minutes, 4°C), le culot repris dans du PBS (Gibco ; 70011-036) puis la suspension passée au filtre de 70 µm (MACS SmartStrainers ; Miltenyi Biotec ; 130-110-916) afin de retirer les morceaux de tissus non dissociés.

Elimination des débris tissulaires

L'échantillon a été centrifugé (1 000 g, 10 minutes, 4°C) et le culot repris dans une solution de PBS à 4°C et de solution d'élimination de débris tissulaire contenue dans le « Adult Brain Dissociation Kit » (Miltenyi Biotec ; Allemagne). Quatre millilitres de PBS à 4°C ont été délicatement ajoutés à la surface puis l'échantillon centrifugé (3 000 g, 10 minutes, 40°C), ce qui entraine la formation de 3 phases. Seule la phase inférieure, contenant la suspension cellulaire, a été conservée, reprise dans du PBS à 4°C et centrifugée (1 000 g, 10 minutes, 4°C).

Ajustement de la concentration cellulaire

Après avoir repris le culot dans 1 mL de PBS à 4°C, les cellules ont été comptées à l'aide d'une cellule de Malassez et du PBS a été ajouté de manière à ajuster la concentration à 50 à 100 millions de cellules par mL (soit 10 à 20 millions de cellules gliales par mL).

6.4. Immunomarquages

Contrôles

A chaque expérience, une suspension cellulaire a été préparée en mélangeant à parts égales une partie des échantillons des souris NO. Cette suspension a servi à réaliser une série de marquages qui sert de contrôle lors de l'analyse des données. Ces échantillons ont donc suivi le même traitement que les autres échantillons, mais ont été incubés avec soit :

- aucun anticorps, afin d'avoir un témoin négatif,
- un seul des anticorps, afin d'évaluer les marquages non spécifiques de l'anticorps et de s'en affranchir,
- tous les anticorps sauf un (Fluorescence minus one ; FMO), afin d'identifier les effets du chevauchement spectral et d'affiner le positionnement des fenêtres et la discrimination. Ces FMO n'ont été effectués que lors du changement de la dilution d'un des anticorps.

Marquage des cellules vivantes

Pour chaque échantillon, 100 µL de suspension cellulaire ont été utilisés (soit 5 à 10 millions de cellules) pour procéder au marquage. Les échantillons ont d'abord été incubés avec 10 µL de Zombie NIR® (Biolegend ; 423105 ; 1:500 dans PBS), marqueur permettant le marquage des cellules mortes, (30 minutes ; température ambiante), puis rincées avec 500 µL de tampon FACS composé de PBS, de sérum albumine bovine (BSA ; Miltenyi Biotec ; 130-091-376) à 2% et d'éthylène diamine tétraacétique (EDTA ; Sigma ; ED4SS) à 5mM, et centrifugés (800 g ; 6 minutes). Les échantillons de contrôle, sans marquage de Zombie NIR®, ont été incubés avec 10 µL de PBS seul.

Blocage des sites non spécifiques

Une incubation avec 90 µL de TruStain FcX® (Biolegend ; 101320 ; 1:10 dans tampon FACS ; 2 minutes ; température ambiante) a permis ensuite de bloquer les sites de fixation non spécifiques.

Incubation des anticorps

Les échantillons ont ensuite été incubés avec 10 µL de solution contenant les anticorps (30 minutes ; température ambiante) dilués dans du tampon FACS, dont les concentrations et références sont précisées dans le Tableau 8. Dans les échantillons

contrôle, les anticorps absents ont été remplacés par le même volume de tampon FACS. Les échantillons ont ensuite été rincés avec 1 mL de tampon FACS puis centrifugés (800 g ; 5 minutes), deux fois.

Fixation et perméabilisation

Afin de procéder au marquage intracellulaire, il a été nécessaire de perméabiliser les membranes cellulaires et donc, au préalable, de fixer les marquages des anticorps précédents, qu'une perméabilisation risquait de défixer. Les échantillons ont ainsi été incubés avec 500 µL de tampon de fixation (Biolegend ; 420801 ; 20 minutes ; température ambiante), centrifugés (1 800 g ; 6,5 minutes), repris dans 500 µL de tampon de perméabilisation (Biolegend ; 421002) et à nouveau centrifugés (1 800 g ; 6,5 minutes).

Incubation de l'anticorps intracellulaire

Les échantillons ont alors été incubés avec 100 µL de solution d'anticorps anti-TSPO (Abcam, ab199836 ; 1:1 000) dilué dans le tampon de perméabilisation (30 minutes ; température ambiante). Les échantillons contrôles sans anticorps anti-TSPO ont été incubés avec 100 µL de tampon de perméabilisation seul. Enfin, les échantillons ont été rincés avec 500 µL de tampon de perméabilisation, centrifugés (1 800 g, 6,5 minutes) puis repris dans 150 µL de tampon FACS pour le passage au cytomètre.

					Expression de la cible par les cellules (Buttgereit et al., 2016)				
Cible	**Fluorochrome**	**Fournisseur**	**Référence**	**Dilution**	Cellule endothéliale	Microglie	Macrophage	Lymphocyte	Monocyte
Amines intracellulaires (Zombie NIR®)	APC/Cy7	Biolegend	423105	1:5 000	Cellules mortes				
CD144	BV 421	Biolegend	129605	1:160	+	-	-	-	-
Ly-6C	BV 605	Biolegend	128036	1:200	-	+	++		+++
CD45	BV 785	Biolegend	103149	1:160	-	+	++	++	++
Ly-6G	PE/Cy7	Biolegend	127617	1:120	-	-	-	-	-
CD11b	PE/Dazzle 594	Biolegend	101255	1:3 000	-	+	+	-	+
TSPO	AF647	Abcam	ab199836	1:1 000	?	?	?	?	?

Tableau 8 : Références et dilutions des anticorps, et de leurs cibles, utilisés pour la cytométrie en flux.

6.5. Acquisition des données

6.5.1. Passage des échantillons

Les analyses ont été effectuées en étroite collaboration avec le Dr Coralie Guérin sur un cytomètre à 4 lasers BD LSRFortessa (BD Biosciences) au sein de la plateforme d'Analyse Cellulaire Multidimensionnelle (UMS3612 CNRS – US25 Inserm) de la Faculté de Pharmacie de Paris.

Les échantillons ont été analysés à la vitesse d'environ 12 µL par minute.

6.5.2. Analyse des données

Les données ont été enregistrées avec le logiciel BD FACSDiva (Becton Dickinson) et analysées par le logiciel FlowJo® version 10.5.3 (Tree Star, Inc.).

6.5.2.1. Définition des populations cibles

Sélection des cellules

Les particules, qui ne sont pas des cellules, ont tout d'abord été rejetées sur les critères de granularité (Side Scatter ; SSC) et de taille (Forward Scatter ; FSC) (Figure 20A).

Sélection des cellules vivantes

Les cellules mortes ont été fixées par le Zombie NIR® et ont ainsi émis une fluorescence *via* son fluorochrome. Les cellules ayant une intensité de fluorescence > 10^3 ont été ainsi rejetées (Figure 20A).

Exclusion des doublons

Lorsque plusieurs cellules passent simultanément devant le laser, elles sont comptées comme une cellule unique mais cumulent les émissions des deux cellules. Ces doublons doivent ainsi être écartés de l'analyse pour ne pas la biaiser. Ils peuvent être identifiés par le fait qu'ils auront une aire sous courbe d'intensité de lumière diffractée multipliée par 2 (ou plus), mais une hauteur du pic d'intensité de lumière diffractée identique. Nous les avons donc écartés en éliminant les éléments ayant des ratios $\frac{\text{Aire FSC}}{\text{Hauteur FSC}} > 1$ et $\frac{\text{Aire SSC}}{\text{Hauteur SSC}} > 1$ (Figure 20A).

Sélection des différentes populations cellulaires

Les différentes cellules ont pu être identifiées grâce à leur profil d'expression de protéines spécifiques. Chaque cellule peut être identifiée selon qu'elle exprime une protéine ($^{+}$), de manière forte (^{hi}), intermédiaire (^{int}) ou faible (^{lo}), ou bien qu'elle ne l'exprime pas ($^{-}$) (Tableau 8) :

- Monocytes : Ly-6G^{hi}/Ly-6C^{+} ;
- Polynucléaires neutrophiles : Ly-6G^{int}/Ly-6C^{+} ;
- Lymphocytes : CD11b^{-}/CD45^{hi} ;
- Macrophages : CD11b^{+}/CD45^{hi} ;
- Microglies : CD11b^{+}/CD45^{int} ;
- Cellules endothéliales : CD144^{+}.

Elles ont ainsi pu être sélectionnées et dénombrées en traçant des fenêtres correspondant à chaque profil d'expression (Figure 20B).

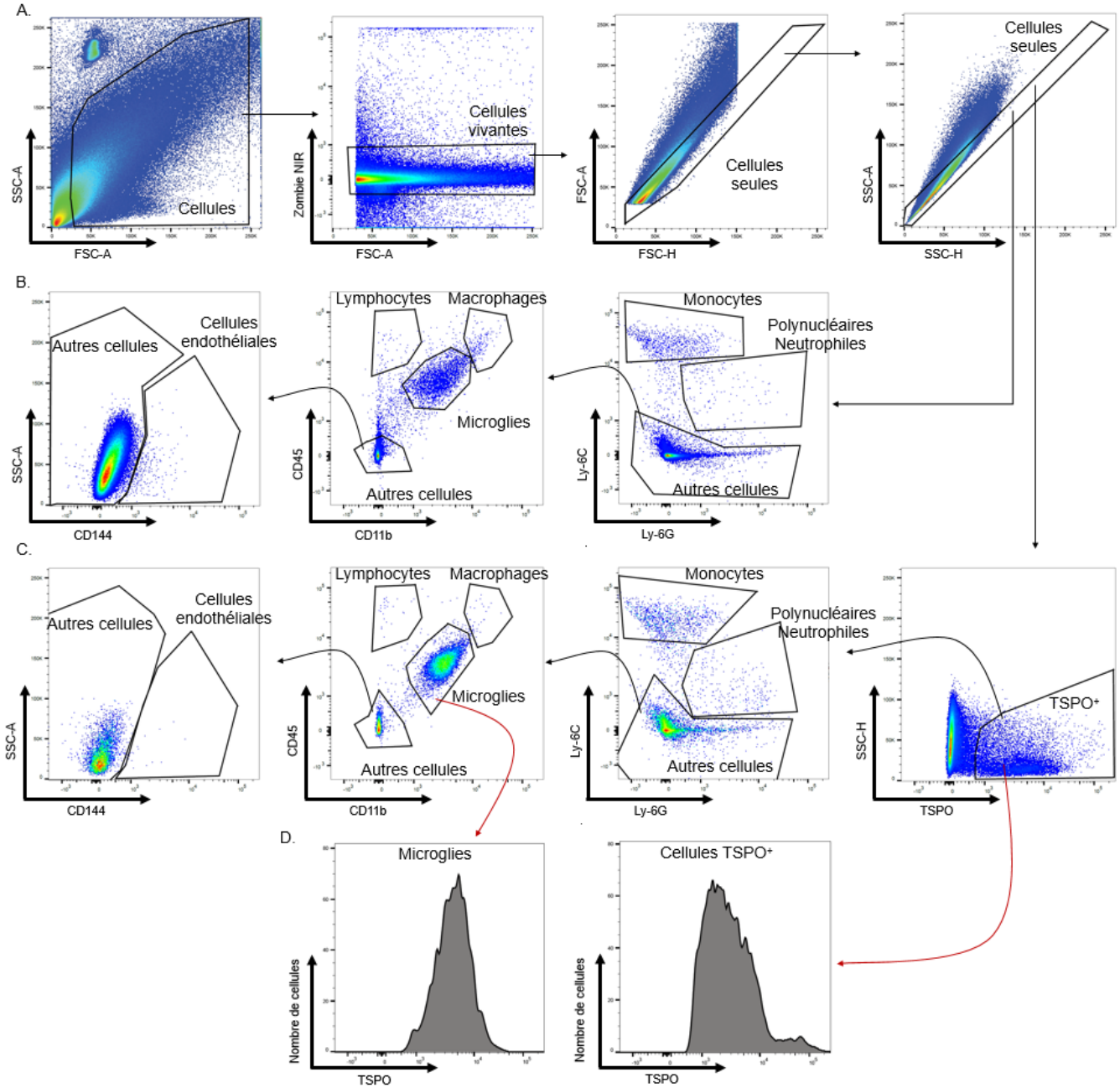


Figure 20 : Stratégie de sélection des différentes populations cellulaires en CF. A. Sélection des cellules sur les critères de granularité (SSC) et de taille (FSC), puis sélection des cellules vivantes non fixées au Zombie NIR et exclusion des doublons sur la base de la granularité et de la taille. B. Sélection des différentes populations cellulaires en fonction de leur expression de Ly-6C, Ly-6G, CD11b, CD45 et CD144. **C**. Sélection des différentes populations cellulaires TSPO$^+$. **D.** Mesure de l'expression relative de TSPO dans les différents types cellulaires.

6.5.2.2. Quantifications

Proportion de cellules immunitaires

La proportion de chaque population de cellule immunitaire a été calculée en faisant le rapport du nombre de cellules de chaque population cellulaire sur le total du nombre de cellules de toutes les populations cellulaires immunitaires identifiées grâce aux marqueurs énumérés au paragraphe §6.5.2.1 (monocytes, PNN, lymphocytes, macrophages, microglies).

Répartition des cellules exprimant TSPO

Après sélection des cellules $TSPO^+$, les mêmes fenêtres que celles décrites au paragraphe §6.5.2.1 ont été définies (Figure 20C). La proportion de cellules exprimant TSPO a été établie en faisant le rapport du nombre de cellule de chaque type cellulaire $TSPO^+$ sur le nombre total de cellules $TSPO^+$.

Expression relative de TSPO

Après sélection des cellules $TSPO^+$, la moyenne géométrique de l'intensité d'expression de TSPO par chaque type cellulaire a été calculée, ainsi que la moyenne géométrique d'expression de TSPO pour la totalité des cellules $TSPO^+$ (Figure 20D).

7. Données et analyses statistiques

Les données sont exprimées en valeur moyenne ± ESM (écart standard à la moyenne).

L'analyse statistique ainsi que les représentations graphiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPadPrism® (GraphPad software, Etats-Unis). Chaque analyse statistique est décrite dans la légende de chaque figure de résultats. Une différence a été considérée significative pour une valeur de $p < 0,05$.

RESULTATS

1. Prise en main du modèle de TC chez la souris

Le modèle expérimental d'ICC utilisé au sein du laboratoire a fait ses preuves pour induire un TC, une neuro-inflammation d'origine microgliale et des LSB (Taib et al., 2017). Afin de pouvoir interpréter les expérimentations à venir dans la continuité des résultats déjà obtenus par l'équipe de recherche, il était nécessaire d'obtenir l'assurance (1) de la bonne prise en main du modèle et (2) des conséquences qu'il provoque. Cela passait par l'évaluation de l'œdème et des troubles neurologiques post-traumatiques.

1.1. Evaluation de l'œdème cérébral

Le contenu cérébral en eau a été évalué à 24 (J1) et 48 heures (J2) après le TC afin d'évaluer si le TC entraîne bien un œdème cérébral, comme cela a précédemment été décrit au laboratoire par le Dr Taib (Taib et al., 2017).

Le contenu en eau dans le cortex ipsilatéral est augmenté chez les souris TC à J1 ($p<0,01$ *versus* souris témoins opérées) et J2 ($p<0,05$ *versus* souris témoins opérées). Il n'est pas observé de variation chez les souris témoins opérées comparativement aux souris non opérées, ceci quel que soit le temps étudié (Figure 21). Ce résultat met en évidence la présence d'un œdème cérébral dû au TC, et non à la chirurgie préalable.

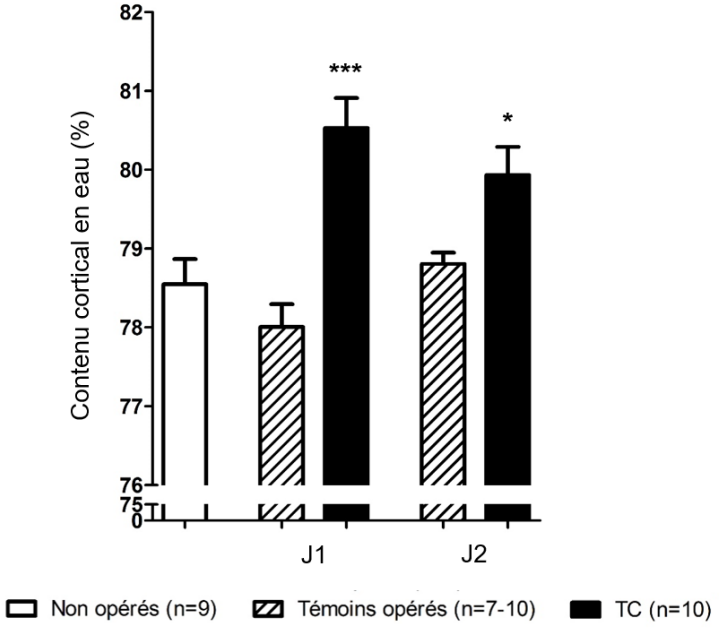


Figure 21 : Etude de l'œdème cérébral dans le cortex ipsilatéral à J1 et J2 après le TC.

Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne ± ESM et ont été analysés à l'aide d'une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett. *p < 0,05 et ***p<0,001 *versus* non opérés.

En revanche, au niveau du cortex contralatéral, aucune modification du contenu cérébral en eau n'est observée aux deux temps étudiés quel que soit le groupe, ce qui témoigne de l'absence d'œdème cérébral à distance de l'impact (Figure 22).

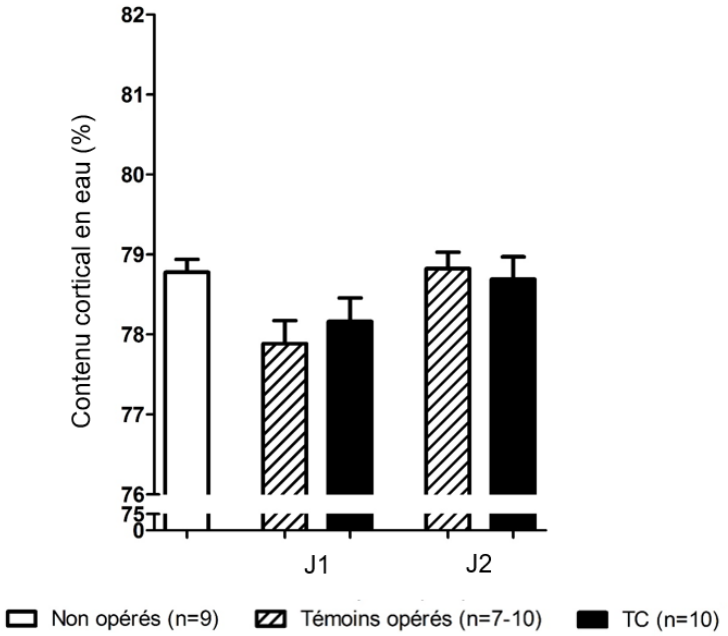


Figure 22 : Etude de l'œdème cérébral dans le cortex controlatéral à J1 et J2 après le TC.

Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne ± ESM et ont été analysés à l'aide d'une ANOVA à un facteur.

1.2. Mesure du score neurologique

Le score neurologique a été évalué à 2 jours (J2) et 7 jours (J7) après le TC afin d'évaluer si le TC entraîne un léger déficit neurologique à J2 qui disparait à J7, comme cela a précédemment été décrit au laboratoire par le Dr Taib (Taib et al., 2017).

Le score neurologique des souris ne varie pas de manière significative entre les différents groupes de souris, que ce soit à J2 ou à J7 (Figure 23), il n'y a donc pas de déficit neurologique chez les souris TC. Ni l'impact cortical, ni la chirurgie ne semblent donc altérer le score neurologique des souris à court terme, ce qui confirme que l'impact est de sévérité « légère ».

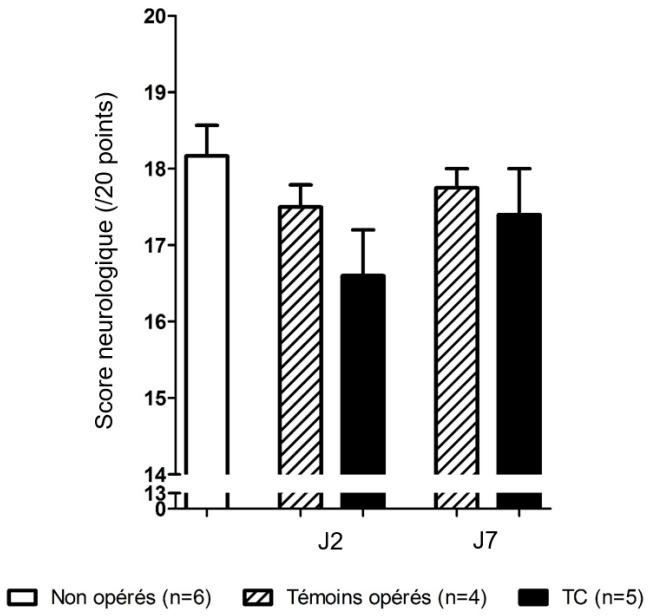


Figure 23 : Etude du score neurologique à J2 et J7 après un TC.
Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne ± ESM et ont été analysés à l'aide d'un test de Kruskall-Wallis.

1.3. Bilan sur la prise en main du modèle

Les résultats de mes premières études permettent ainsi de montrer (1) que les effets induits chez les souris TC sont uniquement dus à l'impact et non à la craniotomie, et (2) que les paramètres d'impact de ce modèle permettent de reproduire un TC de sévérité légère. Mes résultats concordent avec ceux du précédent doctorant Toufik Taib (Taib et al., 2017) et prouve que j'ai bien pris en main ce modèle. Les résultats des études

qui découleront pour la suite pourront donc être interprétés en associant les résultats des précédentes études du laboratoire.

2. Etude de l'expression de TSPO

Nous avons ensuite évalué de l'expression de TSPO dans notre modèle expérimental de TC. Nous avons pour cela tout d'abord procédé à une analyse d'imagerie en TEP avec un radioligand de TSPO, le [^{18}F]FEPPA. Nous avons ensuite réalisé des études immunohistochimiques et immunocytochimiques puis des analyses par cytométrie en flux.

Ces travaux font l'objet d'un article en préparation pour *Journal of Neurotrauma*.

THE 18-KDA TRANSLOCATOR PROTEIN IN TRAUMATIC BRAIN INJURY: FROM POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY TO CELL ANALYSIS.

AUTHORS

Clément DELAGE[1,2], Nicolas VIGNAL[2,3], Coralie GUERIN[4,5], Toufik TAIB[1], Clément BARBOTEAU[2], Célia MAMMA[1], Kahina KHACEF[1], Isabelle MARGAILL[1,4], Laure SARDA-MANTEL[3,7], Nathalie RIZZO-PADOIN[2,3], Fortune HONTONNOU[6], Catherine MARCHAND-LEROUX[1,2], Dominique LEROUET[1,2], Benoit HOSTEN[2,3], Valérie BESSON[1,2]

[1] *Université Paris Descartes, EA4475 - Pharmacologie de la circulation cérébrale, Faculté de Pharmacie de Paris, Paris, France*

[2] *Université Paris Descartes, Inserm UMR-S 1144, Faculté de Pharmacie de Paris, Paris, France*

[3] *Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Unité Claude Kellershohn, hôpital Saint-Louis, Paris, France*

[4] *Université Paris Descartes, Inserm UMR-S 1140, Faculté de Pharmacie de Paris, Paris, France*

[5] *Université Paris Descartes, Inserm UMS 3612 CNRS – US25 Inserm –Faculté de Pharmacie de Paris, Paris, France*

[6] *Université Paris Diderot, Inserm UMR-S 942, hôpital Lariboisière, Paris, France*

[7] *Université Paris Diderot, Institut Saint-Louis, Paris, France*

RUNNING TITLE

PET and cellular analysis of TSPO in TBI

ABSTRACT:

Introduction: TBI is associated with neuroinflammation originating from microglial activation. 18 - kDa translocator protein (TSPO) is widely used as a reference marker for microglial activation in different pathological context. However, the use of TSPO to specifically monitor the microglial activation remains a point of contention in the literature.

Material and methods: TSPO expression was evaluated in brain of male Swiss mice following a traumatic brain injury (TBI) induced by a controlled cortical impact. Positron emission tomography (PET) imaging analysis with [^{18}F]FEPPA, a TSPO radiotracer, was performed at 1, 3, 7 and 14 days after TBI. Immunostaining on brain slices of TBI mice, on microglia and endothelial cell culture was performed. Flow cytometry analysis was performed on brain samples from TBI mice.

Results: PET analysis showed a significant increase of TSPO in the amygdala at 14 days after a TBI ($p=0.04$). This increase was not observed in immunohistochemistry, which revealed a vascular-like staining of TSPO. Immunocytochemistry confirmed endothelial expression of TSPO. Moreover, flow cytometry analysis showed that microglia represents 58.3% of TSPO^{+} cells in the CNS and that its expression is globally increased 3 days after a TBI, especially in microglia, macrophages, lymphocytes and neutrophils.

Conclusion: Flow cytometry results point the lack of specificity of TSPO for microglia and suggests that microglia contributes to the overall increase in TSPO in the CNS after TBI, but is not its only contributor. Our work raises the question of its use as a target for PET imaging for specific marker of microglial activation. Due to its resolution, PET analysis using TSPO radioligand do not seem appropriate to monitor the microglial activation in mice brain after TBI.

Key words : translocator protein ; traumatic brain injury ; positon emission tomography; microglia ; flow cytometry

INTRODUCTION

Traumatic brain injury (TBI) is a growing public health concern for high-income countries, as a leading cause of mortality and disability in the under 40.[1] TBI is estimated to cause 282 000 hospitalizations and 56 000 deaths in the USA each year,[2] and to cost between 60.4 and 221 billion dollars for one year only in the USA.[1] Moreover, TBI is responsible for important sequelae to surviving patients. Indeed, several studies linked TBI to neuropsychological and cognitive diseases.[3] These last years, neuroinflammation (NI) consecutive to the TBI is increasingly recognized as the source of these long-term neurological disorders.

NI is both a short and long term consequence of TBI, whether it is mild, moderate or severe, in human or in animals model.[4–6] NI has been shown to last for decades after the injury[7] and many studies linked its chronicity to white matter injuries and neurodegenerative diseases.[8,9] Microglia, as the main immune cell in the central nervous system (CNS), appears to be key cellular mediators of NI, both as promoting and repressing it, through its 2 activation phenotypes : the classical one (also called M1) leading to pro-inflammatory and detrimental effects[10–12] and the alternative one (also called M2) triggering anti-inflammatory, immunomodulatory and protective effects.[13–15]

There is currently no treatment for post-TBI long-term disorders. Pharmacological strategies targeting modulatory or regulatory processes of NI could prevent development and progression of long-term disorders and may appears promising therapeutic strategies. These last years, microglial activation and its modulation has become a favorite target in the field of NI research. NI monitoring and evaluation of the effects of microglia-targeted strategies need noninvasive technic using specific marker, ideally by *in vivo* imaging. The latter allows a longitudinal monitoring and is transposable bench to bedside and conversely.

These last decades, the use of positron emission tomography (PET) for imaging microglial activation appears as a promising noninvasive method to monitor NI. Among the possible targets

for microglia, the 18-kDa translocator protein (TSPO) is the most studied in PET.[16] TSPO is a five transmembrane domain protein located in the outer mitochondrial membrane,[17] discovered in 1977[18] and previously named as "peripheral benzodiazepine receptor". TSPO is involved in multiple physiological functions such as steroid biosynthesis, membrane biogenesis, heme biosynthesis, cellular proliferation and differentiation, apoptosis.[19] Although it is widely and ubiquitously expressed, its expression in the CNS has been described as mostly restricted to glial cells.[20–25] Its increased expression during NI, and its colocalization with markers of activated microglia, put it as a reference marker of microglial activation.[26–29] In humans, the increase of TSPO expression has been observed with TEP in stroke, Alzheimer's and Parkinson's diseases, amyotrophic lateral and multiple sclerosis, herpetic and HIV encephalopathy.[30] Some studies revealed a long-term increase of TSPO expression, from several months to years after TBI.[27,28,31,32]

The historical TSPO radiotracer used for preclinical studies was PK11195, a TSPO antagonist.[33,34] But these last years, a new generation of TSPO ligands was developed : [^{11}C]DAA1106, [^{18}F]FE- DAA1106, [^{11}C]DPA713, [^{18}F]DPA714, [^{18}F]FEPPA, [^{18}F]PBR28, [^{18}F]PBR111, [^{11}C]SSR18075, [^{11}C]CLINME, [^{123}I]CLINDE and [^{11}C]vincopectine.[35] These second generation radioligands demonstrate a better brain diffusion, a better affinity for TSPO and a lesser nonspecific binding.[36] [^{18}F]FEPPA is one of the newest TSPO PET radiotracer with greater affinity for its target[37] and one of the two TSPO radioligand being the most advanced in clinical development with [^{18}F]DPA714 for PET imaging of neuroinflammation. In addition, [^{18}F]FEPPA radiosynthesis method is easier than that of [^{18}F]DPA714, its metabolism is lower than that of [^{18}F]DPA714, which is more favorable for [^{18}F]FEPPA quantification in brain.[38]

In this study, the use of [^{18}F]FEPPA with PET was evaluated to monitor microglial activation at 1, 3, 7 and 14 days after TBI in mice, as we already evidenced microglial activation in this model.[39] Then, the specificity of TSPO for microglia was evaluated using immunohistochemistry on these brains after TBI. Finally, we investigated and quantified TSPO expression by microglia and other

CNS cells, especially infiltrating immune cells and endothelial cells, through immunohistochemistry on brain slices, immunocytochemistry on endothelial and microglial primary cell cultures, and flow cytometry in mice brain after TBI.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Swiss mice were supplied by Janvier labs (Le Genest St Isle, France), weighted 28 to 30 g. All care and experiments were in accordance with the ethical approvals stipulated by the Animal Ethics Committee of Paris Descartes University, the French regulations and the European Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EEC) on the protection of animals for experimental use (APAFIS#4765). Animals were housed under temperature (22 ± 2 °C) and light (12h per day) controlled conditions with access to food and water *ad libitum*.

Controlled cortical impact-induced brain injury

The Controlled Cortical Impact (CCI) model was performed as previously described.[39] Mice were anesthetized with isoflurane and placed in a stereotaxic frame. Body temperature was monitored throughout surgery by a rectal probe and maintained at 37.0±0.5°C with a homeothermic blanket control unit. A 4-mm craniotomy was performed onto the left temporo-parietal cortex centered between the bregma and lambda (**Figure 1 A**), taking care to leave the dura mater intact. Injury was delivered using a 3 mm diameter impactor by a pneumatically controlled device (TBI 0310 Impactor, Precision System Instruments) using the following parameters: diameter 3mm, velocity 3.5m/s, depth of cortical deformation 1.0mm and dwell time 50ms[40]. Following the injury, the skullcap was replaced by applying bone wax and the skin sutured. Sham-operated (SO) mice underwent the same surgery without impact. To recover from anesthesia and prevent post-surgery hypothermia, animals were placed in an incubator set at 30°C for one hour. Mice were subsequently returned to their home cage. Non-operated (NO) mice had neither surgery nor anesthesia.

PET

Radiochemical synthesis of [18F]FEPPA

Radiosynthesis of [^{18}F]FEPPA was performed at the Unité Claude Kellershohn, in Saint-Louis Hospital, Paris (France), as previously described.[38] Briefly, the radiosynthesis of [^{18}F]FEPPA was performed using an AllInOne® (Trasis, Ans, Belgium) synthesis module and a tosylated precursor for a one-step fluorine nucleophilic aliphatic substitution.

All reagents and solvents were purchased from commercial suppliers (ABX, Radeberg, Germany or Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) and were used without further purification. Sep-Pak QMA were purchased from ABX. [^{18}F]fluoride ion was produced *via* the [^{18}O(p,n)^{18}F] nuclear reaction (IBA Cyclone 18/9 cyclotron). Radioactivity of the final product was measured with a dose calibrator (PET DOSE 5 Ci, COMECER®, Castel Bolognese, Italy).

In Vivo PET/CT imaging

PET/CT imaging was performed using Inveon micro PET/CT scanner (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) designed for small laboratory animals. Mice were anesthetized (isoflurane/oxygen, 2.5% for induction at 0.8–1.5 L/min, and 1–1.5% at 0.4–0.8 L/min thereafter) during injection of [^{18}F]FEPPA (9.9 ± 1.5 MBq) in a volume of 0.15 mL (0.22 ± 0.19 nmol of FEPPA) through the tail vein, and during PET/CT acquisitions, as previously described.[38]

The spatial resolution of Inveon PET device was 1.4 mm full-width at half-maximum at the center of the field of view. Images were reconstructed using a 3D ordered subset expectation maximization method including corrections for scanner dead time, scatter radiations, and randoms.

Protocol

In accordance with metabolism studies,[38] the [^{18}F]FEPPA concentration decreases rapidly in the plasma, and get stabilized 90 minutes after the injection. At the opposite, brain concentration is barely stable through the time. The static study was then performed 90 minutes after injection and during 30 minutes.

PET/CT imaging was performed at 4 different times: 1, 3, 7 and 14 days after surgery or TBI. The study comprised 3 groups of mice. The first group of mice have had PET at D1 and D3, the second one at D3 and D7, and the third one at D7 and D14. For each one of these 6 acquisitions, 8 mice were imaged: 1 NO, 3 SO and 4 TBI (**Figure 2**).

The acquisition started 90 minutes after injection of [^{18}F]FEPPA, and lasted for 30 minutes. Between the end of the injection and the start of the acquisition, anesthesia was stopped.

Data analysis and modeling

PET/CT images were visually assessed. Then quantitative analysis of PET/CT images was performed by PMOD version 3.806 image analysis software (PMOD Technologies, Zurich, Switzerland). All values of radioactivity concentrations were normalized by the injected dose and the weight of the mouse, and expressed as percentage of the injected dose per g of tissue (% ID/g; **Figure 1 Ba)** for the visualization and expressed as standard uptake value (SUV) maximum (SUVmax) and mean (SUVmean) for the quantification.

PET images were automatically rigid matched with corresponding CT and then cropped to keep only the brain images. CT were automatically rigid matched with a T2 MRI template (M. Mirrione, included in PMOD software), and then the transformation applied to the PET image was cropped. This method allowed us to use the atlas of the brain corresponding to the T2 MRI template. The atlas allowed us to quantify 6 regions (cortex, striatum, hippocampus, amygdala, midbrain and inferior colliculi) in left (ipsilateral) and right (contralateral) side, and 7 regions non laterally-

differentiated (thalamus, cerebellum, basal forebrain septum, hypothalamus, brain stem, central gray and superior colliculi) (**Figure 1 Bb**).

To compare mice, SUV values were normalized through a ratio with a SUV value of a reference region, reflecting the radiotracer activity. As it was not possible to find any reference region in our study, we used the ratio between left (ipsilateral) and right (contralateral) side of the 6 regions (cortex, striatum, hippocampus, amygdala, midbrain and inferior colliculi), and the addition of all these regions (total brain). The comparison of the 7 non side-differentiated brain regions (thalamus, cerebellum, basal forebrain septum, hypothalamus, brain stem, central gray and superior colliculi) was not possible.

Immunohistochemistry and immunocytochemistry

Brain preparation

The day after the last TEP acquisition (**Figure 2**), mice were anesthetized (150 mg/kg sodium pentobarbital, i.p.) and transcardially perfused with 0.9% NaCl saline during 2 minutes, followed by a fixative solution (4% paraformaldehyde) during 4 minutes. Brains were removed and post-fixed during one hour, then standed in 20% sucrose during 48h at +4°C. Then, brains were snap frozen during 5 minutes (in 2-methylbutan, 40°C) and kept frozen at -80°C. Coronal brain sections (20 µm thick), were taken from the rostral to caudal part of the brain, using a cryostat (JUNG CM3000, Leica Microsystems), set on gelatinized slides and stored at −80°C. To process to the immunostaining, sections were fixed in acetone on dry ice for 5 minutes, then rehydrated in phosphate-buffered saline (PBS) for 15 minutes.

Cell culture

bEnd 3 Endothelial cells

Transformed mouse brain endothelial cells bEnd.3 (ATCC® CRL-2299™, Manassas, Virginia, USA) purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% fetal calf serum, 1 mM sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids, 50 U/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin in a humidified 5% CO_2 incubator at 37°C. Cell line passages of < 30 were used for all experiments. Cells were cultured on glass coverslips coated with poly-D-lysine in 24- well plates at a density of 200 000 cells/mL. They were treated with LPS (100ng/mL) or phosphate-buffered saline (PBS 0.01 M, pH 7.4), and 24 h after treatments cells were washed with PBS and fixed for 12 min using 4% paraformaldehyde in PBS.

Primary microglia cell culture

Primary mixed glial cell culture was prepared from cortices of postnatal (day P0 to P3) mice as previously described.[10,41] Briefly, brains were harvested and dissected into ice-cold DMEM-High Glucose (HG) medium supplemented with 2% of antibiotic solution (penicillin 10 000 U/mL - streptomycin 10 mg/mL), and the meninges were gently removed. Cortices were collected, and then mechanically dissociated and suspended in DMEM-HG medium supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM of L-glutamine and 0.01% of antibiotic solution. Glial cells were cultured in poly-D-lysine coated flasks under humidified atmosphere containing 5% CO2 at 37°C.

Fourteen days later, microglia were isolated from the mixed glial population by an orbital shaking (140 rpm, 37°C) of the flasks for 30 minutes. The supernatants containing microglia were collected and centrifuged (1 200 g x 10 minutes, 4°C). The pellets were re-suspended in fresh DMEM-HG medium supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM of L-glutamine and

0.01% of antibiotic solution. For immunofluorescence staining, cells were seeded on poly-D-lysine coated coverslips placed in 24-well culture plates previously treated with poly-D-lysine, at a density of 400 000 cells/mL. They were treated with LPS (100ng/mL) or phosphate-buffered saline (PBS 0.01 M, pH 7.4), and 24 h after treatments cells were washed with PBS and fixed for 12 minutes using 4% paraformaldehyde in PBS. The culture purity, determined by immunofluorescence labeling using ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1, a specific marker of microglia) antibody (Abcam, ab5076), is about 98%.

Immunostaining

Slides were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies, diluted in a PBS – gelatin (0.2%) – Triton X-100 (0.25%) to permeabilize and block non-specific binding: goat anti-mouse Iba1 (Abcam, ab5076, 1:500); rabbit anti-mouse TSPO (Abcam, ab109497, 1:500 and Invitrogen; SA90-03; 1:150); goat anti-mouse collagen IV (SouthernBiotech, 1340-01, 1:200; goat anti-mouse ICAM-1 (R&D Systems; AF796; 1:20); goat anti-mouse Arg1 (Santa Cruz Biotechnologies; Sc-18355; 1:200). Following incubation in primary antibody, slices were washed 3 × 5 minutes with PBS-Tween 0.1%, then incubated with secondary antibodies diluted in a PBS – gelatin (0.2%) – Triton X-100 (0.25%): donkey anti-rabbit AF 488 (Molecular Probs, A21206, 1:1 000) for TSPO; donkey anti-goat Cy3 (Jackson Immuno Research; 705-165-147; 1:1 000) for Iba1, ICAM-1; Arg1 and collagen IV. After 90 min of incubation, slices were washed 3 x 5 minutes with PBS, then incubated with DAPI (Calbiochem; 268298; 1:20 000) during 90 minutes at room temperature. Finally, slices were washed 3 x 5 minutes with PBS.

For the DAPI/IB4/collagen IV/TSPO staining, a 90-minutes incubation with a FITC-marked Isolectin B4 from *Bandeiraea simplicifolia* (*Griffonia simplicifolia*) (Sigma, L2895, 1:100) was performed. Then, the slides were washed with PBS 3 x 5 minutes and mounted with Fluoromount-G (SouthernBiotech) and examined under a SP8 laser scanning confocal microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France).

For TSPO and Iba1 quantification, 4 SO and 11 TBI at D14 were analyzed with tile scan to get an image of the whole lower half brain, on a section at around - 2 mm from the bregma (from Paxinos and Watson atlas, 2001). ROIs (0.5 x 0.5 mm) were defined with Leica Application Suite (v3.3.0.16799, Leica Microsystems, Nanterre, France) on left (ipsilateral) and right (contralateral) regions with increased TSPO expression measured in PET. TSPO stained area (m^2) and Iba1 stained cell count were quantified in both ROI after applying a median filter (radius: 5, iteration: 1) and a threshold to delete the background.

Flow cytometry

Animals

The goal of this experiment was to evaluate the expression of TSPO by microglial cells, in the inflammatory context of TBI. As inflammatory context was needed but it did not matter if the inflammation was caused by the surgery or by the TBI, no sham-operated mice were then analysed. Six NO, 8 TBI at 1 day and 8 TBI at 3 days were used for flow cytometry experiment.

Brain dissociation

At 1 and 3 days after TBI, or surgery, mice were anesthetized (150 mg/kg sodium pentobarbital, i.p.) and transcardially perfused with 0.9% NaCl saline during 4 minutes. The brains were then quickly removed and the hemispheres separated from each other. Each hemisphere represented a sample and was cut into small pieces and placed in 2 mL ice-cold HBSS (Hanks' balanced salt solution; Gibco; 14185-052) until all brains were removed.

Each sample was then dissociated in a mix from the Miltenyi Biotec's Adult Brain Dissociation Kit (130-107-677). The sample were then placed for 30 min at 37°C in a water bath, with manual mechanical trituration every 5 minutes. Samples were then centrifuged (1 000g, 10 minutes, 4°C) then re-suspended in cold PBS (Gibco, 70011-036), and filtered through a 70 µm filter (MACS SmartStrainers, Miltenyi Biotec; 110-916) to remove undissociated tissue.

Samples were centrifuged (1 000g, 10 minutes, 4°C) and cell pellets were re-suspended in cold PBS and debris removal solution of Miltenyi Biotec's Adult Brain Dissociation Kit according to the manufacturer instructions. During centrifugation (3 000g, 10 minutes, 4°C) 3 phases were formed and the lower phase, containing the cell suspension, was collected and re-suspended in cold PBS. After centrifugation, (1 000g, 10 minutes, 4°C), cells were counted and the volume adjusted to obtain 50 to 100.10^6 cells/mL.

Immunostaining

For each sample, 100µL were proceeded to immunostaining. Firstly, samples were incubated with 10 µL of Zombie NIR® (Biolegend, 423105, 1: 500 in PBS), then rinsed with 500 µL of FACS buffer (2% bovine serum albumin, 5mM ethylenediaminetetraacetic acid in PBS; BSA, Miltenyi Biotec; 130- 091- 376; EDTA, Sigma, ED4SS), and centrifuged at 800 g during 6 minutes. Control samples without Zombie NIR® labeling were incubated with 10 µL of PBS.

For multicolour stainings, samples were incubated with 90 µL of TruStain FcX® (Biolegend, 101320, 1:10 in FACS buffer) 2 minutes to reduce non-specific bindings and then with 10 µL of fluorochrome-conjugated antibodies solution or their corresponding isotopic controls diluted in FACS buffer during 30 minutes. Samples were then washed with 1 mL of FACS buffer and centrifuged (800g, 5 minutes) twice. Antibodies concentrations and references are listed in **Table 1**.

For TSPO staining, cells were fixed through incubation with 500 µL of fixation buffer (Biolegend, 420801, 20 minutes), centrifuged (1 800g, 6.5 minutes), rinsed with 500 µL of staining perm wash buffer (Biolegend, 421002) and centrifuged again (1 800g, 6.5 minutes). Samples were then incubated with 100 µL of anti-TSPO antibody diluted in staining perm wash buffer during 30 minutes. Control samples without anti-TSPO antibodies were incubated with 100 µL of staining perm wash buffer. Finally, the samples were washed with 500 µL of staining perm wash buffer,

centrifuged (1 800g, 6.5 min) and re-suspended in 150 µL of FACS buffer for flow cytometry analysis.

Data acquisition

Cells were analyzed with LSRFortessa® cell analyzer (BD Biosciences) and data were analyzed with FACSDiva software (Becton Dickinson) and FlowJo software (version 10.5.3; Tree Star).

After isolating single living cells (**Figure 3 A**), monocytes and neutrophils were gated on their Ly-6G and Ly-6C expression profile, lymphocytes, macrophages and microglia were gated on their CD45 and CD11b expression profile, and endothelial cells were gated on their CD144 expression profile (**Figure 3 B**).

After gating the $TSPO^+$ cells on single live cells, the same gating strategy than previously described was applied to discriminate monocytes, neutrophils, lymphocytes, macrophages, microglia and endothelial cells (**Figure 3 C**). This allowed us to quantify the distribution of the different immune cells and endothelial cells in the cells expressing TSPO in the CNS, and its relative expression level.

The number of each immune cell population (monocytes, neutrophils, macrophages, lymphocytes and microglia) was counted and added to get the total number of immune cell. The repartition of each immune cell was calculated by the ratio of the number of the specific immune cell population over the total number of immune cells.

In each isolated cell population, the proportion of $TSPO^+$ cells was calculated, and in each cellular population, the TSPO expression was quantified using geometric mean intensity.

Statistical analysis

Data were expressed as mean ± SEM of n observations, where n represents the number of animals. All figures and statistical analyses were created with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Values of probability lower than 5% ($p < 0.05$) were considered significant.

To proceed to TEP data analysis, SUVmean and SUVmax were extracted from PMOD software and converted into Microsoft Excel format (Microsoft, Seattle, WA, USA).

SUVmean and SUVmax of each of the 6 side-differentiable brain regions were compared between the different mice group using one-way ANOVA followed by a Dunnett's test.

IHC quantification values were compared between SO and TBI mice with a Welsh t test as the variance were significantly different.

The distribution of immune cells measured in flow cytometry, and the geometric mean of the TSPO staining intensity were compared with a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test.

RESULTS

PET imaging of TSPO expression after TBI

Ipsi/contralateral [^{18}F]FEPPA SUVmean increased in the amygdala at 14 days post-TBI (p=0.0494 *versus* sham-operated) (**Figure 4**) reflecting an increase in TSPO expression in this region. No significant variations of ipsi/contralateral [^{18}F]FEPPA SUVmean were observed in other regions and at all studied time-points. Similarly, ipsi/contralateral [^{18}F]FEPPA SUVmax increased in the amygdala at 14 days post-TBI (data not shown).

TSPO and microglia quantification in amygdala at 14 days after TBI

In order to confirm the increase of TSPO protein expression reflected microglia activation in the amygdala 14 days after TBI, immunohistochemistry of TSPO and Iba1 was performed on mice brain in these regions (**Figure 5 A**). TSPO staining area quantification showed a non significant (p = 0.1182) increase in ipsi/contralateral TSPO expression ratio (**Figure 5 B**).

Ipsi/contralateral Iba1^{+} cells ratio was significantly increased in TBI mice (p = 0.0381), reflecting an increase in ipsi/contralateral microglia ratio in amygdala 14 days after TBI (**Figure 5 C**). However, when comparing independently the ipsi and contralateral regions, the number of Iba1^{+} cells did not differ between SO and TBI (**Figure 5 D** and **E**).

No colocalization was observed between Iba1 and TSPO staining. Moreover, TSPO staining revealed a vascular-like staining different from Iba1 staining (**Figure 6 A**). This staining was observed in all brain regions, whatever the group, NO, SO, TBI, and time-point studied.

To further investigate the vascular-like TSPO staining, immunohistochemistry staining of basal lamina (collagen IV) and endothelial cells (isolectin B4) were performed (**Figure 6 B**). These staining detailed the localization of TSPO as under the basal lamina, revealing an endothelial localization of TSPO (**Figure 6 B**).

No staining of TSPO with AQP4, specific to astroglia, and the absence of basal-like staining of TSPO revealed that the astrocyte endfeet surrounding the blood vessels did not expressed TSPO (data not shown).

Finally, the same pattern of staining was observed with an anti-TSPO antibody from a different clone targeting another TSPO epitope.

To evaluate the expression of TSPO by microglia and/or endothelial cells, immunocytochemistry was performed using antibodies raised against TSPO and microglia (Arg1) or endothelial cell (ICAM-1) specific markers on primary microglial cell cultures and on brain endothelial cell (bEnd3) culture. TSPO was clearly expressed by microglial cells, whether they were stimulated by pro-inflammatory stimulus (LPS) or not (control condition; **Figure 7 A**). We also highlighted the expression of TSPO by bEnd3 cell culture (**Figure 7 B**) showing that endothelial cells also expressed TSPO.

Immune cells distribution after TBI

Under homeostatic conditions, microglia represented 94.6 ± 1.1% of the total of immune cells, macrophages 0.7 ± 0.1%, monocytes 4.0 ± 1.1%, neutrophils 0.3 ± 0.1% and lymphocytes 0.4 ± 0.1% (**Table 2** and **Figure 8**). Microglia was not modified by TBI at one day (93.1 ± 1.9%) and significantly decreased at three days (89.4 ± 1.1%; $p<0.05$). Conversely, all the other immune cell populations increased at one and three days after a TBI (**Table 2**), reflecting the peripheral immune cell recruitment following TBI.[42]

TSPO expression within immune cells and endothelial cells after TBI

In the homeostatic state, microglia were the main $TSPO^+$ cells (58.3 ± 2.7%) while macrophages (0.4 ± 0.1%), monocytes (2.7 ± 0.7%), lymphocytes (0.2 ± 0.1%), neutrophils (0.2 ± 0.1%) and endothelial cells (0.2 ± 0.1%) counted less than 4% of all $TSPO^+$ cells. The rest of $TSPO^+$ cells

(37.9 ± 3.1%) were not identified (**Figure 8 B** and **Table 3**) and could be neurons, astrocytes and/or oligodendrocytes. The proportion of microglia significantly decreased one day after TBI (44.4 ± 3.6%; $p<0.05$) and got back to its homeostatic level at 3 days after TBI (57.5 ± 3.2%). At three days, TBI increased the proportion of macrophages (1.6 ± 0.3%, $p<0.01$), lymphocytes (0.8 ± 0.2%, $p<0.05$) and neutrophils (1.3 ± 0.4%, $p<0.01$), demonstrating parenchyma infiltrating blood cells. Finally, the proportion of unidentified cells in $TSPO^+$ cells increased at one day (52.0 ± 3.6%; $p<0.01$) and got back to its homeostatic level at three days (34.3 ± 1.7%) (**Table 3** and **Figure 9A**).

The geometric mean of TSPO relative expression intensity was higher in the peripheral immune cells such as macrophages (34 036 ± 3 314, $p<0.001$ *versus* microglia), monocytes (21 164 ± 1 814, $p<0.001$ *versus* microglia), lymphocytes (28 231 ± 4 430, $p<0.001$ *versus* microglia) and neutrophils (22 157 ± 3 508, $p<0.001$ *versus* microglia) than in microglia (4 110 ± 310). Conversely, the TSPO expression intensity was lower in endothelial cells (2 681 ± 251) and in the rest of unidentified $TSPO^+$ cells (3 677 ± 149) than in microglia. Following TBI, TSPO expression of $TSPO^+$ cells (4 495 ± 214) did not differ at one day (5 151 ± 511) but was significantly increased at three days after TBI (11 742 ± 786.4; $p<0.001$). TSPO expression profile of endothelial cells (2 729 ± 431 at D1 and 3 505 ± 426 at D3) and monocytes (28 289 ± 3 594 at D1 and 26 405 ± 1 771 at D3) was not modified by time after TBI. In neutrophils, TSPO expression was significantly higher both at D1 (83 324 ± 16 866, $p<0.001$) and D3 (59 408 ± 5 214, $p<0.05$). In all the rest of the cells, the increase was observed only at D3: microglia (5 898 ± 790 at D1 and 14 836 ± 1 560 at D3; $p<0.001$), macrophages (35 742 ± 4 425 at D1 and 82 585 ± 6 329 at D3; $p<0.001$), lymphocytes (26 629 ± 3 800 at D1 and 49 301 ± 3 990 at D3, $p<0.01$) and all the other unidentified cells (3 414 ± 126 at D1 and 4 126 ± 121 at D3; $p<0.05$) (**Table 4** and **Figure 9B**).

In immune cells, 94 to 100 % of the cells expressed TSPO (**Table 5**). Conversely, only 11.5 ± 2.5% of endothelial cells expressed TSPO in non-operated. These proportions did not significantly differ after TBI (**Table 5**).

DISCUSSION

Many studies linked NI, characterized by microglial activation, to WMI, after TBI.[7,43,44] For more than 20 years, TSPO has been described as specific for glial cells in the CNS and is widely used as a reference marker for microglial activation in different pathological context.[26–29] However, the use of TSPO to specifically monitor the microglial activation remains a matter of concern in the literature[16]. In this study, we evaluated the use of TSPO for microglial activation monitoring using PET imaging in an experimental model of TBI in mice, and we explored the TSPO expression profile of cells by flow cytometry.

Flow cytometry analysis showed increase of TSPO expression in microglia at three days after TBI. As microglial activation has been previously described in our TBI model at this time-point,[39] we can assume that TSPO is overexpressed by activated microglia, as previously described.[45–48] We also highlighted an increase of TSPO expression in the overall population of $TSPO^+$ cells in the CNS three days after TBI, consistently with the literature[27,28]. However, the involvement of microglia in the overall overexpression of TSPO in the CNS following TBI remains unclear. Indeed, the expression of TSPO by non-microglial glial cells and endothelial cells is known for long time but only recent studies reported a non-negligible expression of TSPO by activated astrocytes[49,50] and endothelial cells.[51] Our results confirmed the importance of non-microglial expression of TSPO, as microglia represent only 58% of the $TSPO^+$ cells in the CNS in non-operated mice, and 44 to 58% 1 and 3 days after TBI. This data points the lack of specificity of TSPO for microglia and suggests that microglia contributes to the overall increase in TSPO in the CNS after TBI, but is not its only contributor. The infiltrating immune cells appear to be strong contributors to TSPO increase following TBI. A recent *in vitro* study reported an increased expression of TSPO in macrophages in a pro-inflammatory context.[50] Flow cytometry analysis

allowed us to confirm it *in vivo* and to highlight that all the immune cells express TSPO. They accounted for only 3.5 to 7.9% of the $TSPO^+$ cells, but they expressed TSPO in a stronger way than microglia, both in homeostatic state (*i.e.* non-operated mice) and in an inflammatory context (*i.e.* TBI mice). Moreover, 94 to 100% of the immune cells expressed TSPO and its expression increased in lymphocytes, neutrophils and macrophages following TBI.

Staining confirmed the lack of specificity of TSPO expression as no colocalization of TSPO and Iba1 was observed. Moreover, more precise staining revealed an endothelial localization of TSPO similarly to a recent study[52]. Immunostainings on primary cell culture allowed us to confirm the expression of TSPO by endothelial cells already reported by others.[23,53–58] However, flow cytometry analysis demonstrated that only 11.5% of the endothelial cells expressed TSPO, and these cells represented 0.2% of $TSPO^+$ cells, with a lower expression than other cell types.

The lack of specificity of TSPO does not explain the absence of increased expression by PET in our TBI model, while an increase was observed in flow cytometry. PET analysis, using [^{18}F]-FEPPA a second-generation TSPO radioligand, was not sufficiently resolutive to reveal an increased expression of TSPO at 1 and 3 days after TBI, whereas we demonstrated microglial activation and NI in this model.[39] Indeed, the spatial resolution of Inveon PET device is 1.4 mm full-width. With an impact zone of 3 mm width and compared to the mouse brain size, this low resolution raises issue about sensitivity and specificity. To our knowledge, PET imaging has never been used to target TSPO in a TBI mouse model. NI following TBI may not be important enough to be detectable in TEP with current TSPO radiotracers and PET resolution. Given the definition of PET device and the small size of the cerebral regions defined by the atlas VOIs, the signals detected in a VOI might can originate from adjacent tissues, like skin and skull. This could explain the increased expression of TSPO found in the amygdala at day 14 post-TBI, time and location at which NI and microglial activation are not present.[39] IHC analysis, which allows a better

spatial sensitivity in a 0.25mm^3 area compared to the 1.4 mm full width resolution of PET, did not revealed any TSPO overexpression in this area confirming our hypothesis.

In addition, it may be necessary to consider the endothelial expression of TSPO in the kinetic model, as proposed in a recent study.[51]

Finally, the results of real time-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) processed on microglial culture (supplemental data **Figure S1**) showed an increase of TSPO expression in microglia submitted to a pro-inflammatory stimulus by TNFα (4.3 fold) but much lower than other microglial markers (15 and 433 fold, respectively for TNFα and NOS2 mRNA expression). Besides, TSPO expression was not modified under anti-inflammatory stimulus by IL-4 (data not shown), demonstrating the expression of TSPO by pro-inflammatory M1 microglial phenotype.[50,59]

In the light of these results, the use of TSPO in NI context should be interpreted with caution. Although they do not necessarily question the use of TSPO as a NI marker, these results question its use as a specific marker of microglial activation. If microglia is the main cell expressing TSPO and therefore the main contributor to its increase in the inflammatory context of TBI, its expression by a broad array of cell population, some of which with higher expression level, must be taken into account according to the type of analysis and the objective sought.

Limitations of the study

A static study was used to perform the PET analysis, with an acquisition time of 30 minutes for each mouse. A dynamic study with a longer time of acquisition would have allowed to compare the different groups with the volume of distribution, which might have been more accurate than SUVmean. However, the shorter time of acquisition allowed us to have bigger samples, keeping the same total time of acquisition. Moreover, the final goal of this study was to transpose this method for a clinical use. We made the choice to perform acquisition with a duration compatible

with clinical experiments, and to analyze them with SUVmean and max, as they are used in clinical routine. Immunohistochemical on mice brain sections revealed an exclusive endothelial staining for TSPO. No colocalization was found with microglia or other immune cells, which express TSPO more importantly than endothelial cells, according to our flow cytometry results. The same staining was obtained with 2 different anti-TSPO antibodies that had different clones. In addition, one of the two antibodies was identical to the one we used in flow cytometry, which effectively labelled the microglia. Finally, our immunocytochemical TSPO staining with this antibody was effective on microglia cultures. Then, the quality of the antibody cannot be questioned. Finally, a number of cells expressing TSPO were not identified by our experiments. These cells could be oligodendrocytes, neurons or astrocytes. The non-identification of these cells is a limitation of our study. However, the objective of our flow cytometry experiments was to quantify the proportion of microglia in cells expressing TSPO, in order to evaluate its specificity for microglia in particular. We therefore did not need to identify all the other cell types expressing TSPO, which was not the objective of this work.

Author Disclosure Statement

The authors declare no competing financial interests exist.

Acknowledgement

Confocal imaging was performed in the Cellular and Molecular Imaging facility of the Faculty of Pharmacy of Paris (UMS3612 CNRS, US25 Inserm). We thank Dr Bruno Saubaméa for his help in immunostaining experiments and confocal imaging.

1. Maas, A.I.R., Menon, D.K., Adelson, P.D., Andelic, N., Bell, M.J., Belli, A., Bragge, P., Brazinova, A., Büki, A., Chesnut, R.M., Citerio, G., Coburn, M., Cooper, D.J., Crowder, A.T., Czeiter, E., Czosnyka, M., Diaz-Arrastia, R., Dreier, J.P., Duhaime, A.-C., Ercole, A., van Essen, T.A., Feigin, V.L., Gao, G., Giacino, J., Gonzalez-Lara, L.E., Gruen, R.L., Gupta, D., Hartings, J.A., Hill, S., Jiang, J., Ketharanathan, N., Kompanje, E.J.O., Lanyon, L., Laureys, S., Lecky, F., Levin, H., Lingsma, H.F., Maegele, M., Majdan, M., Manley, G., Marsteller, J., Mascia, L., McFadyen, C., Mondello, S., Newcombe, V., Palotie, A., Parizel, P.M., Peul, W., Piercy, J., Polinder, S., Puybasset, L., Rasmussen, T.E., Rossaint, R., Smielewski, P., Söderberg, J., Stanworth, S.J., Stein, M.B., von Steinbüchel, N., Stewart, W., Steyerberg, E.W., Stocchetti, N., Synnot, A., Te Ao, B., Tenovuo, O., Theadom, A., Tibboel, D., Videtta, W., Wang, K.K.W., Williams, W.H., Wilson, L., Yaffe, K., Adams, H., Agnoletti, V., Allanson, J., Amrein, K., Andaluz, N., Anke, A., Antoni, A., van As, A.B., Audibert, G., Azaševac, A., Azouvi, P., Azzolini, M.L., Baciu, C., Badenes, R., Barlow, K.M., Bartels, R., Bauerfeind, U., Beauchamp, M., Beer, D., Beer, R., Belda, F.J., Bellander, B.-M., Bellier, R., Benali, H., Benard, T., Beqiri, V., Beretta, L., et al. (2017). Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. Lancet Neurol. 16, 987–1048.

2. Taylor, C.A., Bell, J.M., Breiding, M.J., and Xu, L. (2017). Traumatic brain injury–related emergency department visits, hospitalizations, and deaths — United States, 2007 and 2013. MMWR. Surveill. Summ. 66, 1–16.

3. Crane, P.K., Gibbons, L.E., Dams-O'Connor, K., Trittschuh, E., Leverenz, J.B., Keene, C.D., Sonnen, J., Montine, T.J., Bennett, D.A., Leurgans, S., Schneider, J.A., and Larson, E.B. (2016). Association of traumatic brain injury with late-life neurodegenerative conditions and neuropathologic findings. JAMA Neurol. 73, 1062.

4. Finnie, J.W. (2013). Neuroinflammation: beneficial and detrimental effects after traumatic

brain injury. Inflammopharmacology 21, 309–20.

5. Lozano, D., Gonzales-Portillo, G.S., Acosta, S., de la Pena, I., Tajiri, N., Kaneko, Y., and Borlongan, C. V. (2015). Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: etiology, clinical consequences, and therapeutic opportunities. Neuropsychiatr. Dis. Treat. 11, 97–106.

6. Chiu, C.-C., Liao, Y.-E., Yang, L.-Y., Wang, J.-Y., Tweedie, D., Karnati, H.K., Greig, N.H., and Wang, J.-Y. (2016). Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. J. Neurosci. Methods 272, 38–49.

7. Johnson, V.E., Stewart, J.E., Begbie, F.D., Trojanowski, J.Q., Smith, D.H., and Stewart, W. (2013). Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury. Brain 136, 28–42.

8. Faden, A.I., and Loane, D.J. (2015). Chronic neurodegeneration after traumatic brain injury: alzheimer disease, chronic traumatic encephalopathy, or persistent neuroinflammation? Neurotherapeutics 12, 143–150.

9. Faden, A.I., Wu, J., Stoica, B.A., and Loane, D.J. (2016). Progressive inflammation-mediated neurodegeneration after traumatic brain or spinal cord injury. Br. J. Pharmacol. 173, 681–691.

10. Chhor, V., Le Charpentier, T., Lebon, S., Oré, M.-V., Celador, I.L., Josserand, J., Degos, V., Jacotot, E., Hagberg, H., Sävman, K., Mallard, C., Gressens, P., and Fleiss, B. (2013). Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. Brain. Behav. Immun. 32, 70–85.

11. Bergold, P.J. (2016). Treatment of traumatic brain injury with anti-inflammatory drugs. Exp. Neurol. 275, 367–380.

12. Loane, D.J., and Kumar, A. (2016). Microglia in the TBI brain: the good, the bad, and the dysregulated. Exp. Neurol. 275 Pt 3, 316–327.

13. Jin, X., Ishii, H., Bai, Z., Itokazu, T., and Yamashita, T. (2012). Temporal changes in cell marker expression and cellular infiltration in a controlled cortical impact model in adult male C57BL/6 mice. PLoS One 7, e41892.

14. Turtzo, L.C., Lescher, J., Janes, L., Dean, D.D., Budde, M.D., and Frank, J.A. (2014). Macrophagic and microglial responses after focal traumatic brain injury in the female rat. J. Neuroinflammation 11, 82.

15. Wang, G., Zhang, J., Hu, X., Zhang, L., Mao, L., Jiang, X., Liou, A.K.-F., Leak, R.K., Gao, Y., and Chen, J. (2013). Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury. J. Cereb. Blood Flow Metab. 33, 1864–74.

16. Albrecht, D.S., Granziera, C., Hooker, J.M., and Loggia, M.L. (2016). In vivo imaging of human neuroinflammation. ACS Chem. Neurosci. 7, 470–83.

17. Bribes, E., Carrière, D., Goubet, C., Galiègue, S., Casellas, P., and Joêlle, S.-L. (2004). Immunohistochemical assessment of the peripheral benzodiazepine receptor in human tissues. J. Histochem. Cytochem. 52, 19–28.

18. Braestrup, C., Albrechtsen, R., and Squires, R.F. (1977). High densities of benzodiazepine receptors in human cortical areas. Nature 269, 702–704.

19. Papadopoulos, V., Baraldi, M., Guilarte, T.R., Knudsen, T.B., Lacapère, J.-J., Lindemann, P., Norenberg, M.D., Nutt, D., Weizman, A., Zhang, M.-R., and Gavish, M. (2006). Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. Trends Pharmacol. Sci. 27, 402–409.

20. Gallager, D.W., Mallorga, P., Oertel, W., Henneberry, R., and Tallman, J. (1981).

[3H]Diazepam binding in mammalian central nervous system: a pharmacological characterization. J. Neurosci. 1, 218–25.

21. Schoemaker, H., Morelli, M., Deshmukh, P., and Yamamura, H.I. (1982). [3H]Ro5-4864 benzodiazepine binding in the kainate lesioned striatum and Huntington's diseased basal ganglia. Brain Res. 248, 396–401.

22. Zisterer, D.M., and Williams, D.C. (1997). Peripheral-type benzodiazepine receptors. Gen. Pharmacol. Vasc. Syst. 29, 305–314.

23. Cosenza-Nashat, M., Zhao, M.-L., Suh, H.-S., Morgan, J., Natividad, R., Morgello, S., and Lee, S.C. (2009). Expression of the translocator protein of 18 kDa by microglia, macrophages and astrocytes based on immunohistochemical localization in abnormal human brain. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 35, 306–328.

24. Scarf, A.M., and Kassiou, M. (2011). The Translocator Protein. J. Nucl. Med. 52, 677–680.

25. Hillmer, A.T., Holden, D., Fowles, K., Nabulsi, N., West, B.L., Carson, R.E., and Cosgrove, K.P. (2017). Microglial depletion and activation: A [11C]PBR28 PET study in nonhuman primates. EJNMMI Res. 7, 59.

26. Chen, M.-K., and Guilarte, T.R. (2008). Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. Pharmacol. Ther. 118, 1–17.

27. Ramlackhansingh, A.F., Brooks, D.J., Greenwood, R.J., Bose, S.K., Turkheimer, F.E., Kinnunen, K.M., Gentleman, S., Heckemann, R.A., Gunanayagam, K., Gelosa, G., and Sharp, D.J. (2011). Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. Ann. Neurol. 70, 374–383.

28. Folkersma, H., Boellaard, R., Yaqub, M., Kloet, R.W., Windhorst, A.D., Lammertsma, A.A., Vandertop, W.P., and van Berckel, B.N.M. (2011). Widespread and prolonged

increase in (R)-11C-PK11195 binding after traumatic brain injury. J. Nucl. Med. 52, 1235–1239.

29. Sandiego, C.M., Gallezot, J.-D., Pittman, B., Nabulsi, N., Lim, K., Lin, S.-F., Matuskey, D., Lee, J.-Y., O'Connor, K.C., Huang, Y., Carson, R.E., Hannestad, J., and Cosgrove, K.P. (2015). Imaging robust microglial activation after lipopolysaccharide administration in humans with PET. Proc. Natl. Acad. Sci. 112, 12468–12473.

30. Schweitzer, P.J., Fallon, B.A., Mann, J.J., and Kumar, J.S.D. (2010). PET tracers for the peripheral benzodiazepine receptor and uses thereof. Drug Discov. Today 15, 933–942.

31. Coughlin, J.M., Wang, Y., Munro, C.A., Ma, S., Yue, C., Chen, S., Airan, R., Kim, P.K., Adams, A. V., Garcia, C., Higgs, C., Sair, H.I., Sawa, A., Smith, G., Lyketsos, C.G., Caffo, B., Kassiou, M., Guilarte, T.R., and Pomper, M.G. (2015). Neuroinflammation and brain atrophy in former NFL players: An in vivo multimodal imaging pilot study. Neurobiol. Dis. 74, 58–65.

32. Coughlin, J.M., Wang, Y., Minn, I., Bienko, N., Ambinder, E.B., Xu, X., Peters, M.E., Dougherty, J.W., Vranesic, M., Koo, S.M., Ahn, H.-H., Lee, M., Cottrell, C., Sair, H.I., Sawa, A., Munro, C.A., Nowinski, C.J., Dannals, R.F., Lyketsos, C.G., Kassiou, M., Smith, G., Caffo, B., Mori, S., Guilarte, T.R., and Pomper, M.G. (2017). Imaging of glial cell activation and white matter integrity in brains of active and recently retired national football league players. JAMA Neurol. 74, 67.

33. Turkheimer, F.E., Rizzo, G., Bloomfield, P.S., Howes, O., Zanotti-Fregonara, P., Bertoldo, A., and Veronese, M. (2015). The methodology of TSPO imaging with positron emission tomography. Biochem. Soc. Trans. 43, 586–592.

34. Venneti, S., Lopresti, B.J., and Wiley, C.A. (2006). The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein 18kDa) in microglia: From pathology to imaging. Prog. Neurobiol. 80,

308–322.

35. Herrera-Rivero, M., Heneka, M.T., and Papadopoulos, V. (2015). Translocator protein and new targets for neuroinflammation. Clin. Transl. Imaging 3, 391–402.

36. Jacobs, A.H., Tavitian, B., and consortium, the Inm. (2012). Noninvasive molecular imaging of neuroinflammation. J. Cereb. Blood Flow Metab. 32, 1393–1415.

37. Wilson, A.A., Garcia, A., Parkes, J., McCormick, P., Stephenson, K.A., Houle, S., and Vasdev, N. (2008). Radiosynthesis and initial evaluation of [18F]-FEPPA for PET imaging of peripheral benzodiazepine receptors. Nucl. Med. Biol. 35, 305–314.

38. Vignal, N., Cisternino, S., Rizzo-Padoin, N., San, C., Hontonnou, F., Gelé, T., Declèves, X., Sarda-Mantel, L., and Hosten, B. (2018). [18F]FEPPA a TSPO radioligand: optimized radiosynthesis and evaluation as a pet radiotracer for brain inflammation in a peripheral lps-injected mouse model. Molecules 23, 1375.

39. Taib, T., Leconte, C., Van Steenwinckel, J., Cho, A.H., Palmier, B., Torsello, E., Lai Kuen, R., Onyeomah, S., Ecomard, K., Benedetto, C., Coqueran, B., Novak, A.-C., Deou, E., Plotkine, M., Gressens, P., Marchand-Leroux, C., and Besson, V.C. (2017). Neuroinflammation, myelin and behavior: Temporal patterns following mild traumatic brain injury in mice. PLoS One 12, e0184811.

40. Hall, E.D., Sullivan, P.G., Gibson, T.R., Pavel, K.M., Thompson, B.M., and Scheff, S.W. (2005). Spatial and temporal characteristics of neurodegeneration after controlled cortical impact in mice: more than a focal brain injury. J. Neurotrauma 22, 252–265.

41. Ni, M., and Aschner, M. (2010). Neonatal rat primary microglia: isolation, culturing, and selected applications. Current Protocols in Toxicology. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pps. 12.17.1-12.17.16.

42. Clark, R.S.B., Schiding, J.K., Kaczorowski, S.L., Marion, D.W., and Kochanek, P.M. (1994). Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: comparison of weight drop and controlled cortical impact models. J. Neurotrauma 11, 499–506.

43. Loane, D.J., Kumar, A., Stoica, B.A., Cabatbat, R., and Faden, A.I. (2014). Progressive Neurodegeneration After Experimental Brain Trauma. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 73, 14–29.

44. Glushakova, O.Y., Johnson, D., and Hayes, R.L. (2014). Delayed increases in microvascular pathology after experimental traumatic brain injury are associated with prolonged inflammation, blood–brain barrier disruption, and progressive white matter damage. J. Neurotrauma 31, 1180–1193.

45. Altar, C.A., and Baudry, M. (1990). Systemic injection of kainic acid: gliosis in olfactory and limbic brain regions quantified with [3H]PK 11195 binding autoradiography. Exp. Neurol. 109, 333–41.

46. Stephenson, D.T., Schober, D.A., Smalstig, E.B., Mincy, R.E., Gehlert, D.R., and Clemens, J.A. (1995). Peripheral benzodiazepine receptors are colocalized with activated microglia following transient global forebrain ischemia in the rat. J. Neurosci. 15, 5263–74.

47. Banati, R.B., Myers, R., and Kreutzberg, G.W. (1997). PK ('peripheral benzodiazepine') – binding sites in the CNS indicate early and discrete brain lesions: microautoradiographic detection of [3H]PK 11195 binding to activated microglia. J. Neurocytol. 26, 77–82.

48. Gehlert, D.R., Stephenson, D.T., Schober, D.A., Rash, K., and Clemens, J.A. (1997). Increased expression of peripheral benzodiazepine receptors in the facial nucleus following motor neuron axotomy. Neurochem. Int. 31, 705–13.

49. Lavisse, S., Guillermier, M., Hérard, A.-S., Petit, F., Delahaye, M., Van Camp, N., Ben Haim, L., Lebon, V., Remy, P., Dollé, F., Delzescaux, T., Bonvento, G., Hantraye, P., and

Escartin, C. (2012). Reactive astrocytes overexpress TSPO and are detected by TSPO positron emission tomography imaging. J. Neurosci. 32, 10809–18.

50. Pannell, M., Economopoulos, V., Wilson, T.C., Kersemans, V., Isenegger, P.G., Larkin, J.R., Smart, S., Gilchrist, S., Gouverneur, V., and Sibson, N.R. (2019). Imaging of translocator protein upregulation is selective for pro-inflammatory polarized astrocytes and microglia. Glia , glia.23716.

51. Wimberley, C., Lavisse, S., Brulon, V., Peyronneau, M.-A., Leroy, C., Bodini, B., Remy, P., Stankoff, B., Buvat, I., and Bottlaender, M. (2018). Impact of endothelial 18-kda translocator protein on the quantification of 18F-DPA-714. J. Nucl. Med. 59, 307–314.

52. Gui, Y., Marks, J.D., Das, S., Hyman, B.T., and Serrano-Pozo, A. (2019). Characterization of the 18 kDa translocator protein (TSPO) expression in *post-mortem* normal and Alzheimer's disease brains. Brain Pathol. , bpa.12763.

53. Mirzaei, N., Tang, S.P., Ashworth, S., Coello, C., Plisson, C., Passchier, J., Selvaraj, V., Tyacke, R.J., Nutt, D.J., and Sastre, M. (2016). *In vivo* imaging of microglial activation by positron emission tomography with [^{11} C]PBR28 in the 5XFAD model of Alzheimer's disease. Glia 64, n/a-n/a.

54. Roncaroli, F., Su, Z., Herholz, K., Gerhard, A., and Turkheimer, F.E. (2016). TSPO expression in brain tumours: is TSPO a target for brain tumour imaging? Clin. Transl. Imaging 4, 145–156.

55. Tomasi, G., Edison, P., Bertoldo, A., Roncaroli, F., Singh, P., Gerhard, A., Cobelli, C., Brooks, D.J., and Turkheimer, F.E. (2008). Novel reference region model reveals increased microglial and reduced vascular binding of 11C-(R)-PK11195 in patients with Alzheimer's Disease. J. Nucl. Med. 49, 1249–1256.

56. Turkheimer, F.E., Edison, P., Pavese, N., Roncaroli, F., Anderson, A.N., Hammers, A.,

Gerhard, A., Hinz, R., Tai, Y.F., and Brooks, D.J. (2007). Reference and target region modeling of [11C]-(R)-PK11195 brain studies. J. Nucl. Med. 48, 158–67.

57. Kanno, I., Seki, C., Takuwa, H., Jin, Z.-H., Boturyn, D., Dumy, P., Furukawa, T., Saga, T., Ito, H., and Masamoto, K. (2018). Positron emission tomography of cerebral angiogenesis and TSPO expression in a mouse model of chronic hypoxia. J. Cereb. Blood Flow Metab. 38, 687–696.

58. Notter, T., Coughlin, J.M., Gschwind, T., Weber-Stadlbauer, U., Wang, Y., Kassiou, M., Vernon, A.C., Benke, D., Pomper, M.G., Sawa, A., and Meyer, U. (2018). Translational evaluation of translocator protein as a marker of neuroinflammation in schizophrenia. Mol. Psychiatry 23, 323–334.

59. Beckers, L., Ory, D., Geric, I., Declercq, L., Koole, M., Kassiou, M., Bormans, G., and Baes, M. (2018). Increased expression of translocator protein (TSPO) marks pro-inflammatory microglia but does not predict neurodegeneration. Mol. Imaging Biol. 20, 94–102.

SUPPLEMENTAL DATA

Real time-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) for TSPO expression in primary microglial cell culture

Material and methods

Total RNA was isolated, from primary microglia culture, with the RNeasy® Micro Kit according to the manufacturer's instruction (Qiagen). RNA quality and concentration were assessed by spectrophotometry with the NanodropTM1000 (Thermofischer Scientific). Total RNA was then subjected to reverse transcription using the iScriptTM cDNA synthesis kit (Bio-Rad). Using SYBER Green Super-mix (Biorad), RT-qPCR was performed in triplicate for each sample for 40 cycles with a two-step program (5 seconds of denaturation at 95°C and 10 seconds of annealing at 60°C). Amplification specificity was evaluated with a melting curve analysis. Primers were designed using Primer3 software. Sequence and their NCBI references are given in **Table S1**. The relative expression of gene of interest was normalized to that of ribosomal protein L13A (Rpl13a), used as a reference gene. For primary microglia culture, the data are presented as relative RNA units with respect to the control group (normalized to 100%).

Results

TSPO expression significantly increased in microglia under pro-inflammatory stimulus (4.3 fold; $p<0.01$) but to a lesser extent compared to NOS2 (433 fold; $p<0.0001$) and TNFα (15 fold; $p<0.001$) (**Figure S1**).

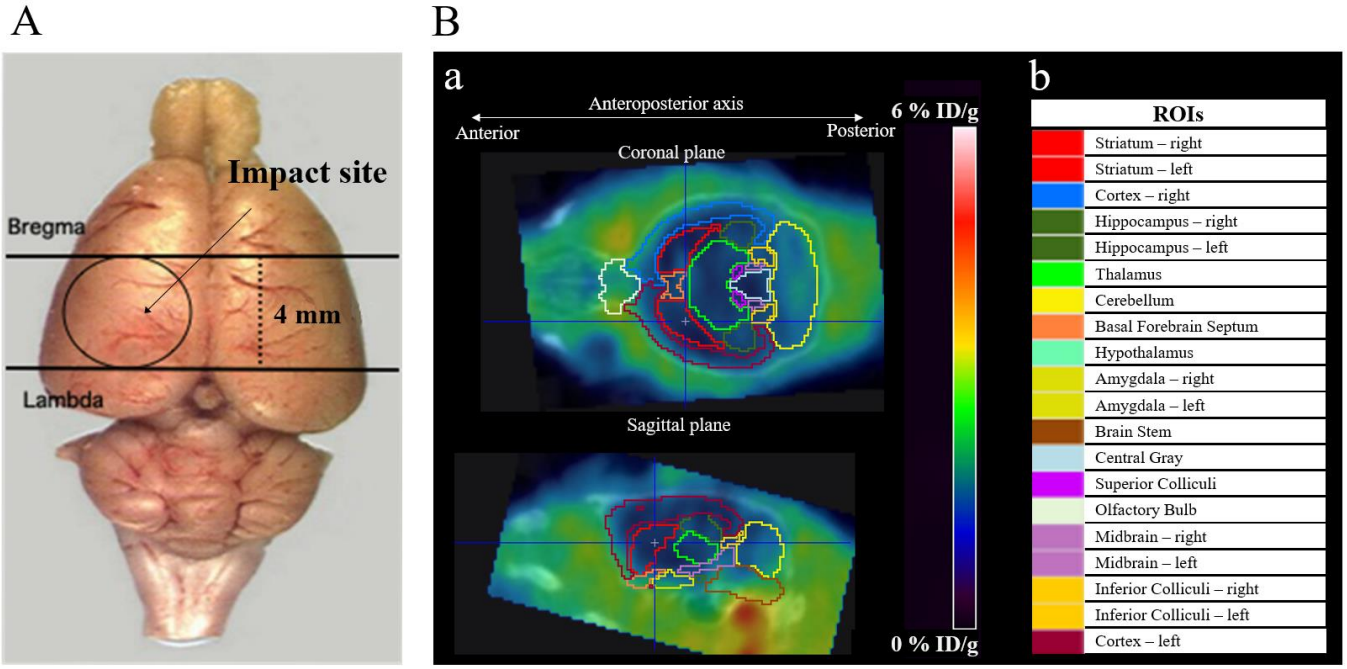


Figure 1. **A.** Area of the cortical impact; **B**. PET/CT image of [18F]FEPPA binding (**a**) expressed in %ID/g and viewed in a coronal and sagittal plane, with (**b**) the atlas of the ROI used for quantification.

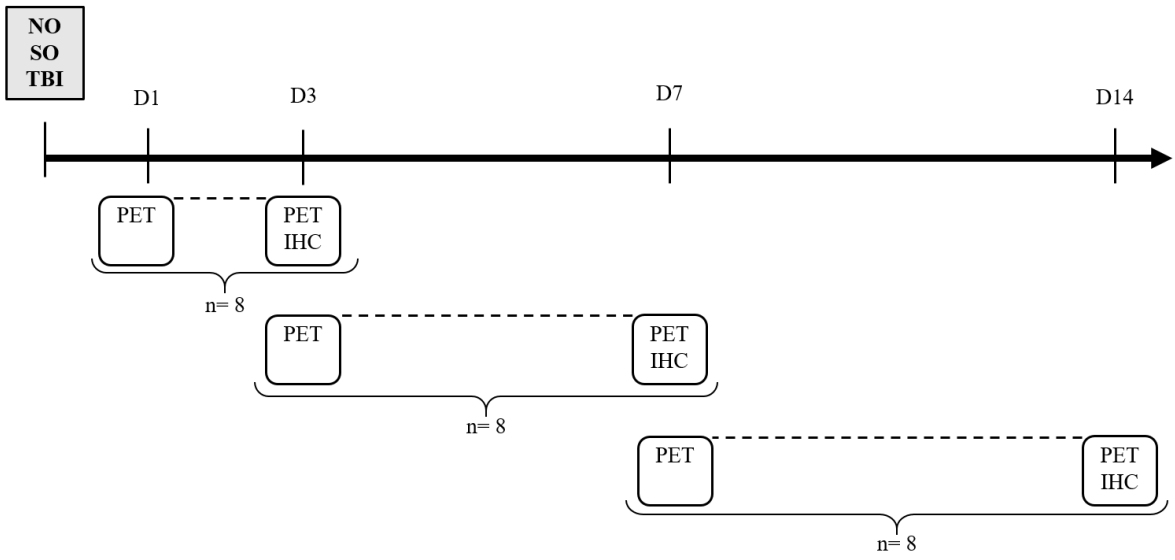


Figure 2. PET acquisition protocol. For each one of the 6 acquisitions, 8 mice were imaged: 1 NO, 3 SO and 4 TBI. After the second PET acquisition, mice were sacrificed for IHC analysis.

Abbreviations: D: Day; IHC: Immunohistochemistry; PET: Positron Emission Tomography; TBI: Traumatic Brain Injury.

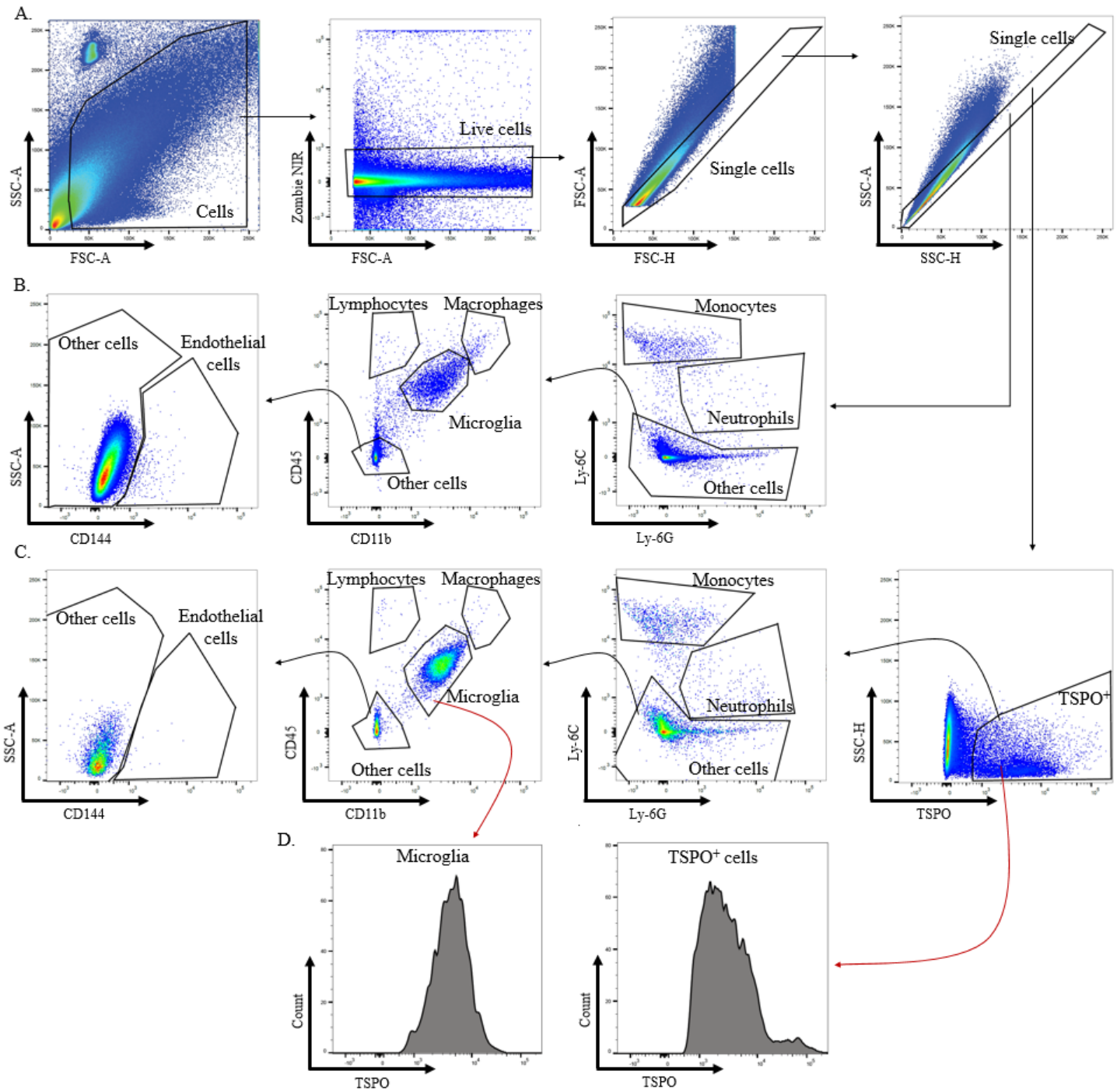


Figure 3. Flow cytometry gating strategy to sort the different cellular populations. Cells were distinguished (**A**) from debris using forward (FSC-A) and side (SSC-A) scatters, followed by cell doublet and aggregate elimination (FSC-A/FSC-H and SSC-A/SSC-H). Dead cells were gated out by strong positivity for the dead cell discrimination marker Zombie Dye®. (**B**) Monocytes (Ly-6G^{-}/Ly-6C^{hi}) and neutrophils (Ly-6G^{+}/Ly-6C^{int}) were gated. In the other cells (Ly-6C^{-}), lymphocytes (CD11b^{-}/CD45^{hi}), macrophages (CD11b^{+}/CD45^{hi}) and microglia (CD11b^{+}/CD45^{int})

were gated. Finally, endothelial cells were gated with $CD144^{+}$, in the other cells ($CD11b^{-}/CD45^{-}$). (**C**) The same gating strategy was applied to $TSPO^{+}$ cells. (**D**) TSPO expression was quantified in each cellular population using geometric mean intensity.

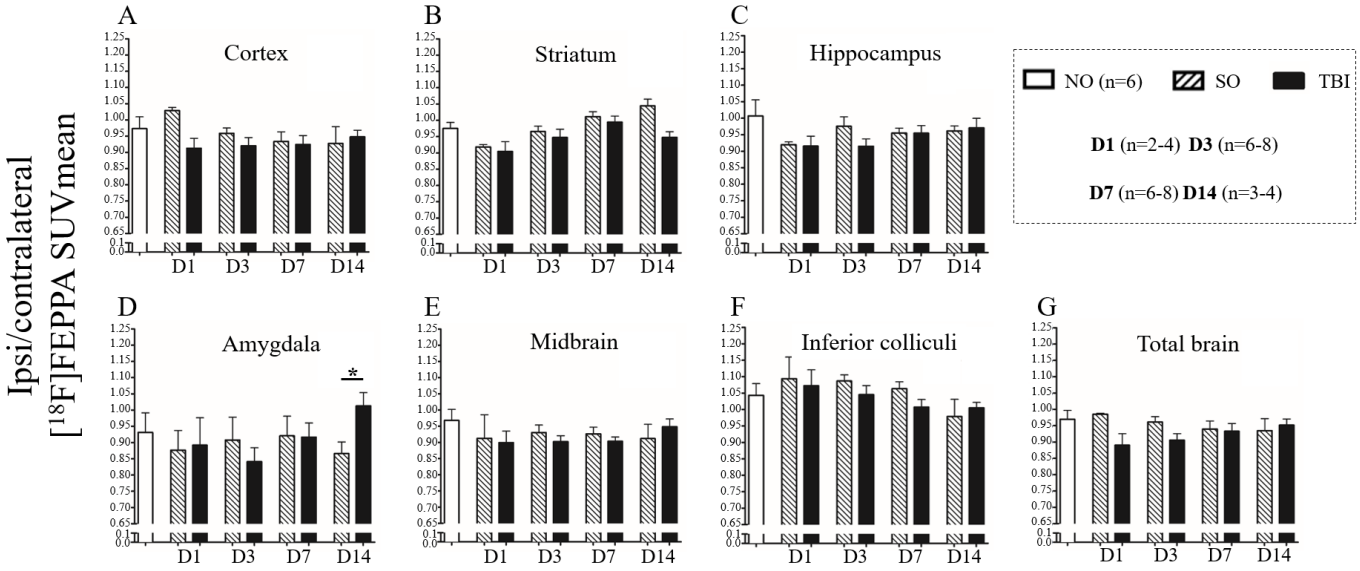


Figure 4. PET ipsi/contralateral [^{18}F]FEPPA SUVmean for NO, SO, and TBI mice at 1, 3, 7 and 14 days, in (A) cortex, (B) striatum, (C) hippocampus, (D) amygdala, (E), midbrain, (F) inferior colliculi and (G) the sum of the 6 regions. Data were expressed as means ± S.E.M. Differences were analyzed using a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test. *$p<0.05$.

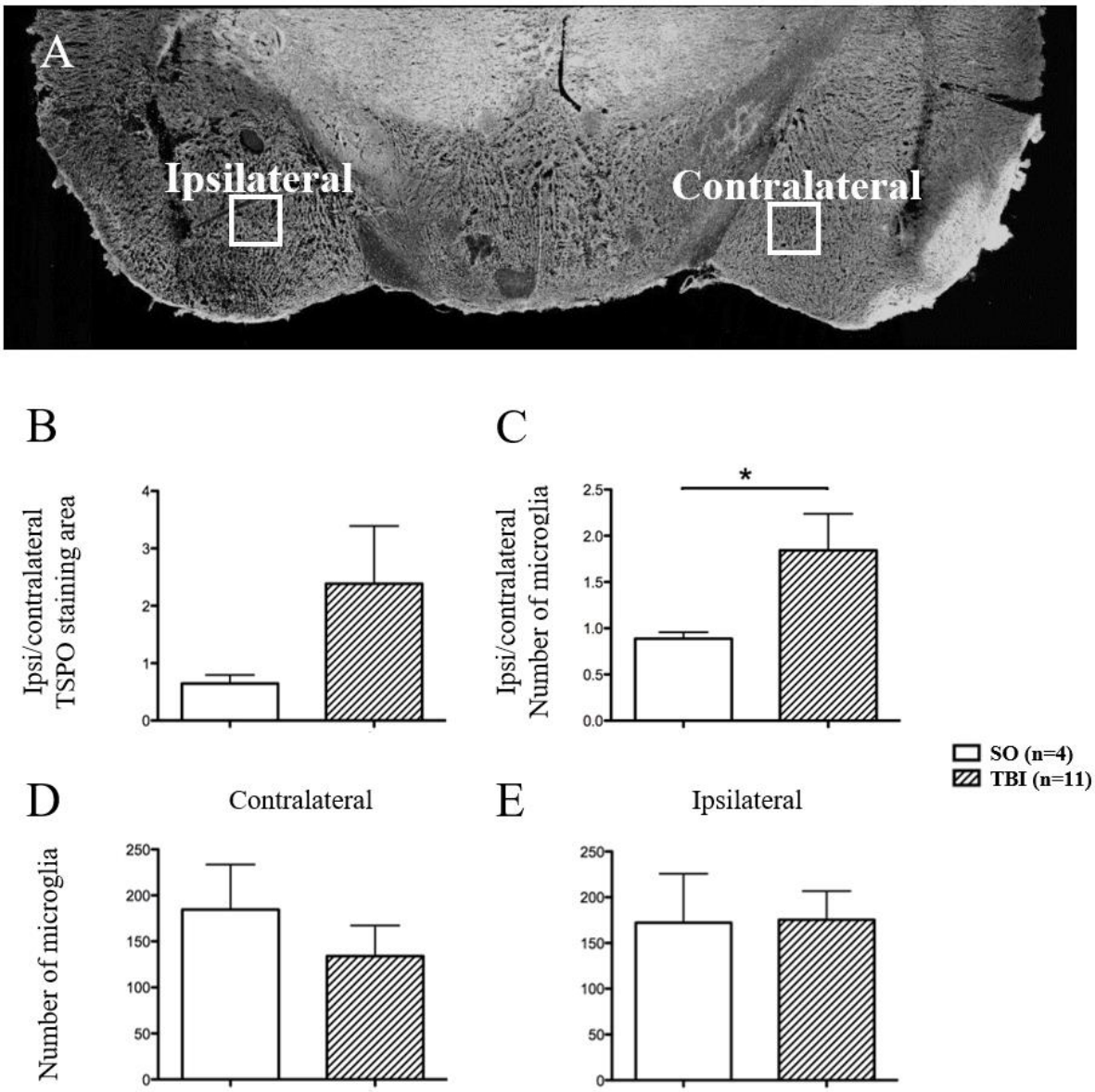


Figure 5. TSPO and microglial quantification 14 days after TBI in (A) ipsi- and contralateral amygdala. (B) Ipsi/contralateral TSPO staining area, (C) ipsi/contralateral Iba1^{+} cells, (D) Iba1^{+} cells in contralateral amygdala, (E) Iba1^{+} cells in ipsilateral amygdala. Data were expressed as means ± S.E.M. Differences were analyzed with a Mann Whitney test when variances were not significantly different and with a Welsh t Test when variances were significantly different. *$p<0.05$.

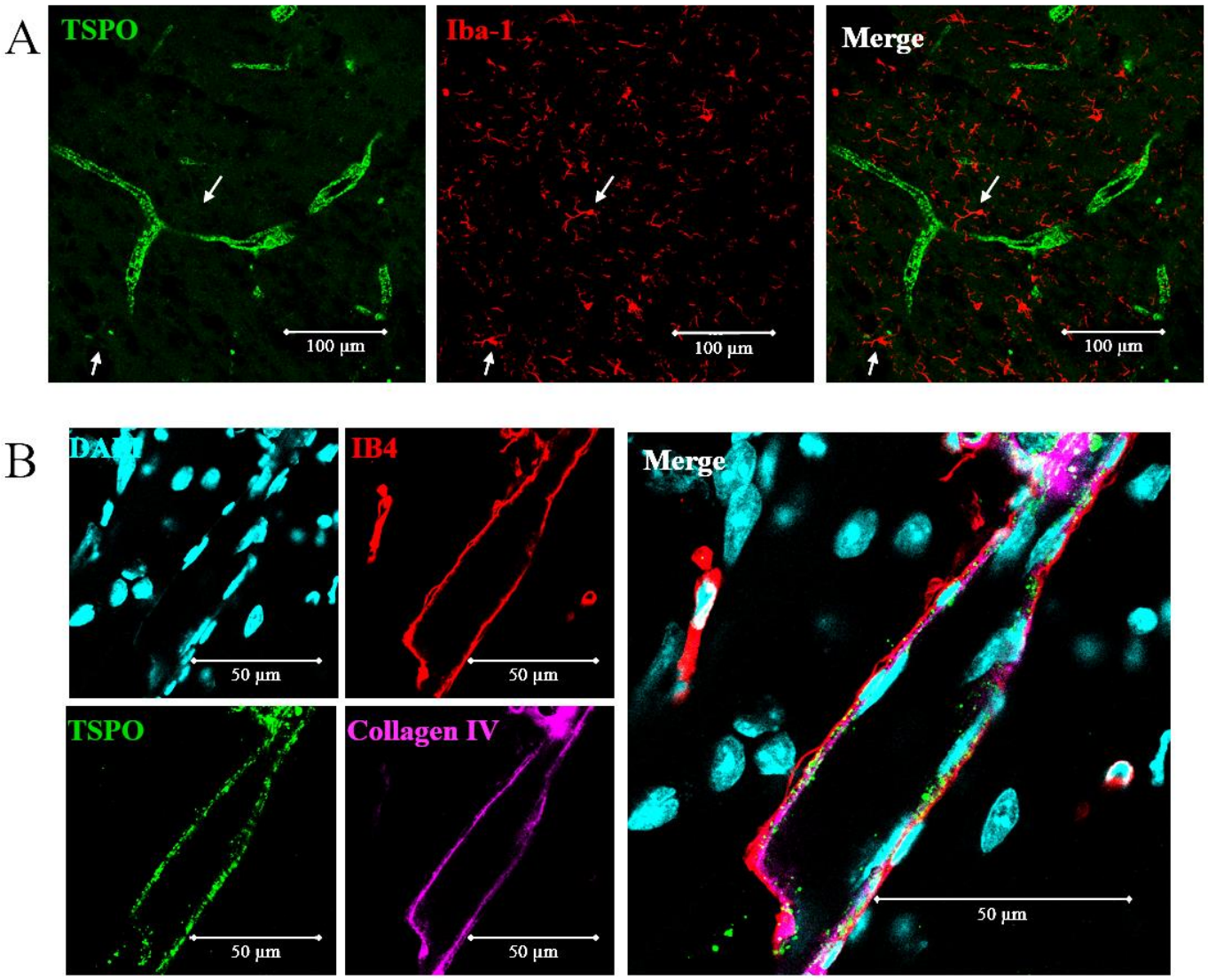


Figure 6. Immunohistochemistry on mouse brain slice 3 days post-TBI around ipsilateral cortical area with (A) Iba-1/TSPO staining and (B) DAPI/TSPO/IB4/Collagen IV staining.

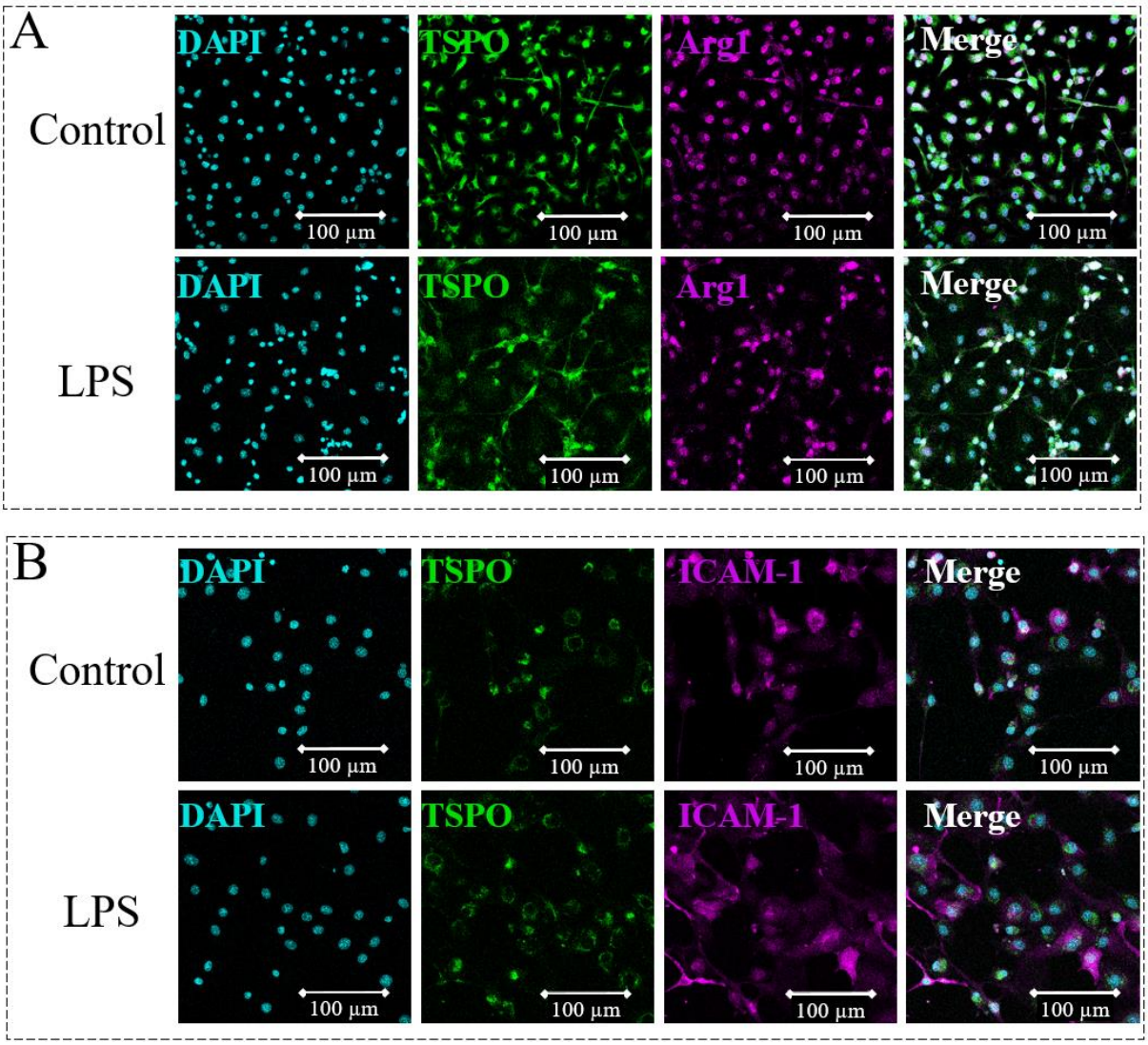


Figure 7. Immunohistochemistry on cell culture of (A) primary microglial cell culture with DAPI/Arg1/TSPO staining, treated with PBS (control condition) or LPS 100 ng/mL (LPS), at x40 lens and (B) brain endothelial cell strain (bEnd3) with DAPI/ICAM-1/TSPO staining, treated with PBS (control condition) or LPS 100 ng/mL (LPS) at x40 lens.

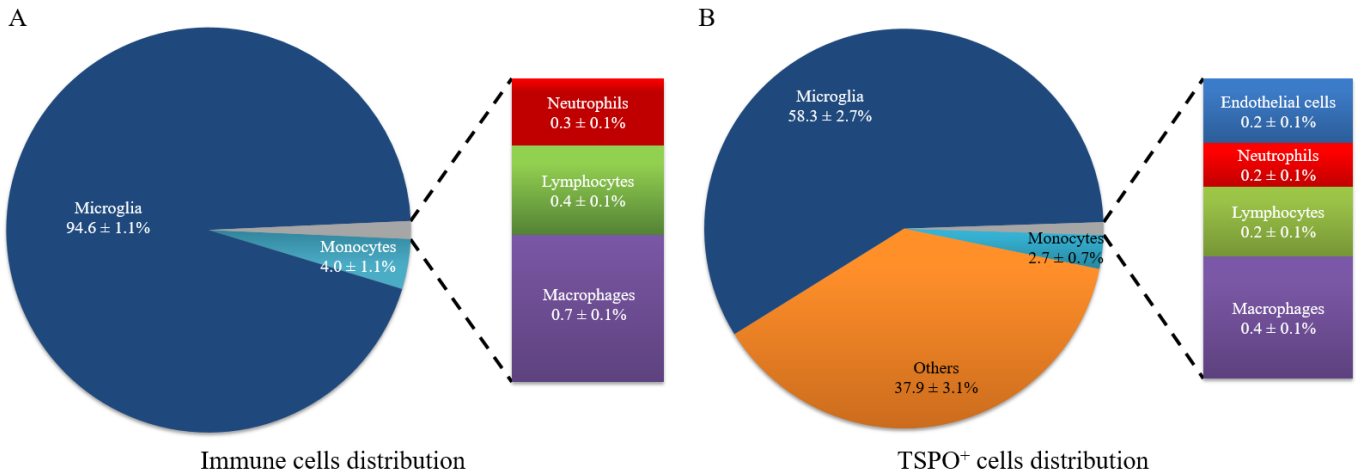


Figure 8. Distribution of (A) immune cells and (B) TSPO$^+$ cells in the CNS at the homeostatic state. Data were expressed as mean ± SEM (n=10).

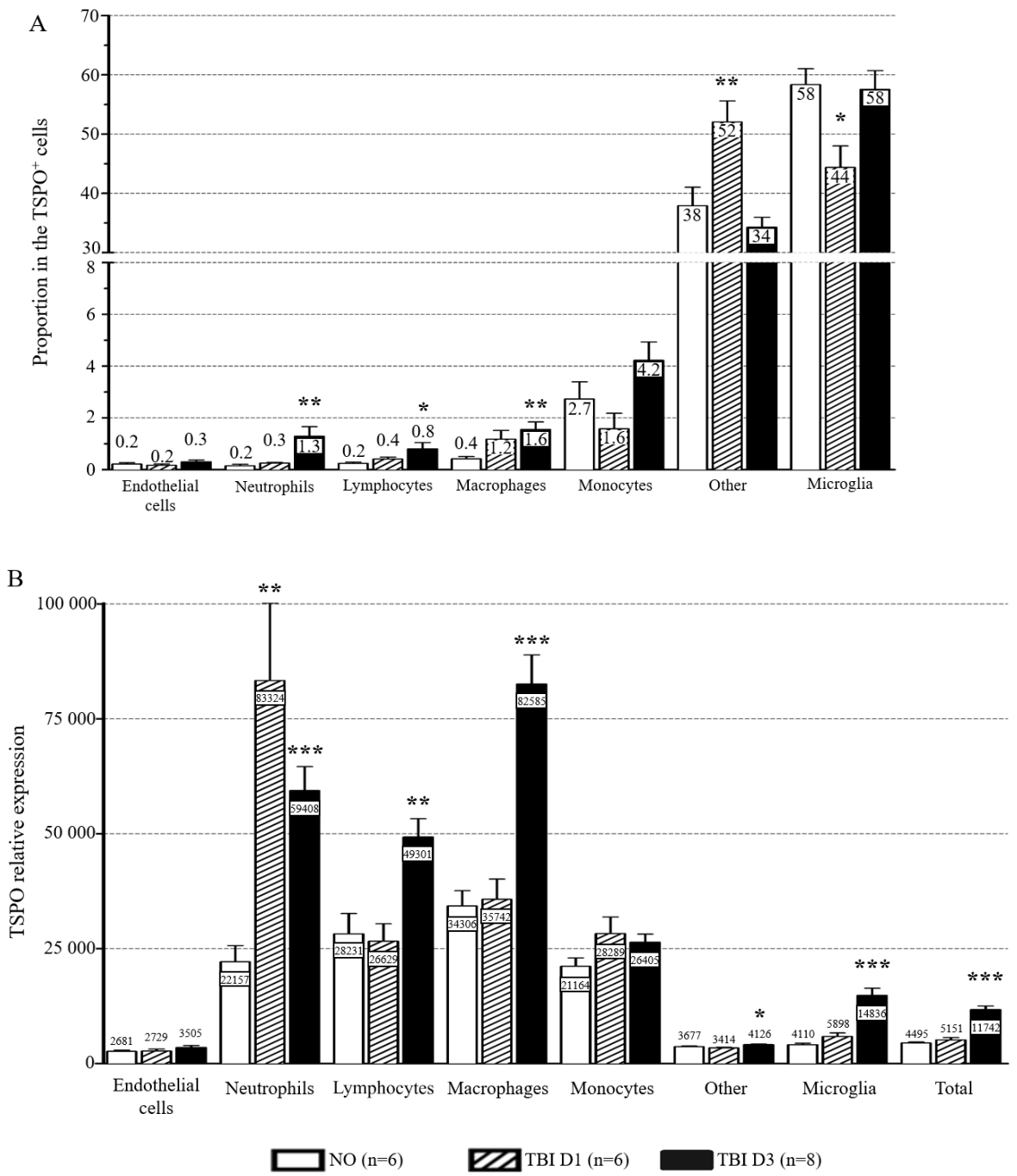


Figure 9. (A) Relative percentage of TSPO$^+$ cells and (B) TSPO expression by cell population in non-operated mice, and at one day and three days after TBI. Data were expressed as mean ± SEM. Differences were analyzed using a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 *versus* non-operated.

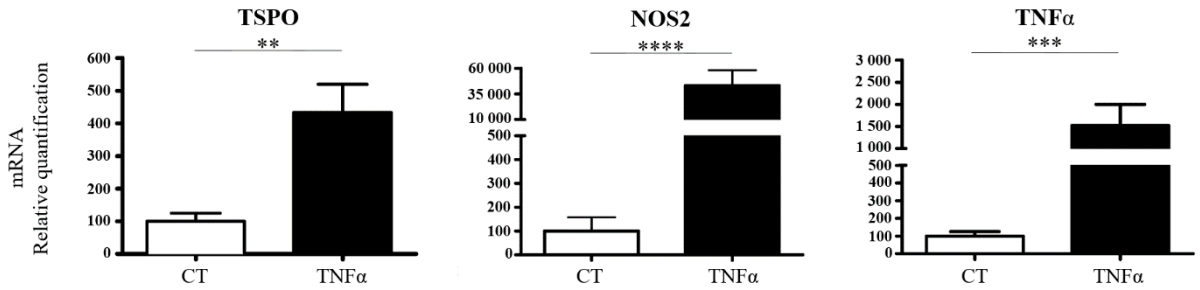


Figure S1. Microglial gene expression under pro-inflammatory stimulus (TNFα 50 ng/mL), mRNA shown relative to control (CT; normalized to 100%). Data were expressed as means ± S.E.M. Differences were analyzed with paired t test with a Welsh's correction. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 and ****p<0.0001.

Target/immunogen	Fluorophore	Supplier	Reference	Dilution
CD144	BV 421	Biolegend	129605	1:160
Ly-6C	BV 605	Biolegend	128036	1:200
CD45	BV 785	Biolegend	103149	1:160
Ly-6G	PE/Cy7	Biolegend	127617	1:120
CD11b	PE/Dazzle 594	Biolegend	101255	1:3000
TSPO	AF647	Abcam	ab199836	1:1000

Table 1. Antibodies used in flow cytometry analysis.

	Non-operated	**TBI**	
	(n=10)	**D1 (n=6)**	**D3 (n=8)**
Microglia	94.6 ± 1.1%	93.1 ± 1.9%	89.4 ± 1.1% *
Macrophages	0.7 ± 0.1%	2.3 ± 0.6% *	2.8 ± 0.5% **
Monocytes	4.0 ± 1.1%	3.2 ± 1.2%	4.5 ± 1.0%
Neutrophils	0.3 ± 0.1%	0.6 ± 0.1%	2.0 ± 0.5% ***
Lymphocytes	0.4 ± 0.1%	0.8 ± 0.1%	1.4 ± 0,3% **

Table 2. Immune cells distribution in the CNS in non-operated mice and at one and three days after TBI. Data were expressed as mean percentage of the total immune cell population ± ESM. Differences were analyzed using a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 *versus* non-operated.

	Non-operated	TBI	
	(n=10)	D1 (n=6)	D3 (n=8)
Microglia	58.3 ± 2.7%	44.4 ± 3.6% *	57.5 ± 3.2%
Macrophages	0.4 ± 0.1%	1.2 ± 0.3%	1.6 ± 0.3% **
Monocytes	2.7 ± 0.7%	1.6 ± 0.6%	4.2 ± 0.7%
Lymphocytes	0.2 ± 0.1%	0.4 ± 0.1%	0.8 ± 0.2% *
Neutrophils	0.2 ± 0.1%	0.3 ± 0.1%	1.3 ± 0.4% **
Endothelial cells	0.2 ± 0.1%	0.2 ± 0.1%	0.3 ± 0.1%
Others	37.9 ± 3.1%	52.0 ± 3.6% **	34.3 ± 1.7%

Table 3. $TSPO^+$ cell distribution in ipsilateral brain of non-operated mice and at one day and three days after TBI. Data were expressed as means of the percentage of cell population on total $TSPO^+$ cells ± SEM. Differences were analyzed using a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 *versus* non-operated.

	Non-operated (n=10)	TBI	
		D1 (n=6)	D3 (n=8)
Total	4 495 ± 214	5 151 ± 511	11 742 ± 786 ***
Microglia	4 110 ± 310	5 898 ± 790	14 836 ± 1 560 ***
Macrophages	34 036 ± 3 314 $$$	35 742 ± 4 425	82 585 ± 6 329 ***
Monocytes	21 164 ± 1 814 $$$	28 289 ± 3 594	26 405 ± 1 771
Lymphocytes	28 231 ± 4 430 $$$	26 629 ± 3 800	49 301 ± 3 990 **
Neutrophils	22 157 ± 3 508 $$$	83 324 ± 16 866 ***	59 408 ± 5 214 ***
Endothelial cells	2 681 ± 251	2 729 ± 431	3 505 ± 426
Others	3 677 ± 149	3 414 ± 126	4 126 ± 121 *

Table 4. TSPO expression in each isolated $TSPO^+$ cellular population in ipsilateral brain of non-operated mice and at one day and three days after TBI. Data were expressed as means of the percentage of cell population on total $TSPO^+$ cells ± SEM. Differences were analyzed using a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 *versus* non-operated. $$$<0.001 *versus* microglia of non-operated.

	Non-operated	TBI	
	(n=10)	D1 (n=6)	D3 (n=8)
Microglia	98.7 ± 0.2%	97.8 ± 0.4%	98.4 ± 0.7%
Macrophages	100.0 ± 0.0%	100.0 ± 0.0%	100.0 ± 0.0%
Monocytes	98.1 ± 0.7%	98.1 ± 0.4%	99.6 ± 0.2%
Lymphocytes	94.0 ± 3.2%	98.6 ± 0.6%	93.4 ± 3.9%
Neutrophils	95.3 ± 2.1%	90.1 ± 2.7%	99.6 ± 0.2%
Endothelial cells	11.5 ± 2.5%	9.7 ± 2.7%	17.2 ± 2.2%

Table 5. Relative percentage of $TSPO^+$ cell in ipsilateral brain of non-operated mice and at one day and three days after TBI. Data were expressed as mean ± SEM. Differences were analyzed using a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test.

Target gene	Forward	Reverse
NO synthase 2 (*Nos2*)	CCC TTC AAT GGT TGG TAC ATG G	ACA TTG ATC TCC GTG ACA GCC
Translocator Protein (*mTspo*)	AGA GGA CGC TAT GGT TCC CTT	GCC ACC CCA CTG ACA AGC
Tumor necrosis factor alpha (*Tnfα*)	GCC TCT TCT CAT TCC TGC TT	AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT
Ribosomal protein L13 (*Rpl13*)	ACA GCC ACT CTG GAG GAG AA	GAG TCC GTT GGT CTT GAG GA

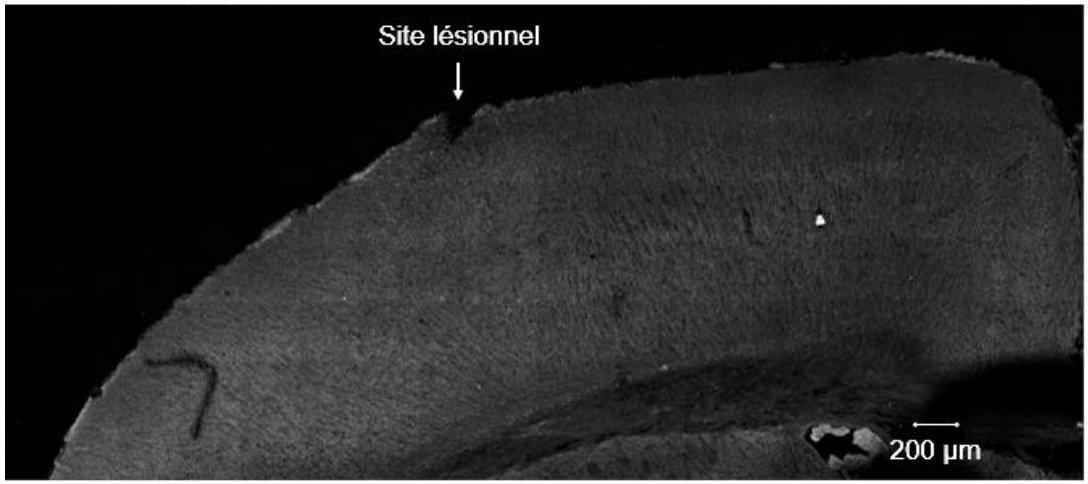
Table S1. Primer sequences

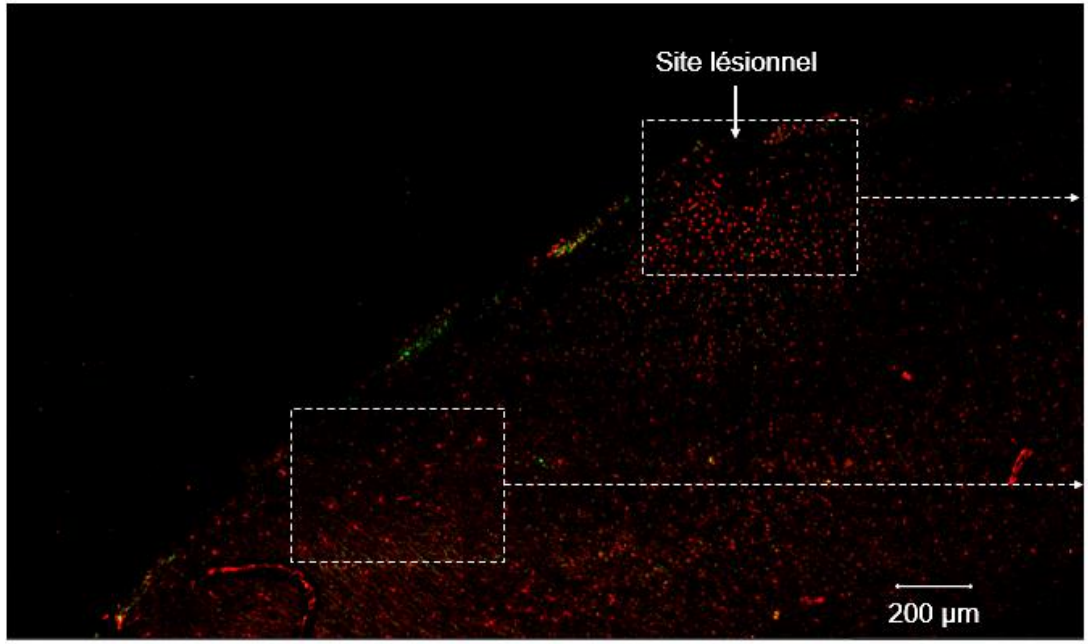
3. Phagocytose des débris de myéline

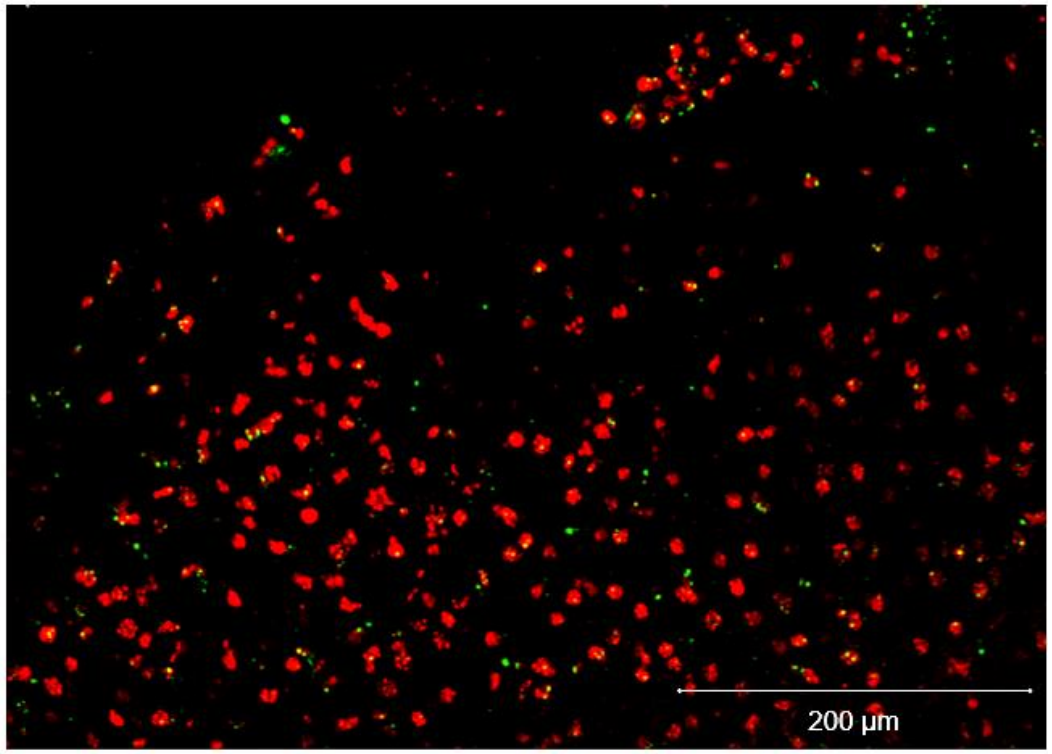
Différentes études ont rapporté les débris de myéline comme étant capables d'induire une réponse pro-inflammatoire (Pinteaux-Jones et al., 2008; Sun et al., 2010; Clarner et al., 2012; Wang et al., 2015b) ou au contraire, anti-inflammatoire (Boven et al., 2006; Liu et al., 2006; Kroner et al., 2014). Les débris de myéline ont été rapportés comme pouvant favoriser l'activation des microglies vers le phénotype M1 dans un contexte de NI post-traumatique (Yang et al., 2011). Cependant, aucun lien entre débris de myéline et activation microgliale n'a pu être mis en évidence jusqu'à présent dans le TC. Au laboratoire, le Dr Taib a mis en évidence une démyélinisation présente dès 3 jours après le TC. De plus, les travaux du Dr Mamma ont mis en évidence que les débris de myéline n'induisent pas une activation des microglies dans un phénotype M1, mais agiraient au contraire comme un potentiel composant anti-inflammatoire endogène. En effet, ses études *in vitro* réalisées sur des cultures primaires de microglies mises en contact avec des débris de myéline dans différents contextes inflammatoires ont révélé une capacité de ces débris à favoriser le phénotype M2 et à diminuer le phénotype M1. De plus, ces propriétés semblent liées à la phagocytose des débris de myéline par la microglie. Ainsi, dans le but d'évaluer si les débris de myéline issus de la démyélinisation post-TC sont phagocytés par les microglies, nous avons procédé à une étude immunohistochimique des débris de myéline et des microglies sur des coupes de cerveaux de souris ayant subi un TC ou non.

3.1. Phagocytose des débris de myéline

Les marquages de microglies par Iba1 sur les coupes de cerveaux de souris TC nous permettent de mettre en évidence les microglies ramifiées à distance du site lésionnel, qui deviennent amœboïdes au fur et à mesure que l'on s'en rapproche (Figure 24). Par ailleurs, le marquage par dMBP en vert nous permet de visualiser la présence de débris de myéline à proximité du site lésionnel, reflétant la démyélinisation consécutive au TC. L'activation des microglies semble ainsi associée à la présence de ces débris et à leur phagocytose, au vu de leur présence importante à l'intérieur des microglies amœboïdes (Figure 24).







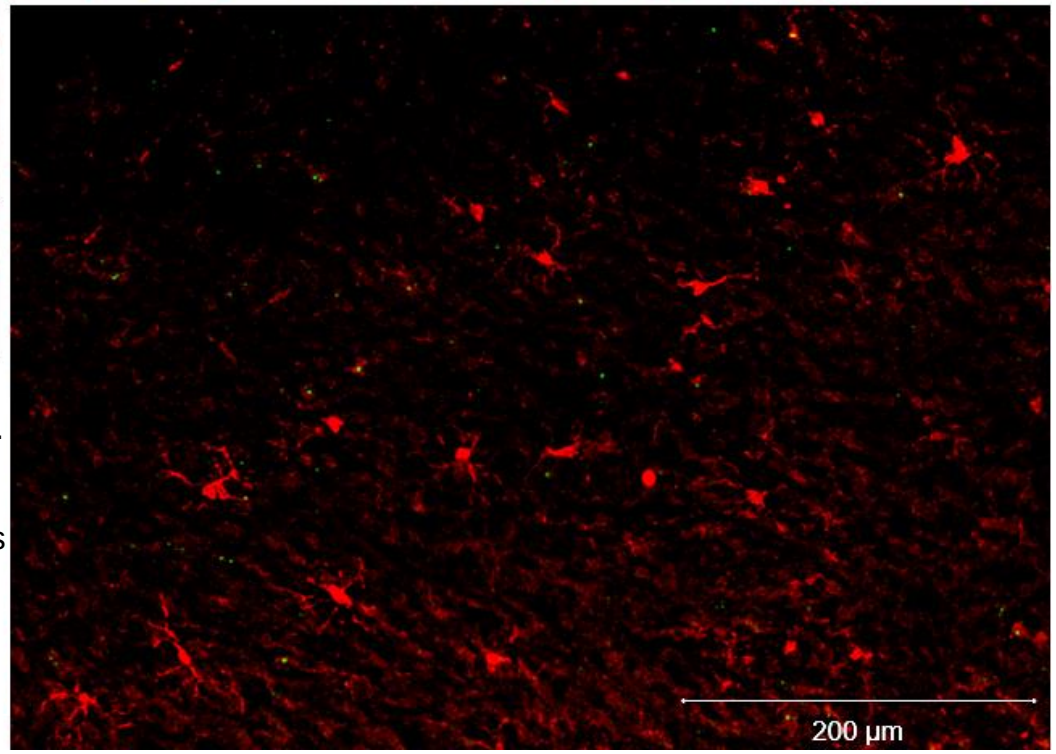


Figure 24 : Photographies de cortex ipsilatéral de souris 3 jours après un TC. Les microglies (marquées en rouge par un anticorps anti-Iba1) sont amœboïdes à proximité du site lésionnel et en cours de phagocytose de débris de myéline (marqués en vert par des anticorps anti-dMBP) et ramifiées à distance du site lésionnel.

Afin d'objectiver ce phénomène, nous avons procédé à une quantification des images obtenues en IHC, du nombre de microglies, de la quantité de débris de myéline et de la proportion de microglies ayant phagocyté de débris de myéline, dans les cortex ipsi- et controlatéraux de souris non opérées, témoins opérées et TC.

3.2. Nombre de microglies

Le ratio moyen du nombre de microglies ipsilatéral/contralatéral n'est pas significativement différent entre les groupes de souris, que ce soit à J1 ou à J3 (Figure 25). Il n'y a donc pas d'augmentation du nombre de microglies au niveau du site lésionnel en comparaison du cortex droit suite à un TC, que ce soit à J1 ou à J3.

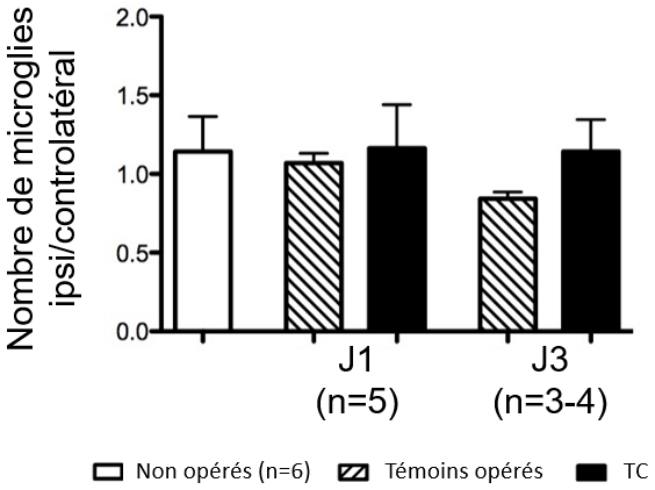


Figure 25 : Ratio ipsi/controlateral du nombre de microglies (cellules iba1^{+}) dans le cortex

Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne ± ESM et ont été analysés à l'aide d'une ANOVA à un facteur.

3.3. Débris de myéline

Le ratio moyen des débris de myéline dans le cortex ipsilatéral/contralatéral n'est pas significativement différent entre les groupes de souris, que ce soit à J1 ou J3 (Figure 26). Il n'y a donc pas d'augmentation du nombre de débris de myéline suite à un TC dans le cortex ipsilatéral par rapport au cortex contralatéral.

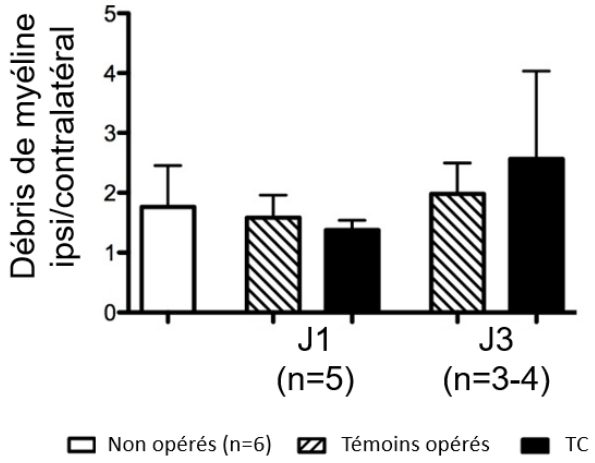


Figure 26 : Ratio ipsi/contralatéral de la surface de marquage de débris de myéline mesurée au niveau cortical.

Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne ± ESM et ont été analysés à l'aide d'une ANOVA à un facteur.

3.4. Microglies ayant phagocyté des débris de myéline

Le ratio du nombre de microglies ayant phagocyté des débris de myéline dans le cortex ipsi/contralatéral augmente de manière significative à J1 ($p<0,05$) (Figure 27A). La proportion de microglies phagocytant des débris de myéline par rapport au nombre total de microglie est également augmentée à J1, mais de manière non significative (Figure 27B).

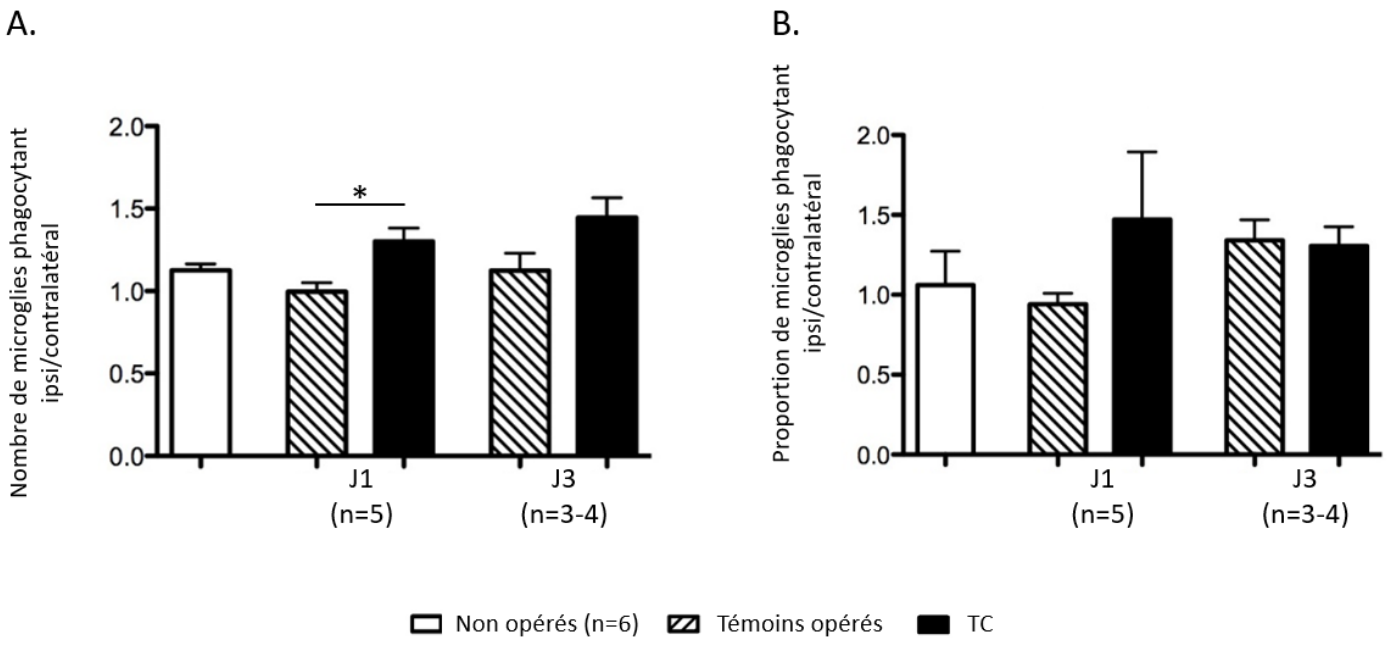


Figure 27 : (A) Ratio ipsi/contralatéral du nombre de microglies ayant phagocyté des débris de myéline dans le cortex. (B) Ratio ipsi/contralatéral du pourcentage de microglies ayant phagocyté des débris de myéline rapporté au nombre total de microglies dans chaque cortex.
Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± ESM et ont été analysés à l'aide d'une ANOVA à un facteur puis d'un test de Bonferroni. *p<0,05.

3.5. Conclusion

Nous pouvons tirer de ces résultats plusieurs éléments sur les débris de myéline et la microglie après un TC induit chez la souris.

Tout d'abord, il n'y a pas d'augmentation du nombre de microglies dans le cortex ipsilatéral des souris suite à un TC, que ce soit à J1 ou à J3. Cependant, nous savons que la NI et l'activation microgliale peuvent s'étendre à diverses structures cérébrales, potentiellement distantes de la zone d'impact, notamment à l'hémisphère controlatéral (Zhang et al., 2015) même si ce phénomène a peu été étudié jusqu'à présent. Or, la comparaison des ratios ipsi/contralatéral dans le but de s'affranchir de la variabilité expérimentale peut cacher une potentielle prolifération microgliale. Cependant, la probabilité d'une extension de la NI à l'hémisphère contralatéral est faible à des temps aussi précoces, auxquels seule l'activation microgliale ipsilatérale est observée (Koshinaga et al., 2000 ; Taib et al., 2017). De la même manière, il est peut-être simplement trop tôt pour pouvoir observer le phénomène de prolifération microgliale, qui

apparait à partir de 3 jours dans le contexte de la NI post-TC (Susarla et al., 2014), ce qui expliquerait nos résultats.

En revanche, si le nombre de microglie ne semble pas augmenter au niveau du site lésionnel, une augmentation du nombre de microglies phagocytant des débris de myéline est observée dans le cortex ipsilatéral par rapport au cortex controlatéral. Cela illustre bien le rôle qu'ont les microglies dans le nettoyage des débris qui peuvent survenir dans le parenchyme cérébral suite à un TC. L'élimination de ces débris par les microglies pourrait expliquer l'absence d'augmentation de débris de myéline entre les cortex ipsi- et controlatéral. Les microglies, en remplissant leur rôle physiologique, éliminent les débris de myéline au fur et à mesure qu'ils apparaissent.

Par ailleurs, l'activation microgliale semble corrélée à la phagocytose des débris de myéline. En effet, il apparait clairement que près du site lésionnel et lorsqu'elles phagocytent les débris, les microglies adoptent une forme amœboide, traduisant leur activation. A distance de la lésion, les microglies phagocytant les débris sont moins nombreuses, et possèdent majoritairement une forme ramifiée, traduisant leur caractère inactivé. Ces résultats pourraient expliquer le mécanisme sous-jacent à la promotion de la NI par les débris de myéline (Yang et al., 2011). En revanche, les marqueurs utilisés ne permettent pas de mettre en évidence le phénotype d'activation microgliale, M1 et/ou M2, vers lequel oriente la phagocytose des débris de myéline.

Ces résultats encourageants nécessitent néanmoins de plus amples expérimentations, afin de savoir notamment d'un point de vue chronologique, si l'activation des microglies est provoquée par la phagocytose des débris de myéline, ou si au contraire la phagocytose des débris de myéline est une conséquence de l'activation microgliale. Par ailleurs, les marquages que nous avons utilisés ne permettent pas d'identifier le phénotype d'activation des microglies phagocytant les débris de myéline. Une telle identification sera indispensable pour comprendre le rôle *in vivo* des débris de myéline dans l'activation microgliale.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail a été d'étudier la pertinence de l'utilisation de l'expression de TSPO comme marqueur de suivi de la NI d'origine microgliale sur le modèle murin de TC développé au laboratoire. Pour ce faire, nous avons tout d'abord procédé à des analyses d'imagerie en TEP, technique qui présente l'avantage de permettre un suivi longitudinal de la NI et d'être transposable en clinique. Nous avons ensuite procédé à des analyses cellulaires plus précises au moyen de plusieurs techniques différentes. Le dernier objectif de ces travaux a été d'étudier l'effet de la phagocytose des débris de myéline sur l'activation microgliale et sa différenciation, dans ce modèle de TC chez la souris.

La première étape a été de valider ma prise en main du modèle expérimental de TC chez la souris, afin de pouvoir interpréter les résultats dans la continuité des travaux du précédent doctorant, le Dr Taib (Taib et al., 2017). Le développement d'œdème post-traumatique à J1 et J2 a attesté de la présence de lésions secondaires provoquées par le TC. L'absence de déficit neurologique à court terme (J2 et J7) a confirmé que le TC provoqué était de sévérité « légère ».

Nos travaux ont ensuite révélé que l'analyse en TEP en utilisant le [^{18}F]FEPPA, un radiotraceur de TSPO, ne permet pas de détecter l'activation microgliale dans notre modèle expérimental. L'activation microgliale n'a pas pu être mise en évidence à 1, 3, 7 ou 14 jours après le TC. Pourtant les études du laboratoire ont mis en évidence une activation microgliale à ces temps par rt-qPCR (Taib et al., 2017). Les méthodes immunohistochimiques n'ont également pas retrouvé de colocalisation de TSPO avec les microglies mais ont révélé une importante expression endothéliale de TSPO, que les souris aient subi, ou non, un TC. Les études immunocytochimiques sur des cultures cellulaires ont confirmé l'expression de TSPO par les cellules endothéliales d'une part, et par les microglies d'autre part. Enfin, les études de CF ont confirmé l'augmentation de l'expression de TSPO dans les microglies suite à un TC. Cependant, elles ont également révélé que les microglies représentent seulement 44 à 58% des cellules exprimant TSPO selon l'état de la souris et le temps après le TC (entre 1 et 3 jours post-TC). La protéine TSPO est notamment retrouvée dans toutes les cellules immunitaires infiltrantes et, pour la plupart des cellules, elle est exprimée de manière plus importante que dans la microglie.

Il reste cependant des incertitudes quant à l'expression de TSPO au sein des cellules non identifiées par nos analyses de CF. De nouvelles expérimentations de CF sont ainsi prévues, avec des anticorps permettant d'identifier spécifiquement les autres populations cellulaires cérébrales, telles que les neurones, les oligodendrocytes et les astrocytes. Ces analyses permettront, d'une part d'établir avec précision le profil d'expression de TSPO par les différentes cellules du SNC, en condition physiologique et dans un contexte inflammatoire post-TC, et d'autre part d'évaluer quantitativement l'évolution des différents types cellulaires du SNC suite à un TC, notamment les oligodendrocytes et les neurones.

Pendant des années, la littérature a considéré la protéine TSPO comme spécifique de la microglie, au point d'en faire le marqueur microglial de référence en clinique. Or, aujourd'hui, le manque de spécificité de TSPO est relevé par des études de plus en plus nombreuses (Wimberley et al., 2018 ; Pannell et al., 2019). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a quantifié la proportion de microglies parmi les cellules exprimant TSPO. Nos travaux sont ainsi les premiers à déterminer avec précision cette proportion et à objectiver le manque de spécificité de TSPO. Nos résultats remettent ainsi en question son utilisation en tant que marqueur spécifique de la microglie. Outre le problème de la spécificité de TSPO, le polymorphisme de ce récepteur chez l'Homme (Owen et al., 2010) compromet également la transposition de cette méthode d'analyse en clinique, alors que ce potentiel clinique était un des atouts majeurs de cette méthode d'imagerie qui justifiait l'intérêt que nous lui portions. Avec une vision plus générale, une augmentation de l'expression de TSPO pourrait toutefois être considérée comme un potentiel marqueur de NI globale, puisque nous avons retrouvé une augmentation de son expression dans le SNC dans un contexte de NI. Cependant là encore, nous n'avons pas retrouvé cette augmentation en TEP, quelle que soit son expression cellulaire. La faible intensité de la NI provoquée par le TC dans notre modèle, par comparaison aux autres modèles de la littérature, n'est probablement pas suffisante pour être détectée en TEP. De plus, la résolution de la TEP est de 1,4 mm, ce qui ne semble pas suffisant pour discerner une faible augmentation de signal à l'intérieur de cerveaux dont la taille est de l'ordre de quelques millimètres de largeur. Au-delà des problématiques liées à TSPO, ceci remet donc en question l'intérêt de la TEP de manière générale dans les modèles murins.

Nos résultats montrent ainsi les limites de l'utilisation de TSPO dans le suivi de la NI d'origine microgliale. Il est donc aujourd'hui nécessaire de trouver un marqueur :

- totalement spécifique de la microglie
- dont l'expression augmenterait lors d'activation microgliale
- transposable chez l'Homme
- quantifiable à l'aide de méthodes d'analyses différentes,
- ciblé par des radioligands facilement synthétisables.

Malheureusement, à l'heure actuelle, aucun autre marqueur d'activation microgliale visualisable en TEP ne répond à ces critères.

En attendant le développement de marqueurs TEP plus performants, et d'appareil de TEP d'une résolution plus importante, un des futurs objectifs du laboratoire sera d'identifier les différents phénotypes d'activation microgliaux par CF. En se basant sur les protocoles de dissociation et de marquage mis au point durant nos travaux, et en testant différents marqueurs spécifiques de l'un ou l'autre des phénotypes, nous serons en capacité d'identifier les états d'activation de la microglie. Plus encore, cette méthode présentant l'avantage de pouvoir déterminer la co-expression de marqueurs pro- ou anti-inflammatoires de cellules présentes dans un échantillon, cellule par cellule, nous serons en mesure de déterminer avec précision la présence *in vivo* de phénotype M1, M2 ou mixtes suite à un TC. Ceci permettra ainsi d'achever l'étude de l'évolution de l'activation microgliale post-TC débutée par le Dr Taib (Taib et al., 2017). En effet, il a mis en évidence, après isolement des microglies de souris ayant subi un TC, une augmentation précoce de marqueurs de microglies M1 suivi d'une augmentation de marqueurs de microglies à la fois M1 et M2. Cependant, ces travaux se sont basés sur l'expression d'ARNm dans la population totale des microglies isolées, ne permettant pas d'identifier de phénotypes mixtes (M1/M2). L'utilisation de la CF permettra ainsi de conclure à la présence de microglie de phénotype M1, M2 ou mixte ainsi que sur leur cinétique d'apparition suite à un TC léger. A termes, cette méthode d'identification des différents phénotypes permettra d'une part de valider les méthodes de déplétion des différents phénotypes microgliaux que nous expérimenterons au laboratoire, et d'autre part d'évaluer leurs conséquences sur les autres types cellulaires, notamment les oligodendrocytes et les neurones. En effet, plusieurs études ont rapporté une démyélinisation consécutive au TC (Mierzwa et al., 2015) corrélée à la mort des OL (Taib

et al., 2017), qui pourrait être due au phénotype M1, comme rapporté par les études *in vitro* (Hu et al., 2012). En combinant l'analyse de l'inhibition des différents phénotypes microgliaux avec l'étude de la mort des OL, de la démyélinisation et de la mort neuronale, nous pourrons confirmer *in vivo* l'hypothèse de l'implication du phénotype microglial pro-inflammatoire dans ces trois phénomènes.

Par ailleurs, un marqueur tel que décrit précédemment, spécifique de l'un ou l'autre des phénotypes d'activation, permettrait de mieux comprendre le mécanisme d'activation microgliale sous-jacent à la phagocytose des débris de myéline. Nos travaux d'IHC sont les premiers à objectiver la phagocytose des débris de myéline par la microglie *in vivo* suite à un TC. Cependant, ces marquages ne nous ont pas permis d'identifier le phénotype d'activation microgliale suite à la phagocytose des débris de myéline. L'amélioration de notre méthode d'analyse par CF et l'identification de marqueurs spécifiques des différents phénotypes d'activation nous permettront de confirmer *in vivo* les résultats du laboratoire obtenus par les Drs Mamma et Lerouet, qui ont mis en évidence une activité anti-inflammatoire des débris de myéline sur les microglies. Le mécanisme anti-inflammatoire impliquant la phagocytose des débris de myéline pourrait ainsi représenter une cible thérapeutique de choix dans la modulation de l'activation microgliale et *in fine* dans la diminution des LSB post-traumatiques.

En conclusion, l'ensemble de ce travail a permis de mettre en évidence le manque de spécificité de TSPO pour la microglie, malgré sa large utilisation comme marqueur de référence depuis plusieurs années, ainsi que l'inefficacité de la TEP pour le suivi de la NI d'origine microgliale à l'heure actuelle, dans notre modèle. Cependant, ces travaux nous auront permis (1) de mettre en évidence la phagocytose des débris de myéline par la microglie après un TC, et (2) de mettre au point une méthode d'analyse cellulaire qui nous permettra, à l'avenir, une identification cellulaire précise, notamment des phénotypes d'activation microgliaux, *in vivo*. Cette méthode ouvrira ainsi la possibilité d'évaluer avec précision l'efficacité des méthodes de modulation des différents phénotypes microgliaux, première étape d'évaluation des stratégies thérapeutiques ciblant la microglie pour réduire les LSB et conséquences neurocomportemantales post-traumatiques.

BIBLIOGRAPHIE

Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 41–53.

Adrian H, Mårten K, Salla N, Lasse V. (2016). Biomarkers of traumatic brain injury: temporal changes in body fluids. *eNeuro,* 3.

Ahmad R, Koole M, Evens N, Serdons K, Verbruggen A, Bormans G, Van Laere K. (2013). Whole-body biodistribution and radiation dosimetry of the cannabinoid type 2 receptor ligand [11C]-NE40 in Healthy Subjects. *Mol. Imaging Biol.,* 15: 384–390.

Aïd S & Bosetti F. (2011). Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation: therapeutic implications. *Biochimie,* 93: 46–51.

Ajao DO, Pop V, Kamper JE, Adami A, Rudobeck E, Huang L, Vlkolinsky R, Hartman RE, Ashwal S, Obenaus A, Badaut J. (2012). Traumatic brain injury in young rats leads to progressive behavioral deficits coincident with altered tissue properties in adulthood. *J. Neurotrauma,* 29: 2060–2074.

Albrecht DS, Granziera C, Hooker JM, Loggia ML. (2016). In vivo imaging of human neuroinflammation. *ACS Chem. Neurosci.,* 7: 470–83.

Algattas H & Huang JH. (2014). Traumatic brain injury pathophysiology and treatments: early, intermediate, and late phases post-injury. *Int. J. Mol. Sci.*, 15(1): 309-41.

Altar CA & Baudry M. (1990). Systemic injection of kainic acid: gliosis in olfactory and limbic brain regions quantified with [3H]PK 11195 binding autoradiography. *Exp. Neurol.,* 109: 333–41.

Armstrong RC, Mierzwa AJ, Marion CM, Sullivan GM. (2016). White matter involvement after TBI: clues to axon and myelin repair capacity. *Exp. Neurol.,* 275: 328–333.

Aungst SL, Kabadi S V, Thompson SM, Stoica BA, Faden AI. (2014). Repeated mild traumatic brain injury causes chronic neuroinflammation, changes in hippocampal synaptic plasticity, and associated cognitive deficits. *J. Cereb. Blood Flow Metab.,* 34: 1223–1232.

Azevedo FAC, Carvalho LRB, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti REL, Leite REP, Filho WJ, Lent R, Herculano-Houzel S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.,* 513: 532–541.

Babikian T, Alger JR, Ellis-Blied MU, Giza CC, Dennis E, Olsen A, Mink R, Babbitt C, Johnson J, Thompson PM, Asarnow RF. (2018). Whole brain magnetic resonance spectroscopic determinants of functional outcomes in pediatric moderate/severe traumatic brain injury. *J. Neurotrauma,* 35: 1637–1645.

Baer AS, Syed YA, Kang SU, Mitteregger D, Vig R, ffrench-Constant C, Franklin RJM, Altmann F, Lubec G, Kotter MR. (2009). Myelin-mediated inhibition of oligodendrocyte precursor differentiation can be overcome by pharmacological modulation of Fyn-RhoA and protein kinase C signalling. *Brain,* 132: 465–481.

Banati RB, Myers R, Kreutzberg GW. (1997). PK ('peripheral benzodiazepine') – binding sites in the CNS indicate early and discrete brain lesions: microautoradiographic detection of [3H]PK 11195 binding to activated microglia. *J. Neurocytol.,* 26: 77–82.

Banati RB, Newcombe J, Gunn RN, Cagnin A, Turkheimer F, Heppner F, Price G, Wegner F, Giovannoni G, Miller DH, Perkin GD, Smith T, Hewson AK, Bydder G, Kreutzberg GW, Jones T, Cuzner ML, Myers R. (2000). The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis. *Brain,* 123: 2321–2337.

Banjara M & Ghosh C. (2017). Sterile neuroinflamation and strategies for therapeutic intervention. *Int. J. Inflam.,* ID 8385961.

Bartnik-Olson BL, Holshouser B, Wang H, Grube M, Tong K, Wong V, Ashwal S. (2014). Impaired neurovascular unit function contributes to persistent symptoms after concussion: a pilot study. *J. Neurotrauma,* 31: 1497–1506.

Becher B & Antel JP. (1996). Comparison of phenotypic and functional properties of immediately ex vivo and cultured human adult microglia. *Glia,* 18: 1–10.

Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. (1986). Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17: 472–476.

Bellander BM, Singhrao SK, Ohlsson M, Mattsson P, Svensson M. (2001). Complement activation in the human brain after traumatic head injury. *J Neurotrauma*, 18: 1295-1311.

Benito C, Tolón RM, Pazos MR, Núñez E, Castillo AI, Romero J. (2008). Cannabinoid CB_2 receptors in human brain inflammation. *Br. J. Pharmacol.,* 153: 277–285.

Bennett RE & Brody DL. (2014). Acute reduction of microglia does not alter axonal injury in a mouse model of repetitive concussive traumatic brain injury. *J. Neurotrauma.,* 31: 1647–1663.

Bennett ML, Bennett FC, Liddelow SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, Mulinyawe SB, Bohlen CJ, Adil A, Tucker A, Weissman IL, Chang EF, Li G, Grant GA, Hayden Gephart MG, Barres BA. (2016). New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* 113: E1738–E1746.

Berger RP & Kochanek PM. (2006). Urinary S100B concentrations are increased after brain injury in children: a preliminary study. *Pediatr. Crit. Care Med.,* 7: 557–561.

Bergold PJ. (2016). Treatment of traumatic brain injury with anti-inflammatory drugs. *Exp. Neurol.,* 275: 367–380.

Besson VC. (2009). Drug targets for traumatic brain injury from poly(ADP-ribose)polymerase pathway modulation. *Br. J. Pharmacol*., 157(5): 695-704.

Best L, Ghadery C, Pavese N, Tai YF, Strafella AP. (2019). New and old TSPO PET radioligands for imaging brain microglial activation in neurodegenerative disease. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.,* 19: 24.

Bey T & Ostick B. (2009). Second impact syndrome. *West. J. Emerg. Med.,* 10: 6–10.

Bigler ED, Abildskov TJ, Petrie J, Farrer TJ, Dennis M, Simic N, Taylor HG, Rubin KH, Vannatta K, Gerhardt CA, Stancin T, Owen Yeates K. (2013). Heterogeneity of brain lesions in pediatric traumatic brain injury. *Neuropsychology,* 27: 438–451.

Bitsch A, Bruhn H, Vougioukas V, Stringaris A, Lassmann H, Frahm J, Brück W. (1999). Inflammatory CNS demyelination: histopathologic correlation with in vivo quantitative proton MR spectroscopy. *AJNR. Am. J. Neuroradiol.,* 20: 1619–27.

Björk L, Leifsdottir K, Saha S, Herlenius E. (2013). PGE $_2$ - metabolite levels in CSF correlate to HIE score and outcome after perinatal asphyxia. *Acta Paediatr.,* 102.

Blennow K, Hardy J, Zetterberg H. (2012). The neuropathology and neurobiology of traumatic brain injury. *Neuron*., 76: 886-899.

Blennow K, Brody DL, Kochanek PM, Levin H, McKee A, Ribbers GM, Yaffe K, Zetterberg H. (2016). Traumatic brain injuries. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2: 16084.

Block ML, Zecca L, Hong JS. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.,* 8: 57–69.

Boutin H & Pinborg LH. (2015). TSPO imaging in stroke: from animal models to human subjects. *Clin. Transl. Imaging,* 3: 423–435.

Boven LA, Van Meurs M, Van Zwam M, Wierenga-Wolf A, Hintzen RQ, Boot RG, Aerts JM, Amor S, Nieuwenhuis EE, Laman JD. (2006). Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. *Brain*, 129: 517–26.

Bradl M & Lassmann H. (2010). Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.,* 119: 37–53.

Braestrup C, Albrechtsen R, Squires Rf. (1977). High densities of benzodiazepine receptors in human cortical areas. *Nature,* 269: 702–704.

Brand A, Richter-Landsberg C, Leibfritz D. (1993). Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of glial and neuronal cells. *Dev. Neurosci.,* 15: 289–298.

Brazinova A, Rehorcikova V, Taylor MS, Buckova V, Majdan M, Psota M, Peeters W, Feigin V, Theadom A, Holkovic L, Synnot A. (2018). Epidemiology of traumatic brain injury in Europe: a living systematic review. *J. Neurotrauma,* neu.2015.4126.

Bribes E, Carrière D, Goubet C, Galiègue S, Casellas P, Joêlle SL. (2004). Immunohistochemical assessment of the peripheral benzodiazepine receptor in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.,* 52: 19–28.

Brown GC & Neher JJ. (2014). Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat. Rev. Neurosci.,* 15: 209–216.

Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV. (2016). Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp. Neurol.*, 275: 305-315.

Burke JF, Stulc JL, Skolarus LE, Sears ED, Zahuranec DB, Morgenstern LB. (2013). Traumatic brain injury may be an independent risk factor for stroke. *Neurology.,* 81: 33–39.

Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, Martino G, Schwartz M. (2006). Microglia activated by IL-4 or IFN-γ differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.,* 31: 149–160.

Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, Koeglsperger T, Dake B, Wu PM, Doykan CE, Fanek Z, Liu L, Chen Z, Rothstein JD, Ransohoff RM, Gygi SP, Antel

JP, Weiner HL. (2014). Identification of a unique TGF-β–dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat. Neurosci.,* 17: 131–143.

Buttgereit A, Lelios I, Yu X, Vrohlings M, Krakoski NR, Gautier EL, Nishinakamura R, Becher B, Greter M. (2016). Sall1 is a transcriptional regulator defining microglia identity and function. *Nat. Immunol.,* 17: 1397–1406.

Cagnin A, Myers R, Gunn RN, Lawrence AD, Stevens T, Kreutzberg GW, Jones T, Banati RB. (2001a). In vivo visualization of activated glia by[11C] (R)-PK11195-PET following herpes encephalitis reveals projected neuronal damage beyond the primary focal lesion. *Brain,* 124: 2014–2027.

Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM, Gunn RN, Myers R, Turkheimer FE, Jones T, Banati RB. (2001b). In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet,* 358: 461–467.

Cantu RC. (1998). Second-impact syndrome. *Clin. Sports Med.,* 17: 37–44.

Cao T, Thomas TC, Ziebell JM, Pauly JR, Lifshitz J. (2012). Morphological and genetic activation of microglia after diffuse traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience,* 225: 65-75.

Cartwright PE, Perkins TG, Wilson SH, Weaver LK, Orrison WW. (2019). Analysis of magnetic resonance spectroscopy relative metabolite ratios in mild traumatic brain injury and normative controls. *Undersea Hyperb. Med.,* 46: 291–297.

Chaney A, Williams SR, Boutin H. (2019). In vivo molecular imaging of neuroinflammation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.,* 149: 438–451.

Chang L, Munsaka SM, Kraft-Terry S, Ernst T. (2013). Magnetic resonance spectroscopy to assess neuroinflammation and neuropathic pain. *J. Neuroimmune Pharmacol.,* 8: 576–93.

Chang KJ, Redmond SA, Chan JR. (2016). Remodeling myelination: implications for mechanisms of neural plasticity. *Nat. Neurosci.,* 19: 190–7.

Chauveau F, Boutin H, Van Camp N, Thominiaux C, Hantraye P, Rivron L, Marguet F, Castel MN, Rooney T, Benavides J, Dollé F, Tavitian B. (2011). In vivo imaging of neuroinflammation in the rodent brain with [11C]SSR180575, a novel indoleacetamide radioligand of the translocator protein (18 kDa). *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging,* 38: 509–514.

Chen Y & Swanson RA. (2003). Astrocytes and brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.,* 23: 137–149.

Chen H, Richard M, Sandler DP, Umbach DM, Kamel F. (2007). Head injury and amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Epidemiol.,* 166: 810–816.

Chen MK, Guilarte TR. (2008). Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol. Ther.* 118: 1–17.

Chen Q, Cichon J, Wang W, Qiu L, Lee SJR, Campbell NR, DeStefino N, Goard MJ, Fu Z, Yasuda R, Looger LL, Arenkiel BR, Gan WB, Feng G. (2012). Imaging neural activity using Thy1-GCaMP transgenic mice. *Neuron,* 76: 297–308.

Cheng G, Kong RH, Zhang LM, Zhang JN. (2012). Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. *Br. J. Pharmacol*., 167(4): 699-719.

Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J. Neuroinflammation.,* 11: 98.

Cherry JD, Tripodis Y, Alvarez VE, Huber B, Kiernan PT, Daneshvar DH, Mez J, Montenigro PH, Solomon TM, Alosco ML, Stern RA, McKee AC, Stein TD. (2016). Microglial neuroinflammation contributes to tau accumulation in chronic traumatic encephalopathy. *Acta Neuropathol. Commun.,* 4: 112.

Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, Oré MV, Celador IL, Josserand J, Degos V, Jacotot E, Hagberg H, Sävman K, Mallard C, Gressens P, Fleiss B. (2013). Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain. Behav. Immun.,* 32: 70–85.

Chiu WT, Kuo CY, Hung CC, Chen M. (2000). The effect of the Taiwan motorcycle helmet use law on head injuries. *Am. J. Public Health,* 90: 793–6.

Chiu IM, Morimoto ETA, Goodarzi H, Liao JT, O'Keeffe S, Phatnani HP, Muratet M, Carroll MC, Levy S, Tavazoie S, Myers RM, Maniatis T. (2013). A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell Rep.,* 4: 385–401.

Chiu CC, Liao YE, Yang LY, Wang JY, Tweedie D, Karnati HK, Greig NH, Wang JY. (2016). Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury*. J. Neurosci. Methods*, 272: 38-49.

Christensen J. (2012). Traumatic brain injury: risks of epilepsy and implications for medicolegal assessment. *Epilepsia,* 53: 43–47.

Clark DPQ, Perreau VM, Shultz SR, Brady RD, Lei E, Dixit S, Taylor JM, Beart PM, Boon WC. (2019). Inflammation in traumatic brain injury: roles for toxic A1 astrocytes and microglial-astrocytic crosstalk. *Neurochem. Res.,* 44: 1410–1424.

Clarner T, Diederichs F, Berger K, Denecke B, Gan L, van der Valk P, Beyer C, Amor S, Kipp M. (2012). Myelin debris regulates inflammatory responses in an experimental demyelination animal model and multiple sclerosis lesions. *Glia,* 60: 1468–1480.

Clausen F, Marklund N, Lewén A, Enblad P, Basu S, Hillered L. (2012). Interstitial F(2)-isoprostane 8-iso-PGF(2α) as a biomarker of oxidative stress after severe human traumatic brain injury. *J. Neurotrauma,* 29: 766–75.

Colonna M & Butovsky O. (2017). Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annu. Rev. Immunol.,* 35: 441-468.

Colton CA. (2009). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J. Neuroimmune Pharmacol.,* 4: 399–418.

Coronado VG, McGuire LC, Sarmiento K, Bell J, Lionbarger MR, Jones CD, Geller AI, Khoury N, Xu L. (2012). Trends in traumatic brain injury in the U.S. and the public health response: 1995–2009. *J. Safety Res.,* 43: 299–307.

Corps KN, Roth TL, McGavern DB. (2015). Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury*. JAMA Neurol*., 72(3): 355-62.

Cosenza-Nashat M, Zhao ML, Suh HS, Morgan J, Natividad R, Morgello S, Lee SC. (2009). Expression of the translocator protein of 18 kDa by microglia, macrophages and astrocytes

based on immunohistochemical localization in abnormal human brain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.,* 35: 306–328.

Coughlin JM, Wang Y, Munro CA, Ma S, Yue C, Chen S, Airan R, Kim PK, Adams A V., Garcia C, Higgs C, Sair HI, Sawa A, Smith G, Lyketsos CG, Caffo B, Kassiou M, Guilarte TR, Pomper MG. (2015). Neuroinflammation and brain atrophy in former NFL players: an in vivo multimodal imaging pilot study. *Neurobiol. Dis.,* 74: 58–65.

Coughlin JM, Wang Y, Minn I, Bienko N, Ambinder EB, Xu X, Peters ME, Dougherty JW, Vranesic M, Koo SM, Ahn HH, Lee M, Cottrell C, Sair HI, Sawa A, Munro CA, Nowinski CJ, Dannals RF, Lyketsos CG, Kassiou M, Smith G, Caffo B, Mori S, Guilarte TR, Pomper MG. (2017). Imaging of glial cell activation and white matter integrity in brains of active and recently retired national football league players. *JAMA Neurol.,* 74: 67.

Csuka E, Morganti-Kossmann MC, Lenzlinger PM, Joller H, Trentz O, Kossmann T. (1999). IL-10 levels in cerebrospinal fluid and serum of patients with severe traumatic brain injury: relationship to IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1 and blood-brain barrier function. *J. Neuroimmunol.,* 101: 211–21.

Csuka E, Hans VH, Ammann E, Trentz O, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. (2000). Cell activation and inflammatory response following traumatic axonal injury in the rat. *Neuroreport.,* 11: 2587–90.

da Fonseca AC, Matias D, Garcia C, Amaral R, Geraldo LH, Freitas C, Lima FR. (2014). The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Front. Cell. Neurosci.,* 8: 362.

Dams-O'Connor K, Gibbons LE, Bowen JD, McCurry SM, Larson EB, Crane PK. (2013). Risk for late-life re-injury, dementia and death among individuals with traumatic brain injury: a population-based study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry,* 84: 177–182.

David S & Kroner A. (2011). Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci.,* 12: 388–99.

Deininger MH & Schluesener HJ. (1999). Cyclooxygenases-1 and -2 are differentially localized to microglia and endothelium in rat EAE and glioma. *J. Neuroimmunol.,* 95: 202–208.

Dennis EL, Jin Y, Villalon-Reina JE, Zhan L, Kernan CL, Babikian T, Mink RB, Babbitt CJ, Johnson JL, Giza CC, Thompson PM, Asarnow RF. (2015). White matter disruption in moderate/severe pediatric traumatic brain injury: advanced tract-based analyses. *NeuroImage Clin.,* 7: 493–505.

Dent KA, Christie KJ, Bye N, Basrai HS, Turbic A, Habgood M, Cate HS, Turnley AM. (2015). Oligodendrocyte birth and death following traumatic brain injury in adult mice. *PLoS One.,* 10: e0121541.

Donat CK, Scott G, Gentleman SM, Sastre M. (2017). Microglial activation in traumatic brain injury. *Front. Aging Neurosci.,* 9: 208.

Donovan V, Kim C, Anugerah AK, Coats JS, Oyoyo U, Pardo AC, Obenaus A. (2014). Repeated mild traumatic brain injury results in long-term white-matter disruption. *J. Cereb. Blood Flow Metab.,* 34: 715–23.

Dubbelaar ML, Kracht L, Eggen BJL, Boddeke EWGM. (2018). The kaleidoscope of microglial phenotypes. *Front. Immunol.,* 9: 1753.

Edinger AL & Thompson CB. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell. Biol*., 16(6): 663-9.

Edison P, Archer HA, Gerhard A, Hinz R, Pavese N, Turkheimer FE, Hammers A, Tai YF, Fox N, Kennedy A, Rossor M, Brooks DJ. (2008). Microglia, amyloid, and cognition in Alzheimer's disease: An [11C](R)PK11195-PET and [11C]PIB-PET study. *Neurobiol. Dis.,* 32: 412–419.

Ekdahl CT, Claasen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. (2003). Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* 100: 13632–7.

Enriquez P & Bullock R. (2004). Molecular and cellular mechanisms in the pathophysiology of severe head injury. *Curr. Pharm. Des*., 10: 2131-2143.

Esposito G, Giovacchini G, Liow JS, Bhattacharjee AK, Greenstein D, Schapiro M, Hallett M, Herscovitch P, Eckelman WC, Carson RE, Rapoport SI. (2008). Imaging neuroinflammation in Alzheimer's Disease with radiolabeled arachidonic acid and PET. *J. Nucl. Med.,* 49: 1414–1421.

Faden AI & Loane DJ. (2015). Chronic neurodegeneration after traumatic brain injury: Alzheimer Disease, chronic traumatic encephalopathy, or persistent neuroinflammation? *Neurotherapeutics,* 12: 143–150.

Faden AI, Wu J, Stoica BA, Loane DJ. (2016). Progressive inflammation-mediated neurodegeneration after traumatic brain or spinal cord injury. *Br. J. Pharmacol.,* 173: 681–691.

Febinger HY, Thomasy HE, Pavlova MN, Ringgold KM, Barf PR, George AM, Grillo JN, Bachstetter AD, Garcia JA, Cardona AE, Opp MR, Gemma C. (2015). Time-dependent effects of CX3CR1 in a mouse model of mild traumatic brain injury. *J. Neuroinflammation,* 12: 154.

Feigin VL, Theadom A, Barker-Collo S, Starkey NJ, McPherson K, Kahan M, Dowell A, Brown P, Parag V, Kydd R, Jones K, Jones A, Ameratunga S, BIONIC Study Group. (2013). Incidence of traumatic brain injury in New Zealand: a population-based study. *Lancet Neurol.,* 12: 53–64.

Finnie JW. (2013). Neuroinflammation: beneficial and detrimental effects after traumatic brain injury. *Inflammopharmacology*, 21: 309-320.

Fisher SK, Novak JE, Agranoff BW. (2002). Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *J. Neurochem.,* 82: 736–754.

Fleminger S, Oliver DL, Lovestone S, Rabe-Hesketh S, Giora A. (2003). Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease: the evidence 10 years on; a partial replication. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry,* 74: 857–862.

Flygt J, Djupsjö A, Lenne F, Marklund N. (2013). Myelin loss and oligodendrocyte pathology in white matter tracts following traumatic brain injury in the rat. *Eur. J. Neurosci.,* 38: 2153–65.

Flygt J, Gumucio A, Ingelsson M, Skoglund K, Holm J, Alafuzoff I, Marklund N. (2016). Human Traumatic Brain Injury Results in Oligodendrocyte Death and Increases the Number of Oligodendrocyte Progenitor Cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.,* 75: 503–515.

Folkersma H, Boellaard R, Yaqub M, Kloet RW, Windhorst AD, Lammertsma AA, Vandertop WP, van Berckel BNM. (2011). Widespread and prolonged increase in (R)-11C-PK11195 binding after traumatic brain injury. *J. Nucl. Med.,* 52: 1235–1239.

Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF, Sedgwick JD. (1995). Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting.

Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950),* 154: 4309–21.

Foy CML, Daly EM, Glover A, O'Gorman R, Simmons A, Murphy DGM, Lovestone S. (2011). Hippocampal Proton MR Spectroscopy in Early Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *Brain Topogr.,* 24: 316–322.

Galanaud D, Nicoli F, Confort-Gouny S, Fur Y Le, Dormont D, Girard N, Ranjeva J, Cozzone P. (2008). Spectroscopie par résonnance magnétique cérébrale. *Journal de radiologie,* 88 : 483-496

Galiegue S, Tinel N, Casellas P. (2003). The peripheral benzodiazepine receptor: a promising therapeutic drug target. *Curr. Med. Chem.,* 10: 1563–1572.

Gallager DW, Mallorga P, Oertel W, Henneberry R, Tallman J. (1981). [3H]Diazepam binding in mammalian central nervous system: a pharmacological characterization. *J. Neurosci.,* 1: 218–25.

Garden GA & Campbell BM. (2016). Glial biomarkers in human central nervous system disease. *Glia,* 64: 1755–1771.

Gardner RC, Burke JF, Nettiksimmons J, Goldman S, Tanner CM, Yaffe K. (2015). Traumatic brain injury in later life increases risk for Parkinson disease. *Ann. Neurol.,* 77: 987–995.

Gardner RC & Yaffe K. (2015). Epidemiology of mild traumatic brain injury and neurodegenerative disease. *Mol. Cell. Neurosci.,* 66: 75–80.

Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, Helft J, Chow A, Elpek KG, Gordonov S, Mazloom AR, Ma'ayan A, Chua WJ, Hansen TH, Turley SJ, Merad M, Randolph GJ, Consortium the IG, Gautier EL, Jakubzick C, Randolph GJ, Best AJ, Knell J, Goldrath A, Miller J, Brown B, Merad M, Jojic V, Koller D, Cohen N, Brennan P, Brenner M, Shay T, Regev A, Fletcher A, Elpek K, Bellemare-Pelletier A, Malhotra D, Turley S, Jianu R, Laidlaw D, Collins J, Narayan K, Sylvia K, Kang J, Gazit R, Garrison BS, Rossi DJ, Kim F, Rao TN, Wagers A, Shinton SA, Hardy RR, Monach P, Bezman NA, Sun JC, Kim CC, Lanier LL, Heng T, Kreslavsky T, Painter M, Ericson J, Davis S, Mathis D, Benoist C. (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.,* 13: 1118–1128.

Gavett BE, Cantu RC, Shenton M, Lin AP, Nowinski CJ, McKee AC, Stern RA. (2011). Clinical appraisal of chronic traumatic encephalopathy: current perspectives and future directions. *Curr. Opin. Neurol.,* 24: 525–31.

Gavish M, Bachman I, Shoukrun R, Katz Y, Veenman L, Weisinger G, Weizman A. (1999). Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacol. Rev.,* 51: 629–50.

Geeraerts T, Velly L, Abdennour L, Asehnoune K, Audibert G, Bouzat P, Bruder N, Carrillon R, Cottenceau V, Cotton F, Courtil-Teyssedre S, Dahyot-Fizelier C, Dailler F, David JS, Engrand N, Fletcher D, Francony G, Gergelé L, Ichai C, Javouhey É, Leblanc PE, Lieutaud T, Meyer P, Mirek S, Orliaguet G, Proust F, Quintard H, Ract C, Srairi M, Tazarourte K, Vigué B, Payen JF, French Society of Anaesthesia, Intensive Care Medicine, in partnership with Association de neuro-anesthésie-réanimation de langue française (Anarlf), French Society of Emergency Medicine (Société Française de Médecine d'urgence (SFMU), Société française de neurochirurgie (SFN), Groupe francophone de réanimation et d'urgences pédiatriques (GFRUP), Association des anesthésistes-réanimateurs pédiatriques d'expression française

(Adarpef). (2018). Management of severe traumatic brain injury (first 24 hours). *Anaesth. Crit. Care Pain Med.,* 37: 171–186.

Gehlert DR, Stephenson DT, Schober DA, Rash K, Clemens JA. (1997). Increased expression of peripheral benzodiazepine receptors in the facial nucleus following motor neuron axotomy. *Neurochem. Int.,* 31: 705–13.

Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, Eggert K, Oertel W, Banati RB, Brooks DJ. (2006). In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.,* 21: 404–412.

Geoffroy CG & Zheng B. (2014). Myelin-associated inhibitors in axonal growth after CNS injury. *Curr. Opin. Neurobiol.,* 27: 31–38.

Gibbons HM & Dragunow M. (2006). Microglia induce neural cell death via a proximity-dependent mechanism involving nitric oxide. *Brain Res.,* 1084: 1–15.

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science,* 330: 841–845.

Girard S, Brough D, Lopez-Castejon G, Giles J, Rothwell NJ, Allan SM. (2013). Microglia and macrophages differentially modulate cell death after brain injury caused by oxygen-glucose deprivation in organotypic brain slices. *Glia,* 61: 813–24.

Giunta B, Obregon D, Velisetty R, Sanberg PR, Borlongan C V, Tan J. (2012). The immunology of traumatic brain injury: a prime target for Alzheimer's disease prevention. *J. Neuroinflammation,* 9: 678.

Goerres GW, Revesz T, Duncan J, Banati RB. (2001). Imaging cerebral vasculitis in refractory epilepsy using [^{11}C](*R*)-PK11195 positron emission tomography. *Am. J. Roentgenol.,* 176: 1016–1018.

Gorina R, Font-Nieves M, Márquez-Kisinousky L, Santalucia T, Planas AM. (2011). Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFκB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia,* 59: 242–255.

Gosselin D, Link VM, Romanoski CE, Fonseca GJ, Eichenfield DZ, Spann NJ, Stender JD, Chun HB, Garner H, Geissmann F, Glass CK. (2014). Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell,* 159: 1327–1340.

Govind V, Gold S, Kaliannan K, Saigal G, Falcone S, Arheart KL, Harris L, Jagid J, Maudsley AA. (2010). Whole-brain proton mr spectroscopic imaging of mild-to-moderate traumatic brain injury and correlation with neuropsychological deficits. *J. Neurotrauma,* 27: 483–496.

Green REA, Colella B, Maller JJ, Bayley M, Glazer J, Mikulis DJ. (2014). Scale and pattern of atrophy in the chronic stages of moderate-severe TBI. *Front. Hum. Neurosci.,* 8: 67.

Greter M, Lelios I, Croxford AL. (2015). Microglia versus myeloid cell nomenclature during brain inflammation. *Front. Immunol.,* 6: 249.

Greve MW & Zink BJ. (2009). Pathophysiology of traumatic brain injury. *Mt. Sinai. J. Med.,* 76(2): 97-104.

Gruber A, Rössler K, Graninger W, Donner A, Illievich MU, Czech T. (2000). Ventricular cerebrospinal fluid and serum concentrations of sTNFR-I, IL-1ra, and IL-6 after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg. Anesthesiol.,* 12: 297–306.

Gulyás B, Makkai B, Kása P, Gulya K, Bakota L, Várszegi S, Beliczai Z, Andersson J, Csiba L, Thiele A, Dyrks T, Suhara T, Suzuki K, Higuchi M, Halldin C. (2009). A comparative autoradiography study in post mortem whole hemisphere human brain slices taken from Alzheimer patients and age-matched controls using two radiolabelled DAA1106 analogues with high affinity to the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) system. *Neurochem. Int.,* 54: 28–36.

Hagan P, Poole S, Bristow AF, Tilders F, Silverstein FS. (1996). Intracerebral NMDA injection stimultes production of interleukine 1 beta in perinatal rat brain. *J. Neurochem.,* 67: 2215-2218.

Hall ED, Sullivan PG, Gibson TR, Pavel KM, Thompson BM, Scheff SW. (2005). Spatial and temporal characteristics of neurodegeneration after controlled cortical impact in mice: more than a focal brain injury. *J. Neurotrauma,* 22: 252–265.

Hammeke TA, McCrea M, Coats SM, Verber MD, Durgerian S, Flora K, Olsen GS, Leo PD, Gennarelli TA, Rao SM. (2013). Acute and subacute changes in neural activation during the recovery from sport-related concussion. *J. Int. Neuropsychol. Soc.,* 19: 863–72.

Hammoud DA, Endres CJ, Chander AR, Guilarte TR, Wong DF, Sacktor NC, McArthur JC, Pomper MG. (2005). Imaging glial cell activation with [^{11}C]-*R*-PK11195 in patients with AIDS. *J. Neurovirol.,* 11: 346–355.

Harris NG, Verley DR, Gutman BA, Sutton RL. (2016). Bi-directional changes in fractional anisotropy after experiment TBI: disorganization and reorganization? *Neuroimage,* 133: 129–143.

Hay J, Johnson VE, Smith DH, Stewart W. (2016). Chronic Traumatic Encephalopathy: The Neuropathological Legacy of Traumatic Brain Injury. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.,* 11: 21–45.

Hellal F, Pruneau D, Palmier B, Faye P, Croci N, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C. (2003). Detrimental role of bradykinin B_2 receptor in a murine model of diffuse brain injury. *J. Neurotrauma,* 20: 841–851.

Helmy A, De Simoni MG, Guilfoyle MR, Carpenter KL, Hutchinson PJ. (2011). Cytokines and innate inflammation in the pathogenesis of human traumatic brain injury. *Prog. Neurobiol.,* 95: 352-372.

Hendrickx DAE, van Eden CG, Schuurman KG, Hamann J, Huitinga I. (2017). Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *J. Neuroimmunol.,* 309: 12–22.

Herranz E, Giannì C, Louapre C, Treaba CA, Govindarajan ST, Ouellette R, Loggia ML, Sloane JA, Madigan N, Izquierdo-Garcia D, Ward N, Mangeat G, Granberg T, Klawiter EC, Catana C, Hooker JM, Taylor N, Ionete C, Kinkel RP, Mainero C. (2016). Neuroinflammatory component of gray matter pathology in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.,* 80: 776–790.

Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK, Borowsky ML, Wang L chong, Means TK, El Khoury J. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat. Neurosci.,* 16: 1896–1905.

Hill CS, Coleman MP, Menon DK. (2016). Traumatic axonal injury: mechanisms and translational opportunities. *Trends Neurosci*., 39(5): 311-24.

Hillmer AT, Holden D, Fowles K, Nabulsi N, West BL, Carson RE, Cosgrove KP. (2017). Microglial depletion and activation: A [^{11}C]PBR28 PET study in nonhuman primates. *EJNMMI Res.,* 7: 59.

Holshouser B, Pivonka-Jones J, Nichols JG, Oyoyo U, Tong K, Ghosh N, Ashwal S. (2019). Longitudinal metabolite changes after traumatic brain injury: a prospective pediatric magnetic resonance spectroscopic imaging study. *J. Neurotrauma,* 36: 1352–1360.

Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, Gao Y, Chen J. (2012). Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke,* 43: 3063–70.

Hu Y, Yu SY, Zuo LJ, Cao CJ, Wang F, Chen ZJ, Du Y, Lian TH, Wang YJ, Chan P, Chen SD, Wang XM, Zhang W. (2015). Parkinson disease with REM sleep behavior disorder: Features, -synuclein, and inflammation. *Neurology,* 84: 888–894.

Hughes JP, Hatcher JP, Chessell IP. The role of P2X7 in pain and inflammation. *Purinergic Signal*., 2007;3(1-2):163-169.

Imaizumi M, Kim HJ, Zoghbi SS, Briard E, Hong J, Musachio JL, Ruetzler C, Chuang DM, Pike VW, Innis RB, Fujita M. (2007). PET imaging with [11C]PBR28 can localize and quantify upregulated peripheral benzodiazepine receptors associated with cerebral ischemia in rat. *Neurosci. Lett.,* 411: 200–205.

Israelsson C, Flygt J, Åstrand E, Kiwanuka O, Bengtsson H, Marklund N. (2014). Altered expression of myelin-associated inhibitors and their receptors after traumatic brain injury in the mouse. *Restor. Neurol. Neurosci.,* 32: 717–731.

Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research,* 57: 1–9.

Jacobs AH, Tavitian B, consortium the Inm. (2012). Noninvasive Molecular Imaging of Neuroinflammation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.,* 32: 1393–1415.

Jafari S, Etminan M, Aminzadeh F, Samii A. (2013). Head injury and risk of Parkinson disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.,* 28: 1222–1229.

Jander S, Schroeter M, Stoll G. (2000). Role of NMDA receptor signaling in the regulation of inflammatory gene expression after focal brain ischemia. *J. Neuroimmunol.,* 109: 181–7.

Jeon SB, Yoon HJ, Park SH, Kim IH, Park EJ. (2008). Sulfatide, a major lipid component of myelin sheath, activates inflammatory responses as an endogenous stimulator in brain-resident immune cells. *J. Immunol.,* 181: 8077–87.

Jin X, Ishii H, Bai Z, Itokazu T, Yamashita T. (2012). Temporal changes in cell marker expression and cellular infiltration in a controlled cortical impact model in adult male C57BL/6 mice. *PLoS One,* 7: e41892.

Johnson VE, Stewart W, Smith DH. (2012). Widespread tau and amyloid-beta pathology many years after a single traumatic brain injury in humans. *Brain Pathol.,* 22: 142–149.

Johnson VE, Stewart JE, Begbie FD, Trojanowski JQ, Smith DH, Stewart W. (2013a). Inflammation and white matter degeneration persist for year after a single traumatic brain injury. *Brain*, 136: 28-42.

Johnson VE, Stewart W, Smith DH. (2013b). Axonal pathology in traumatic brain injury. *Exp. Neurol.*, 246: 35-43.

Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. (2016). The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury*. Br. J. Pharmacol.*, 173(4): 692-702.

Kaur P & Sharma S. (2017). Recent advances in pathophysiology of traumatic brain injury. *Curr. Neuropharmacol*., 16(8): 1224-1238

Kelley BJ, Lifshitz J, Povlishock JT. (2007). Neuroinflammatory responses after experimental diffuse traumatic brain injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.,* 66: 989–1001.

Kenne E, Erlandsson A, Lindbom L, Hillered L, Clausen F. (2012). Neutrophil depletion reduces edema formation and tissue loss following traumatic brain injury in mice. *J. Neuroinflammation,* 9: 17.

Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. (2009). Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J. Neurosci.,* 29: 13435–13444.

Kim CC, Nakamura MC, Hsieh CL. (2016). Brain trauma elicits non-canonical macrophage activation states. *J. Neuroinflammation,* 13: 117.

Kinnunen KM, Greenwood R, Powell JH, Leech R, Hawkins PC, Bonnelle V, Patel MC, Counsell SJ, Sharp DJ. (2011). White matter damage and cognitive impairment after traumatic brain injury. *Brain* 134: 449–463.

Kochanek P, Jackson T, Ferguson N, Carlson S, Simon D, Brockman E, Ji J, Bayır H, Poloyac S, Wagner A, Kline A, Empey P, Clark R, Jackson E, Dixon C. (2015). emerging therapies in traumatic brain injury. *Semin. Neurol.,* 35: 083–100.

Koh JO, Cassidy JD, Watkinson EJ. 2003. «Incidence of concussion in contact sports: a systematic review of the evidence ». *Brain Inj*., 17(10):901-17.

Konishi H, Kobayashi M, Kunisawa T, Imai K, Sayo A, Malissen B, Crocker PR, Sato K, Kiyama H. (2017). Siglec-H is a microglia-specific marker that discriminates microglia from CNS-associated macrophages and CNS-infiltrating monocytes. *Glia,* 65: 1927–1943.

Kornguth S & Rutledge N. (2018). Integration of biomarkers into a signature profile of persistent traumatic brain injury involving autoimmune processes following water hammer injury from repetitive head impacts. *Biomark. Insights,* 13: 1177271918808216.

Koshinaga M, Katayama Y, Fukushima M, Oshima H, Suma T, Takahata T. (2000). Rapid and widespread microglial activation induced by traumatic brain injury in rat brain slices. *J. Neurotrauma,* 17: 185–192.

Kossmann T, Hans VH, Imhof HG, Stocker R, Grob P, Trentz O, Morganti-Kossmann C. (1995). Intrathecal and serum interleukin-6 and the acute-phase response in patients with severe traumatic brain injuries. *Shock,* 4: 311–7.

Kreisl WC, Jenko KJ, Hines CS, Lyoo CH, Corona W, Morse CL, Zoghbi SS, Hyde T, Kleinman JE, Pike VW, McMahon FJ, Innis RB, Biomarkers Consortium PET Radioligand Project Team. (2013). A genetic polymorphism for translocator protein 18 Kda affects both *in vitro* and *in vivo* radioligand binding in human brain to this putative biomarker of neuroinflammation. *J. Cereb., Blood Flow Metab.,* 33: 53–58.

Kroner A, Greenhalgh AD, Zarruk JG, Passos dos Santos R, Gaestel M, David S. (2014). TNF and increased intracellular iron alter macrophage polarization to a detrimental M1 phenotype in the injured spinal cord. *Neuron,* 83: 1098–1116.

Kumar A & Loane DJ. (2012). Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav. Immun.,* 26: 1191–201.

Kumar A, Stoica BA, Sabirzhanov B, Burns MP, Faden AI, Loane DJ. (2013). Traumatic brain injury in aged animals increases lesion size and chronically alters microglial/macrophage classical and alternative activation states. *Neurobiol. Aging*, 34(5): 1397-411.

Kumar A, Alvarez-Croda D-M, Stoica BA, Faden AI, Loane DJ. (2016). Microglial/macrophage polarization dynamics following traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, 33(19): 1732-50.

Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H. (2005). Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain,* 128: 2705–2712.

Kwon BK, Stammers AMT, Belanger LM, Bernardo A, Chan D, Bishop CM, Slobogean GP, Zhang H, Umedaly H, Giffin M, Street J, Boyd MC, Paquette SJ, Fisher CG, Dvorak MF. (2010). Cerebrospinal fluid inflammatory cytokines and biomarkers of injury severity in acute human spinal cord injury. *J. Neurotrauma,* 27: 669–682.

Lacapère JJ, Papadopoulos V. (2003). Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids,* 68: 569–585.

Lagarrigue F, Kim C, Ginsberg MH. (2016). The Rap1-RIAM-talin axis of integrin activation and blood cell function. *Blood,* 128: 479–87.

Laitinen T, Sierra A, Bolkvadze T, Pitkänen A, Gröhn O. (2015). Diffusion tensor imaging detects chronic microstructural changes in white and gray matter after traumatic brain injury in rat. *Front. Neurosci.,* 9: 128.

Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, David E, Keren-Shaul H, Merad M, Jung S, Amit I. (2014). Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell,* 159: 1312–1326.

Leconte C, Tixier E, Freret T, Toutain J, Saulnier R, Boulouard M, Roussel S, Schumann-Bard P, Bernaudin M. (2009). Delayed hypoxic postconditioning protects against cerebral ischemia in the mouse. *Stroke* 40: 3349–3355.

Lehman EJ, Hein MJ, Baron SL, Gersic CM. (2012). Neurodegenerative causes of death among retired National Football League players. *Neurology,* 79: 1970–1974.

Li W, Risacher SL, McAllister TW, Saykin AJ. (2016). Traumatic brain injury and age at onset of cognitive impairment in older adults. *J. Neurol.,* 263: 1280–1285.

Li Q, Lan X, Han X, Wang J. (2018). Expression of Tmem119/Sall1 and Ccr2/CD69 in FACS-sorted microglia- and Monocyte/Macrophage-enriched cell populations after intracerebral hemorrhage. *Front. Cell. Neurosci.,* 12: 520.

Liu Y, Hao W, Letiembre M, Walter S, Kulanga M, Neumann H, Fassbender K. (2006). Suppression of microglial inflammatory activity by myelin phagocytosis: role of p47-PHOX-mediated generation of reactive oxygen species. *J. Neurosci.,* 26: 12904–13.

Liu C, Cui G, Zhu M, Kang X, Guo H. (2014). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.,* 7: 8342–55.

Liao Y, Liu P, Guo F, Zhang ZY, Zhang Z. (2013). Oxidative burst of circulating neutrophils following traumatic brain injury in human. *PLoS One,* 8: e68963.

Liao CC, Chou YC, Yeh CC, Hu CJ, Chiu WT, Chen TL. (2014). Stroke risk and outcomes in patients with traumatic brain injury: 2 nationwide studies. *Mayo Clin. Proc.,* 89: 163–172.

Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung WS, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature,* 541: 481–487.

Ling H, Hardy J, Zetterberg H. Neurological consequences of traumatic brain injuries in sports. *Mol. Cell. Neurosci*., 2015;66(Pt B):114-122.

Loane DJ, Kumar A, Stoica BA, Cabatbat R, Faden AI. (2014). Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma: association with chronic microglial activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 73(1): 14-29.

Loane DJ & Kumar.A. (2016). Microglia in the TBI brain: the good, the bad, and the dysregulated. *Exp. Neurol.*, 275: 316-327.

Lopez-Rodriguez AB, Acaz-Fonseca E, Viveros MP, Garcia-Segura LM. (2015). Changes in cannabinoid receptors, aquaporin 4 and vimentin expression after traumatic brain injury in adolescent male mice. association with edema and neurological deficit. *PLoS One,* 10: e0128782.

Lotocki G, Vaccari J de R, Alonso O, Molano JS, Nixon R, Safavi P, Dietrich WD, Bramlett HM, Bramlett HM. (2011). Oligodendrocyte vulnerability following traumatic brain injury in rats. *Neurosci. Lett.,* 499: 143–148.

Lozano D, Gonzales-Portillo G.S, Acosta S, de la Pena I, Tajiri N, Kaneko Y, Borlongan CV. (2015). Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: etiology, clinical consequences, and therapeutic opportunities. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.,* 11: 97-106.

Luo XG & Chen SD. (2012). The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. *Transl. Neurodegener.,* 1: 9.

Lyer SS, He Q, Janczy JR, Elliott EI, Zhong Z, Olivier AK, Sadler JJ, Knepper-Adrian V, Han R, Qiao L, Eisenbarth SC, Nauseef WM, Cassel SL, Sutterwala FS. (2013). Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity,* 39: 311-323.

Maas AI, Menon DK, Steyerberg EW, Citerio G, Lecky F, Manley GT, Hill S, Legrand V, Sorgner A, CENTER-TBI participants and investigators. (2015). Collaborative European NeuroTrauma Effectiveness Research in Traumatic Brain Injury (CENTER-TBI): a prospective longitudinal observational study. *Neurosurgery*, 76: 67-80.

Maas A.I.R, Menon DK, Adelson PD, Andelic N, Bell MJ, Belli A, Bragge P, Brazinova A, Büki A, Chesnut R.M, Citerio G, Coburn M, Cooper D.J, Crowder A.T, Czeiter E, Czosnyka M, Diaz-Arrastia R, Dreier J.P, Duhaime A.C, Ercole A, van Essen T.A, Feigin VL, Gao G, Giacino J, Gonzalez-Lara LE, Gruen RL, Gupta D, Hartings JA, Hill S, Jiang JY, Ketharanathan N, Kompanje EJO, Lanyon L, Laureys S, Lecky F, Levin H, Lingsma HF, Maegele M, Majdan M, Manley G, Marsteller J, Mascia L, McFadyen C, Mondello S, Newcombe V, Palotie A, Parizel PM, Peul W, Piercy J, Polinder S, Puybasset L, Rasmussen TE, Rossaint R, Smielewski P, Söderberg J, Stanworth SJ, Stein MB, von Steinbüchel N, Stewart W, Steyerberg EW, Stocchetti N, Synnot A, Te Ao B, Tenovuo O, Theadom A, Tibboel D, Videtta W, Wang KKW,

Williams WH, Wilson L, Yaffe K, InTBIR Participants and Investigators. (2017). Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol.*, 16: 987-1048.

Majdan M, Plancikova D, Brazinova A, Rusnak M, Nieboer D, Feigin V, Maas A. (2016). Epidemiology of traumatic brain injuries in Europe: a cross-sectional analysis. *Lancet Public Heal.,* 1: e76–e83.

Majdan M, Plancikova D, Maas A, Polinder S, Feigin V, Theadom A, Rusnak M, Brazinova A, Haagsma J. (2017). Years of life lost due to traumatic brain injury in Europe: a cross-sectional analysis of 16 countries. *PLOS Med.,* 14: e1002331.

Maki T, Liang AC, Miyamoto N, Lo EH, Arai K. (2013). Mechanisms of oligodendrocyte regeneration from ventricular-subventricular zone-derived progenitor cells in white matter diseases. *Front. Cell. Neurosci.,* 7: 275.

Makinde HM, Just TB, Cuda CM, Perlman H, Schwulst SJ. (2017). The role of microglia in the etiology and evolution of chronic traumatic encephalopathy. *Shock,* 48: 276–283.

Manson J, Thiemermann C, Brohi K. (2012). Trauma alarmins as activators of damage-induced inflammation. *Br. J. Surg.,* 99:12-20.

Martín A, Szczupak B, Gómez-Vallejo V, Domercq M, Cano A, Padro D, Muñoz C, Higuchi M, Matute C, Llop J. (2015). *In Vivo* PET imaging of the α4β2 nicotinic acetylcholine receptor as a marker for brain inflammation after cerebral ischemia. *J. Neurosci.,* 35: 5998–6009.

Martland HS. (1928). Punch drunk. *J. Am. Med. Assoc.,* 91: 1103.

Masel BE & DeWitt DS. (2010). Traumatic brain injury: a disease process, not an event. *J. Neurotrauma,* 27: 1529–1540.

Maudsley AA, Domenig C, Govind V, Darkazanli A, Studholme C, Arheart K, Bloomer C. (2009). Mapping of brain metabolite distributions by volumetric proton MR spectroscopic imaging (MRSI). *Magn. Reson. Med.,* 61: 548–559.

Nave KA. (2010). Myelination and the trophic support of long axons. *Nat. Rev. Neurosci.,* 11: 275–283.

Maxwell WL, MacKinnon MA, Stewart JE, Graham DI. (2010). Stereology of cerebral cortex after traumatic brain injury matched to the Glasgow outcome score. *Brain,* 133: 139–60.

Mayer CL, Huber BR, Peskind E. (2013). Traumatic brain injury, neuroinflammation, and post-traumatic headaches. *Headache,* 53(9): 1523-30.

McConeghy KW, Hatton J, Hughes L, Cook AM. (2012). A review of neuroprotection pharmacology and therapies in patients with acute traumatic brain injury. *CNS Drugs,* 26(7): 613-36.

McGeer PL & McGeer EG. (2002). Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve,* 26: 459–470.

McGinn MJ & Povlishock JT. (2016). Pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurosurg. Clin. N0 Am*., 27: 397-407.

McKee AC, Cantu RC, Nowinski CJ, Hedley-Whyte ET, Gavett BE, Budson AE, Santini VE, Lee HS, Kubilus CA, Stern RA. (2009). Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive tauopathy after repetitive head injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.,* 68: 709–735.

McKee AC, Stern RA, Nowinski CJ, Stein TD, Alvarez VE, Daneshvar DH, Lee HS, Wojtowicz SM, Hall G, Baugh CM, Riley DO, Kubilus CA, Cormier KA, Jacobs MA, Martin BR, Abraham CR, Ikezu T, Reichard RR, Wolozin BL, Budson AE, Goldstein LE, Kowall NW, Cantu RC. (2013). The spectrum of disease in chronic traumatic encephalopathy. *Brain,* 136: 43–64.

Mckee AC & Daneshvar DH. (2015). The neuropathology of traumatic brain injury. *Handb. Clin. Neurol.*, 127: 45-66.

McKinlay A, Grace RC, Horwood LJ, Fergusson DM, Ridder EM, MacFarlane MR. (2008). Prevalence of traumatic brain injury among children, adolescents and young adults: Prospective evidence from a birth cohort. *Brain Inj.,* 22: 175–181.

McMillan TM, Teasdale GM, Weir CJ, Stewart E. (2011). Death after head injury: the 13 year outcome of a case control study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry,* 82: 931–935.

McMillan TM, Weir CJ, Wainman-Lefley J. (2014). Mortality and morbidity 15 years after hospital admission with mild head injury: a prospective case-controlled population study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry,* 85: 1214–1220.

Menon DK, Schwab K, Wright DW, Maas AI. (2010). Demographics and clinical assessment working group of the international and interagency initiative toward common data elements for research on traumatic brain injury and psychological health*. Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 91(11): 1637-40.

Mez J, Daneshvar DH, Kiernan PT, Abdolmohammadi B, Alvarez VE, Huber BR, Alosco ML, Solomon TM, Nowinski CJ, McHale L, Cormier KA, Kubilus CA, Martin BM, Murphy L, Baugh CM, Montenigro PH, Chaisson CE, Tripodis Y, Kowall NW, Weuve J, McClean MD, Cantu RC, Goldstein LE, Katz DI, Stern RA, Stein TD, McKee AC. (2017). Clinicopathological evaluation of chronic traumatic encephalopathy in players of American football. *JAMA,* 318: 360.

Mierzwa AJ, Marion CM, Sullivan GM, McDaniel DP, Armstrong RC. (2015). Components of myelin damage and repair in the progression of white matter pathology after mild traumatic brain injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.,* 74: 218–32.

Miron VE, Boyd A, Zhao JW, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, van Wijngaarden P, Wagers AJ, Williams A, Franklin RJM, ffrench-Constant C. (2013). M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat. Neurosci.,* 16: 1211–1218.

Monje ML, Toda H, Palmer TD. (2003). Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science,* 302: 1760–5.

Morganti JM, Jopson TD, Liu S, Riparip LK, Guandique CK, Gupta N, Ferguson AR, Rosi S. (2015). CCR2 antagonism alters brain macrophage polarization and ameliorates cognitive dysfunction induced by traumatic brain injury. *J. Neurosci.,* 35: 748–60.

Morganti JM, Riparip LK, Rosi S. (2016). Call Off the Dog(ma): M1/M2 polarization is concurrent following traumatic brain injury. *PLoS One,* 11: e0148001.

Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T. (2002). Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr. Opin. Crit. Care,* 8: 101–5.

Morganti-Kossmann MC, Satgunaseelan L, Bye N, Kossmann T. (2007). Modulation of immune response by head injury. *Injury,* 38: 1392–400.

Morley WA. (2018). Environmental Subconcussive Injury, Axonal Injury, and Chronic Traumatic Encephalopathy. *Front. Neurol.*, 9: 166.

Narayanaswami V, Dahl K, Bernard-Gauthier V, Josephson L, Cumming P, Vasdev N. (2018). Emerging PET radiotracers and targets for imaging of neuroinflammation in neurodegenerative diseases: outlook beyond TSPO. *Mol. Imaging,* 17: 153601211879231.

Ni M & Aschner M. (2010). Neonatal rat primary microglia: isolation, culturing, and selected applications. *Current Protocols in Toxicology,* 12.17.1-12.17.16.

Nizamutdinov D & Shapiro LA. (2017). Overview of traumatic brain injury: an immunological context. *Brain Sci.*, 7: pii: E11.

Ojo JO, Mouzon B, Greenberg MB, Bachmeier C, Mullan M, Crawford F. (2013). Repetitive mild traumatic brain injury augments tau pathology and glial activation in aged hTau mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.,* 72: 137–151.

Organisation Mondiale de la Santé. (2006). Neurological disorders : public health challenges. *World Health Organization*.

Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br. J. Pharmacol.*, 173: 649–665.

Owen DR, Howell OW, Tang SP, Wells LA, Bennacef I, Bergstrom M, Gunn RN, Rabiner EA, Wilkins MR, Reynolds R, Matthews PM, Parker CA. (2010). Two binding sites for [^{3}H]PBR28 in human brain: implications for TSPO PET imaging of neuroinflammation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.,* 30: 1608–1618.

Owen DR, Guo Q, Rabiner EA, Gunn RN. (2015). The impact of the rs6971 polymorphism in TSPO for quantification and study design. *Clin. Transl. Imaging,* 3: 417–422.

Owen DR, Narayan N, Wells L, Healy L, Smyth E, Rabiner EA, Galloway D, Williams JB, Lehr J, Mandhair H, Peferoen LA, Taylor PC, Amor S, Antel JP, Matthews PM, Moore CS. (2017). Pro-inflammatory activation of primary microglia and macrophages increases 18 kDa translocator protein expression in rodents but not humans. *J. Cereb. Blood Flow Metab.,* 37: 2679–2690.

Owens BD, Kragh JF, Wenke JC, Macaitis J, Wade CE, Holcomb JB. (2008). Combat wounds in operation iraqi freedom and operation enduring freedom. *J. Trauma Inj. Infect. Crit. Care,* 64: 295–299.

Paintlia MK, Paintlia AS, Singh AK, Singh I. (2013). *S*-nitrosoglutathione induces ciliary neurotrophic factor expression in astrocytes, which has implications to protect the central nervous system under pathological conditions. *J. Biol. Chem.,* 288: 3831–3843.

Pannell M, Economopoulos V, Wilson TC, Kersemans V, Isenegger PG, Larkin JR, Smart S, Gilchrist S, Gouverneur V, Sibson NR. (2019). Imaging of translocator protein upregulation is selective for pro-inflammatory polarized astrocytes and microglia. *Glia,* glia.23716.

Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapère JJ, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang MR, Gavish M. (2006). Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol. Sci.,* 27: 402–409.

Pappata S, Levasseur M, Gunn RN, Myers R, Crouzel C, Syrota A, Jones T, Kreutzberg GW, Banati RB. (2000). Thalamic microglial activation in ischemic stroke detected in vivo by PET and [11C]PK1195. *Neurology,* 55: 1052–4.

Pardon MC, Yanez Lopez M, Yuchun D, Marjańska M, Prior M, Brignell C, Parhizkar S, Agostini A, Bai L, Auer DP, Faas HM. (2016). Magnetic Resonance Spectroscopy discriminates the response to microglial stimulation of wild type and Alzheimer's disease models. *Sci. Rep.,* 6: 19880.

Pearn ML, Niesman IR, Egawa J, Sawada A, Almenar-Queralt A, Shah SB, Duckworth JL, Head BP. (2017). Pathophysiology associated with traumatic brain injury: current treatments and potential novel therapeutics. *Cell. Mol. Neurobiol.,* 37: 571–585.

Pearson VL, Rothwell NJ, Toulmond S. (1999). Excitotoxic brain damage in the rat induces interleukin-1beta protein in microglia and astrocytes: correlation with the progression of cell death. *Glia,* 25: 311–23.

Peeters W, van den Brande R, Polinder S, Brazinova A, Steyerberg EW, Lingsma HF, Maas AIR. (2015). Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochir. (Wien),* 157: 1683–1696.

Pekny M, Pekna M. (2014). Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol. Rev.,* 94: 1077-1098.

Perry DC, Sturm VE, Peterson MJ, Pieper CF, Bullock T, Boeve BF, Miller BL, Guskiewicz KM, Berger MS, Kramer JH, Welsh-Bohmer KA. (2016). Association of traumatic brain injury with subsequent neurological and psychiatric disease: a meta-analysis. *J. Neurosurg.,* 124: 511–526.

Petraglia AL, Plog BA, Dayawansa S, Chen M, Dashnaw ML, Czerniecka K, Walker CT, Viterise T, Hyrien O, Iliff JJ, Deane R, Nedergaard M, Huang JH. (2014). The spectrum of neurobehavioral sequelae after repetitive mild traumatic brain injury: a novel mouse model of chronic traumatic encephalopathy. *J. Neurotrauma,* 31: 1211–1224.

Pinteaux-Jones F, Sevastou IG, Fry VAH, Heales S, Baker D, Pocock JM. (2008). Myelin-induced microglial neurotoxicity can be controlled by microglial metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.,* 106: 442–54.

Prins M, Greco T, Alexander D, Giza CC. (2013). The pathophysiology of traumatic brain injury at a glance. *Dis. Model. Mech.*, 6: 1307-1315.

Prinz M, Erny D, Hagemeyer N. (2017). Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nat. Immunol.,* 18: 385–392.

Qian L, Flood PM, Hong JS. (2010). Neuroinflammation is a key player in Parkinson's disease and a prime target for therapy. *J. Neural Transm.,* 117: 971–9.

Raj R, Kaprio J, Korja M, Mikkonen ED, Jousilahti P, Siironen J. (2017). Risk of hospitalization with neurodegenerative disease after moderate-to-severe traumatic brain injury in the working-age population: a retrospective cohort study using the Finnish national health registries. *PLOS Med.,* 14: e1002316.

Ramlackhansingh AF, Brooks DJ, Greenwood RJ, Bose SK, Turkheimer FE, Kinnunen KM, Gentleman S, Heckemann RA, Gunanayagam K, Gelosa G, Sharp DJ. (2011). Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Ann. Neurol.*, 70: 374-383.

Ransohoff RM. (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat. Neurosci.,* 19: 987–991.

Reeves T, Phillips L, Povlishock J. (2005). Myelinated and unmyelinated axons of the corpus callosum differ in vulnerability and functional recovery following traumatic brain injury. *Exp. Neurol.,* 196: 126–137.

Rhodes J. (2011). Peripheral immune cells in the pathology of traumatic brain injury. *Curr. Opin. Crit. Care*, 17: 122-130.

Rich MC, Keene CN, Neher MD, Johnson K, Yu ZX, Ganivet A, Holers V.M, Stahel P.F. (2016). Site-targeted complement inhibition by a complement receptor 2-conjugated inhibitor (mTT30). ameliorates post-injury neuropathology in mouse brains. *Neurosci. Lett.,* 617: 188-194.

Risau W, Wolburg H. (1990). Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 13: 174–8.

Roberts GW, Gentleman SM, Lynch A, Murray L, Landon M, Graham DI. (1994). Beta amyloid protein deposition in the brain after severe head injury: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry,* 57: 419–425.

Robertson CL, Saraswati M, Fiskum G. (2007). Mitochondrial dysfunction early after traumatic brain injury in immature rats. *J. Neurochem.*, 101(5): 1248-57.

Robinson S, Miller RH. (1999). Contact with central nervous system myelin inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Dev. Biol.,* 216: 359–68.

Rodríguez-Rodríguez A, Egea-Guerrero JJ, León-Justel A, Gordillo-Escobar E, Revuelto-Rey J, Vilches-Arenas Á, Carrillo-Vico A, Domínguez-Roldán JM, Murillo-Cabezas F, Guerrero JM. (2012). Role of S100B protein in urine and serum as an early predictor of mortality after severe traumatic brain injury in adults. *Clin. Chim. Acta,* 414: 228–233.

Rosenfeld J V, Maas AI, Bragge P, Morganti-Kossmann MC, Manley GT, Gruen RL. (2012). Early management of severe traumatic brain injury. *Lancet,* 380: 1088–1098.

Rupprecht R, Papadopoulos V, Rammes G, Baghai TC, Fan J, Akula N, Groyer G, Adams D, Schumacher M. (2010). Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.,* 9: 971–988.

Saatman KE, Creed J, Raghupathi R. (2010). Calpain as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, 7(1): 31-42.

Sabri O, Becker GA, Meyer PM, Hesse S, Wilke S, Graef S, Patt M, Luthardt J, Wagenknecht G, Hoepping A, Smits R, Franke A, Sattler B, Habermann B, Neuhaus P, Fischer S, Tiepolt S, Deuther-Conrad W, Barthel H, Schönknecht P, Brust P. (2015). First-in-human PET quantification study of cerebral α4β2* nicotinic acetylcholine receptors using the novel specific radioligand (−)-[18F]Flubatine. *Neuroimage,* 118: 199–208.

Sandiego CM, Gallezot JD, Pittman B, Nabulsi N, Lim K, Lin SF, Matuskey D, Lee JY, O'Connor KC, Huang Y, Carson RE, Hannestad J, Cosgrove KP. (2015). Imaging robust microglial activation after lipopolysaccharide administration in humans with PET. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* 112: 12468–12473.

Sapp E, Kegel KB, Aronin N, Hashikawa T, Uchiyama Y, Tohyama K, Bhide PG, Vonsattel JP, Difiglia M. (2001). Early and progressive accumulation of reactive microglia in the huntington disease brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.,* 60: 161–172.

Satoh J ichi, Kino Y, Asahina N, Takitani M, Miyoshi J, Ishida T, Saito Y. (2016). TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. *Neuropathology,* 36: 39–49.

Sauvageau A, Desjardins P, Lozeva V, Rose C, Hazell AS, Bouthillier A, Butterwort RF. (2002). Increased expression of 'peripheral-type' benzodiazepine receptors in human temporal lobe epilepsy: implications for PET imaging of hippocampal sclerosis. *Metab. Brain Dis.,* 17: 3–11.

Sayed N, Culver C, Dams-O'Connor K, Hammond F, Diaz-Arrastia R. (2013). Clinical phenotype of dementia after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma,* 30: 1117–1122.

Scarf AM & Kassiou M. (2011). The Translocator Protein. *J. Nucl. Med.,* 52: 677–680.

Schoemaker H, Morelli M, Deshmukh P, Yamamura HI. (1982). [3H]Ro5-4864 benzodiazepine binding in the kainate lesioned striatum and Huntington's diseased basal ganglia. *Brain Res.,* 248: 396–401.

Schuitemaker A, Kropholler MA, Boellaard R, van der Flier WM, Kloet RW, van der Doef TF, Knol DL, Windhorst AD, Luurtsema G, Barkhof F, Jonker C, Lammertsma AA, Scheltens P, van Berckel BNM. (2013). Microglial activation in Alzheimer's disease: an (R)-[^{11}C]PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol. Aging,* 34: 128–36.

Schwab JM, Beschorner R, Meyermann R, Gözalan F, Schluesener HJ. (2002). Persistent accumulation of cyclooxygenase-1—expressing microglial cells and macrophages and transient upregulation by endothelium in human brain injury. *J. Neurosurg.,* 96: 892–899.

Schweitzer PJ, Fallon BA, Mann JJ, Kumar JSD. (2010). PET tracers for the peripheral benzodiazepine receptor and uses thereof. *Drug Discov. Today,* 15: 933–942.

Scott G, Ramlackhansingh AF, Edison P, Hellyer P, Cole J, Veronese M, Leech R, Greenwood RJ, Turkheimer FE, Gentleman SM, Heckemann RA, Matthews PM, Brooks DJ, Sharp DJ. (2016). Amyloid pathology and axonal injury after brain trauma. *Neurology,* 86: 821–828.

Semple BD, Bye N, Rancan M, Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. (2010). Role of CCL2 (MCP-1) in traumatic brain injury (TBI): evidence from severe TBI patients and CCL2-/- mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.,* 30: 769–82.

Sérrière S, Tauber C, Vercouillie J, Mothes C, Pruckner C, Guilloteau D, Kassiou M, Doméné A, Garreau L, Page G, Chalon S. (2015). Amyloid load and translocator protein 18 kDa in APPswePS1-dE9 mice: a longitudinal study. *Neurobiol. Aging,* 36: 1639–1652.

Shen Z, Bao X, Wang R. (2018). Clinical PET Imaging of microglial activation: implications for microglial therapeutics in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.,* 10: 314.

Shi H, Hu X, Leak RK, Shi Y, An C, Suenaga J, Chen J, Gao Y. (2015). Demyelination as a rational therapeutic target for ischemic or traumatic brain injury. *Exp. Neurol.,* 272: 17–25.

Shively S, Scher AI, Perl DP, Diaz-Arrastia R. (2012). Dementia resulting from traumatic brain injury. *Arch. Neurol.,* 69: 1245–51.

Simon DW, McGeachy MJ, Bayır H, Clark RS, Loane DJ, Kochanek PM. (2017). The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. *Nat. Rev. Neurol.*, 13(3): 171-91.

Simons M, Misgeld T, Kerschensteiner M. (2014). A unified cell biological perspective on axon-myelin injury. *J. Cell. Biol.,* 206: 335–45.

Smith DH, Soares HD, Pierce JS, Perlman KG, Saatman KE, Meaney DF, Dixon CE, McIntosh TK. (1995). A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *J. Neurotrauma,* 12: 169–178.

Smith DH, Chen XH, Pierce JE, Wolf JA, Trojanowski JQ, Graham DI, McIntosh TK. (1997). Progressive atrophy and neuron death for one year following brain trauma in the rat. *J. Neurotrauma,* 14: 715–27.

Smith DH, Nonaka M, Miller R, Leoni M, Chen XH, Alsop D, Meaney DF. (2000). Immediate coma following inertial brain injury dependent on axonal damage in the brainstem. *J. Neurosurg.,* 93: 315–322.

Société Française d'Anesthésie et de Réanimation. (1999). Management of severe head injuries in the early stage. Recommendations. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.,* 18: 15–22.

Sofroniew M V & Vinters H V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*., 2010;119(1):7-35.

Song GJ & Suk K. (2017). Pharmacological modulation of functional phenotypes of microglia in neurodegenerative diseases. *Front. Aging Neurosci.,* 9: 139.

Sousa C, Golebiewska A, Poovathingal SK, Kaoma T, Pires-Afonso Y, Martina S, Coowar D, Azuaje F, Skupin A, Balling R, Biber K, Niclou SP, Michelucci A. (2018). Single-cell transcriptomics reveals distinct inflammation-induced microglia signatures. *EMBO Rep.,* 19.

Sridharan S, Lepelletier FX, Trigg W, Banister S, Reekie T, Kassiou M, Gerhard A, Hinz R, Boutin H. (2017). Comparative evaluation of three TSPO PET radiotracers in a LPS-induced model of mild neuroinflammation in rats. *Mol. Imaging Biol.,* 19: 77–89.

Stein SC, Georgoff P, Meghan S, Mizra K, Sonnad SS. (2010). 150 Years of treating severe traumatic brain injury: a systematic review of progress in mortality. *J. Neurotrauma,* 27: 1343–1353.

Stein DM, Lindell A, Murdock KR, Kufera JA, Menaker J, Keledjian K, Bochicchio G V., Aarabi B, Scalea TM. (2011). Relationship of serum and cerebrospinal fluid biomarkers with intracranial hypertension and cerebral hypoperfusion after severe traumatic brain injury. *J. Trauma Inj. Infect. Crit. Care,* 70: 1096–1103.

Stella N. (2010). Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia,* 58: 1017–30.

Stephenson DT, Schober DA, Smalstig EB, Mincy RE, Gehlert DR, Clemens JA. (1995). Peripheral benzodiazepine receptors are colocalized with activated microglia following transient global forebrain ischemia in the rat. *J. Neurosci.,* 15: 5263–74.

Stern RA, Daneshvar DH, Baugh CM, Seichepine DR, Montenigro PH, Riley DO, Fritts NG, Stamm JM, Robbins CA, McHale L, Simkin I, Stein TD, Alvarez VE, Goldstein LE, Budson AE, Kowall NW, Nowinski CJ, Cantu RC, McKee AC. (2013). Clinical presentation of chronic traumatic encephalopathy. *Neurology,* 81: 1122–1129.

Steudel WI, Cortbus F, Schwerdtfeger K. (2005). Epidemiology and prevention of fatal head injuries in Germany – trends and the impact of the reunification. *Acta Neurochir. (Wien),* 147: 231–242.

Stocchetti N & Zanier ER. (2016). Chronic impact of traumatic brain injury on outcome and quality of life: a narrative. *Crit. Care*, 20(1): 148.

Stocchetti N, Carbonara M, Citerio G, Ercole A, Skrifvars MB, Smielewski P, Zoerle T, Menon DK. (2017). Severe traumatic brain injury: targeted management in the intensive care unit. *Lancet Neurol.*, 16(6): 452-64.

Stockhammer G, Poewe W, Burgstaller S, Deisenhammer F, Muigg A, Kiechl S, Schmutzhard E, Maier H, Felber S, Schumacher P, Gunsilius E, Gastl G. (2000). Vascular endothelial growth factor in CSF: a biological marker for carcinomatous meningitis. *Neurology,* 54: 1670–6.

Strathmann FG & Hoofnagle AN. (2011). Current and future applications of mass spectrometry to the clinical laboratory. *Am. J. Clin. Pathol.,* 136: 609–616.

Su Z, Herholz K, Gerhard A, Roncaroli F, Du Plessis D, Jackson A, Turkheimer F, Hinz R. (2013). [11C]-(R)PK11195 tracer kinetics in the brain of glioma patients and a comparison of two referencing approaches. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging,* 40: 1406–1419.

Su E & Bell M. (2016). Diffuse axonal injury. in: Laskowitz D, Grant G, editors. Translational research in traumatic brain injury. *Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor and Francis Group*. Chapter 3: 41-84.

Sun X, Wang X, Chen T, Li T, Cao K, Lu A, Chen Y, Sun D, Luo J, Fan J, Young W, Ren Y. (2010). Myelin Activates FAK/Akt/NF-κB Pathways and Provokes CR3-Dependent Inflammatory Response in Murine System. *PLoS One,* 5: e9380.

Suridjan I, Pollock BG, Verhoeff NPLG, Voineskos AN, Chow T, Rusjan PM, Lobaugh NJ, Houle S, Mulsant BH, Mizrahi R. (2015). In-vivo imaging of grey and white matter neuroinflammation in Alzheimer's disease: a positron emission tomography study with a novel radioligand, [18F]-FEPPA. *Mol. Psychiatry,* 20: 1579–1587.

Susarla BTS, Villapol S, Yi JH, Geller HM, Symes AJ. (2014). Temporal patterns of cortical proliferation of glial cell populations after traumatic brain injury in mice. *ASN Neuro.,* 6: AN20130034.

Suzumura A. (2013). Neuron-microglia interaction in neuroinflammation. *Curr. Protein Pept. Sci.,* 14: 16–20.

Tai YF, Pavese N, Gerhard A, Tabrizi SJ, Barker RA, Brooks DJ, Piccini P. (2007). Imaging microglial activation in Huntington's disease. *Brain Res. Bull.,* 72: 148–151.

Taib T, Leconte C, Van Steenwinckel J, Cho AH, Palmier B, Torsello E, Lai Kuen R, Onyeomah S, Ecomard K, Benedetto C, Coqueran B, Novak AC, Deou E, Plotkine M, Gressens P, Marchand-Leroux C, Besson VC. (2017). Neuroinflammation, myelin and behavior: Temporal patterns following mild traumatic brain injury in mice. *PLoS One*, 12(9): e0184811.

Takaki J, Fujimori K, Miura M, Suzuki T, Sekino Y, Sato K. (2012). L-glutamate released from activated microglia downregulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the 'collusion' hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. *J. Neuroinflammation,* 9: 784.

Takashima-Hirano M, Shukuri M, Takashima T, Goto M, Wada Y, Watanabe Y, Onoe H, Doi H, Suzuki M. (2010). General Method for the ^{11}C-Labeling of 2-Arylpropionic Acids and Their Esters: Construction of a PET Tracer Library for a Study of Biological Events Involved in COXs Expression. *Chem. – A. Eur. J.,* 16: 4250–4258.

Taylor CA, Bell JM, Breiding MJ, Xu L. (2017). Traumatic Brain Injury–Related Emergency Department Visits, Hospitalizations, and Deaths — United States, 2007 and 2013. *MMWR. Surveill. Summ.,* 66: 1–16.

Teasdale G & Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*, 1974 ; 2(7872) : 81-4.

Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Leker RR. (2012). Combination of vascular endothelial and fibroblast growth factor 2 for induction of neurogenesis and angiogenesis after traumatic brain injury. *J. Mol. Neurosci.,* 47: 166–172.

The Brain Trauma Foundation, The American Association of Neurological Surgeons. (2000). The Joint Section on Neurotrauma and Critical Care. Glasgow coma scale score. *J. Neurotrauma,* 17: 563–71.

Thelin EP, Tajsic T, Zeiler FA, Menon DK, Hutchinson PJA, Carpenter KLH, Morganti-Kossmann MC, Helmy A. (2017). Monitoring the neuroinflammatory response following acute brain injury. *Front. Neurol.,* 8: 351.

Thomas C, Vercouillie J, Doméné A, Tauber C, Kassiou M, Guilloteau D, Destrieux C, Sérrière S, Chalon S. (2016). detection of neuroinflammation in a rat model of subarachnoid hemorrhage using [^{18}F]DPA-714 PET Imaging. *Mol. Imaging,* 15: 153601211663918.

Tomasi G, Edison P, Bertoldo A, Roncaroli F, Singh P, Gerhard A, Cobelli C, Brooks DJ, Turkheimer FE. (2008). Novel reference region model reveals increased microglial and reduced vascular binding of 11C-(R)-PK11195 in patients with Alzheimer's Disease. *J. Nucl. Med.,* 49: 1249–1256.

Tronel C, Largeau B, Santiago Ribeiro M, Guilloteau D, Dupont AC, Arlicot N. (2017). Molecular targets for PET Imaging of activated microglia: the current situation and future expectations. *Int. J. Mol. Sci.,* 18: 802.

Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. Purinergic system, microglia and neuropathic pain. *Curr. Opin. Pharmacol*., 2012;12(1):74-79.

Turkheimer FE, Rizzo G, Bloomfield PS, Howes O, Zanotti-Fregonara P, Bertoldo A, Veronese M. (2015). The methodology of TSPO imaging with positron emission tomography. *Biochem. Soc. Trans.,* 43: 586–592.

Turner M., Cagnin A, Turkheimer F., Miller CC., Shaw C., Brooks D., Leigh P., Banati R. (2004). Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol. Dis.,* 15: 601–609.

van Berckel BN, Bossong MG, Boellaard R, Kloet R, Schuitemaker A, Caspers E, Luurtsema G, Windhorst AD, Cahn W, Lammertsma AA, Kahn RS. (2008). Microglia activation in recent-onset schizophrenia: a quantitative (R)-[11C]PK11195 positron emission tomography study. *Biol. Psychiatry,* 64: 820–822.

Vandeputte C, Casteels C, Struys T, Koole M, van Veghel D, Evens N, Gerits A, Dresselaers T, Lambrichts I, Himmelreich U, Bormans G, Van Laere K. (2012). Small-animal PET imaging of the type 1 and type 2 cannabinoid receptors in a photothrombotic stroke model. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging,* 39: 1796–1806.

Vas Á, Shchukin Y, Karrenbauer VD, Cselényi Z, Kostulas K, Hillert J, Savic I, Takano A, Halldin C, Gulyás B. (2008). Functional neuroimaging in multiple sclerosis with radiolabelled glia markers: Preliminary comparative PET studies with [11C]vinpocetine and [11C]PK11195 in patients. *J. Neurol. Sci.,* 264: 9–17.

Veenman L & Gavish M. (2006). The peripheral-type benzodiazepine receptor and the cardiovascular system. Implications for drug development. *Pharmacol. Ther.,* 110: 503–524.

Venneti S, Lopresti BJ, Wiley CA. (2006). The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein 18kDa) in microglia: from pathology to imaging. *Prog. Neurobiol.,* 80: 308–322.

Ventura T, Harrison-Felix C, Carlson N, DiGuiseppi C, Gabella B, Brown A, DeVivo M, Whiteneck G. (2010). Mortality after discharge from acute care hospitalization with traumatic brain injury: a population-based study. *Arch. Phys. Med. Rehabil.,* 91: 20–29.

Verweij BH, Muizelaar JP, Vinas FC, Peterson PL, Xiong Y, Lee CP. (2000). Impaired cerebral mitochondrial function after traumatic brain injury in humans. *J. Neurosurg.*, 93(5): 815-20.

Vignal N, Cisternino S, Rizzo-Padoin N, San C, Hontonnou F, Gelé T, Declèves X, Sarda-Mantel L, Hosten B. (2018). [18F]FEPPA a TSPO radioligand: optimized radiosynthesis and evaluation as a pet radiotracer for brain inflammation in a peripheral LPS-injected mouse model. *Molecules,* 23: 1375.

Viviani B, Boraso M, Marchetti N, Marinovich M. (2014). Perspectives on neuroinflammation and excitotoxicity: a neurotoxic conspiracy? *Neurotoxicology,* 43: 10–20.

Walker DG & Lue LF. (2015). Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimers. Res. Ther.* 7: 56.

Walko TD 3rd, Bola RA, Hong JD, Au AK, Bell MJ, Kochanek PM, Clark RS, Aneja RK. (2014). Cerebrospinal fluid mitochondrial DNA: a novel DAMP in pediatric traumatic brain injury. *Shock*, 41(6): 499-503.

Wang M, Gao M, Zheng QH. (2012). Fully automated synthesis of PET TSPO radioligands [11C]DAA1106 and [18F]FEDAA1106. *Appl. Radiat. Isot.,* 70: 965–973.

Wang G, Zhang J, Hu X, Zhang L, Mao L, Jiang X, Liou AKF, Leak RK, Gao Y, Chen J. (2013). Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.,* 33: 1864–74.

Wang G, Shi Y, Jiang X, Leak RK, Hu X, Wu Y, Pu H, Li WW, Tang B, Wang Y, Gao Y, Zheng P, Bennett MVL, Chen J. (2015a). HDAC inhibition prevents white matter injury by modulating microglia/macrophage polarization through the GSK3β/PTEN/Akt axis. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* 112: 2853–2858.

Wang X, Cao K, Sun X, Chen Y, Duan Z, Sun L, Guo L, Bai P, Sun D, Fan J, He X, Young W, Ren Y. (2015b). Macrophages in spinal cord injury: phenotypic and functional change from exposure to myelin debris. *Glia*, 63(4): 635-51.

Wang L, Yang Y, Chen S, Ge M, He J, Yang Z, Lin P, Wu X. (2018). White matter integrity correlates with residual consciousness in patients with severe brain injury. *Brain Imaging Behav.,* 12: 1669–1677.

Washington PM, Forcelli PA, Wilkins T, Zapple DN, Parsadanian M, Burns MP. (2012). The effect of injury severity on behavior: a phenotypic study of cognitive and emotional deficits after mild, moderate, and severe controlled cortical impact injury in mice. *J. Neurotrauma,* 29: 2283–2296.

Weckbach S, Neher M, Losacco JT, Bolden AL, Kulik L, Flierl MA, Bell SE, Holers VM, Stahel PF. (2012). Challenging the role of adaptive immunity in neurotrauma: Rag1(-/-) mice lacking mature B and T cells do not show neuroprotection after closed head injury. *J. Neurotrauma,* 29: 1233–42.

Wimberley C, Lavisse S, Brulon V, Peyronneau MA, Leroy C, Bodini B, Remy P, Stankoff B, Buvat I, Bottlaender M. (2018). Impact of endothelial 18-kDa Translocator Protein on the quantification of 18F-DPA-714. *J. Nucl. Med.,* 59: 307–314.

Wilson L, Stewart W, Dams-O'Connor K, Diaz-Arrastia R, Horton L, Menon DK, Polinder S. (2017). The chronic and evolving neurological consequences of traumatic brain injury. *Lancet Neurol.,* 16: 813–825.

Woodcock T, Morganti-Kossmann MC. (2013). The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Front. Neurol.,* 4: 18.

Woodcock EA, Hillmer AT, Mason GF, Cosgrove KP. (2019). Imaging biomarkers of the neuroimmune system among substance use disorders: a systematic review. *Mol. Neuropsychiatry,* 5: 125–146.

Yang XF, Wang H, Wen L. (2011). From myelin debris to inflammatory responses: a vicious circle in diffuse axonal injury. *Med. Hypotheses,* 77: 60–2.

Yang L, Kan EM, Lu J, Wu C, Ling EA. (2014). Expression of 2′,3′-cyclic nucleotide 3′-phosphodiesterase (CNPase) and its roles in activated microglia *in vivo* and *in vitro*. *J. Neuroinflammation,* 11: 148.

Yatsiv I, Morganti-Kossmann MC, Perez D, Dinarello CA, Novick D, Rubinstein M, Otto VI, Rancan M, Kossmann T, Redaelli CA, Trentz O, Shohami E, Stahel PF. (2002). Elevated intracranial IL-18 in humans and mice after traumatic brain injury and evidence of neuroprotective effects of IL-18-binding protein after experimental closed head injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.,* 22: 971–8.

Yokokura M, Mori N, Yagi S, Yoshikawa E, Kikuchi M, Yoshihara Y, Wakuda T, Sugihara G, Takebayashi K, Suda S, Iwata Y, Ueki T, Tsuchiya KJ, Suzuki K, Nakamura K, Ouchi Y. (2011). *In vivo* changes in microglial activation and amyloid deposits in brain regions with hypometabolism in Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging,* 38: 343–51.

Yu S yang, Zuo L jun, Wang F, Chen Z jie, Hu Y, Wang Y jie, Wang X min, Zhang W. (2014). Potential biomarkers relating pathological proteins, neuroinflammatory factors and free radicals in PD patients with cognitive impairment: a cross-sectional study. *BMC Neurol.,* 14: 113.

Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J. Neurosci.,* 32: 6391–6410.

Zanotti-Fregonara P, Zhang Y, Jenko KJ, Gladding RL, Zoghbi SS, Fujita M, Sbardella G, Castellano S, Taliani S, Martini C, Innis RB, Da Settimo F, Pike VW. (2014). Synthesis and Evaluation of Translocator 18 kDa Protein (TSPO) Positron Emission Tomography (PET) radioligands with low binding sensitivity to human single nucleotide polymorphism rs6971. *ACS Chem. Neurosci.,* 5: 963–971.

Zeineh MM, Chen Y, Kitzler HH, Hammond R, Vogel H, Rutt BK. (2015). Activated iron-containing microglia in the human hippocampus identified by magnetic resonance imaging in Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging,* 36: 2483–2500.

Zetterberg H & Blennow K. (2016). Fluid biomarkers for mild traumatic brain injury and related conditions. *Nat. Rev. Neurol.,* 12: 563–574.

Zhang Z, Saraswati M, Koehler RC, Robertson C, Kannan S. (2015). A new rabbit model of pediatric traumatic brain injury. *J. Neurotrauma,* 32: 1369–1379.

Zhang Y, Zhao L, Wang X, Ma W, Lazere A, Qian HH, Zhang J, Abu-Asab M, Fariss RN, Roger JE, Wong WT. (2018). Repopulating retinal microglia restore endogenous organization and function under CX3CL1-CX3CR1 regulation. *Sci. Adv.,* 4: eaap8492.

Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. (2010). Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics,* 7: 22–30.

Zisterer DM & Williams DC. (1997). Peripheral-type benzodiazepine receptors. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.,* 29: 305–314.

Zusso M, Methot L, Lo R, Greenhalgh AD, David S, Stifani S. Regulation of postnatal forebrain amoeboid microglial cell proliferation and development by the transcription factor Runx1. *J. Neurosci*., 2012;32(33):11285-11298.