



HAL
open science

Vulnérabilité au stress post-traumatique suite à un traumatisme crânien : marqueurs neuroanatomiques, neurotrophiques et épigénétiques

Rémi Corne

► **To cite this version:**

Rémi Corne. Vulnérabilité au stress post-traumatique suite à un traumatisme crânien : marqueurs neuroanatomiques, neurotrophiques et épigénétiques. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019UNIP5054 . tel-03860134

HAL Id: tel-03860134

<https://theses.hal.science/tel-03860134>

Submitted on 18 Nov 2022

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
PARIS
DESCARTES



Université de Paris

Université de Paris

École doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries (MTCI ED 563)

Laboratoire EA4475 « Pharmacologie de la Circulation Cérébrale »

Vulnérabilité au stress post-traumatique suite à un traumatisme crânien : marqueurs neuroanatomiques, neurotrophiques et épigénétiques

Par Rémi Corne

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Raymond Mongeau

Présentée et soutenue publiquement le 30 octobre 2019

Devant un jury composé de :

Anne Tessier, PU, U. de Bourgogne
Nasser Haddjeri, DR, U. Claude Bernard Lyon
Mehrnaz Jafarian-Tehrani, PU, U. de Paris
Laurence Lanfumey, DR Émérite, U. de Paris
Michael Ogier, Group Leader, IRBA
Raymond Mongeau, MCU, U. de Paris

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Examinateur
Directeur de thèse



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

Mes premiers remerciements reviennent au Pr Catherine Marchand-Leroux qui m'a accueilli et donné l'opportunité d'effectuer ma thèse dans son laboratoire. Je tiens à la remercier pour sa confiance puis son aide pour la préparation du concours de l'école doctorale, ainsi que pour ses corrections de lors de la rédaction de ma thèse.

Mes remerciements vont également au Dr Raymond Mongeau qui m'a fait l'honneur d'être mon directeur de thèse. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordé, sa disponibilité, ses nombreux conseils, son amitié, sa positivité infailible, et surtout sa patience avec moi.

Je remercie la Fondation des Gueules Cassées et le Pr Valérie Besson qui ont permis la réalisation de cette thèse dans les meilleures conditions possibles.

Je remercie le Pr Anne Tessier et le Dr Nasser Haddjeri de me faire l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que le Pr Mehrnaz Jafarian Tehrani et les Drs Laurence Lanfumey et Michael Ogier d'avoir accepté de siéger dans ce jury en tant qu'examineurs.

Je remercie le Pr Valérie Besson et les Drs Claire Leconte et Michael Ogier pour leur collaboration dans mes travaux, ainsi que le Dr Laurence Lanfumey pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et permis d'y réaliser des expérimentations.

Je remercie les Drs Bruno Palmier, Marina Schrever, Marion Levy, et Emilien Stragier pour leur soutien technique et leurs précieux conseils.

Je remercie le Nicole Croci, les Prs Isabelle Margaill et Michel Plotkine, le Dr Dominique Lerouet, Bérard Coquerand et le personnel du laboratoire pour leur disponibilité et leurs encouragements.

Je remercie les étudiants actuels et anciens du laboratoire pour les moments passés avec eux. Je remercie particulièrement Camille, Sofiane, Marta, Xue, Amanda, et Ines pour avoir participer à mes travaux.

Je remercie les futurs docteurs Clément et Geoffroy pour leur présence thérapeutique.

Je remercie tous ceux qui ont été à mes côtés durant ces 3 années, en particulier ma famille et mes amis, sans qui rien n'aurait été possible.

Table des matières

Abréviations	6
Liste des publications	8
Résumés	9
Introduction générale	13
Rappels bibliographiques	15
Chapitre 1. Le Traumatisme crânien	15
1. Historique et épidémiologie	15
1.1 Histoire du traumatisme crânien	15
1.2 Définition et sévérité du traumatisme crânien	17
2. Physiopathologie du traumatisme crânien	19
2.1 Mécanisme général.....	19
2.2 Excitotoxicité et stress oxydant.....	20
2.3 La réponse inflammatoire post-traumatisme crânien.....	22
2.4 Persistance de l'inflammation suite au traumatisme crânien.....	24
3. Les différents modèles de traumatisme crânien	26
3.1 Comparaison des différents modèles.....	28
3.2 Types de lésions générées	29
4. Neurobiologie et progression du traumatisme crânien	29
4.1 Le traumatisme crânien en tant que trouble neurodégénératif.....	29
4.2 Progression des lésions secondaires après un traumatisme crânien.....	31
4.2.1 L'imagerie par tenseur de diffusion.....	31
4.2.2 Dégénérescence de la substance blanche.....	32
4.2.3 La « myelin basic protein »	32
4.2.4 Neurodégénérescence hors substance blanche.....	33
4.3 Importance de l'activation astrocytaire dans la neuroréparation après un traumatisme crânien.....	34
4.3.1 Neuroréparation, neurogenèse et facteurs trophiques.....	34
4.4 L'étude de la neuroanatomie du traumatisme crânien.....	36
4.4.1 Rappels anatomiques	36
4.4.2 Techniques d'étude neuroanatomique.....	38
4.5 Altérations anatomiques et lien avec la cognition et l'émotion	38
4.5.1 Données cliniques	39
4.5.2 Modèles animaux, lésions primaires et secondaires	41
5. Le traumatisme crânien : facteur de vulnérabilité psychiatrique	43
Chapitre 2. L'état de stress post-traumatique	46
1. Histoire et définition	46
1.1 L'état de stress post-traumatique dans l'histoire	46
1.2 Définition de l'état de stress post-traumatique	48
2. La thérapie d'exposition	49
3. Modélisation de l'état de stress post-traumatique chez l'animal	50
3.1 Exemples de modèles de l'état de stress post-traumatique	50
3.2 Pertinence du modèle de conditionnement de la peur.....	51
3.3 Neuroanatomie des comportements de peur	53
3.3.1 Principaux acteurs	53
3.3.2 Autres régions impliquées	56
4. Neurobiologie de l'état de stress post-traumatique	56
4.1 Reviviscence et généralisation.....	57
4.2 Le déficit d'extinction de la peur	58

4.2.1	Neuroanatomie fonctionnelle du déficit d'extinction	58
4.2.2	Le déficit d'extinction : inné ou acquis ?	59
4.3	Plasticité et implication des facteurs trophiques	60
5.	Comorbidité traumatisme crânien et état de stress post-traumatique	60
5.1	Effet combinatoire des traumatismes physiques et psychologiques	61
Chapitre 3.	Les facteurs trophiques.....	63
1.	L'épigénétique.....	63
1.1	Définition	63
1.2	Les modifications des histones	64
1.2.1	Les histones	64
1.2.2	L'acétylation et la méthylation des histones	65
1.3	La méthylation de l'ADN	67
1.3.1	Le contrôle de la méthylation de l'ADN	67
2.	Les neurotrophines	69
2.1	Signalisation des neurotrophines	69
2.2	Le « brain-derived neurotrophic factor », la vedette des neurotrophines	71
2.2.1	Importance du BDNF en psychiatrie	71
2.2.2	Régulation transcriptionnelle du Bdnf	73
2.2.3	Le génotype val66met.....	74
3.	BDNF, état de stress post-traumatique et comportements de peur	75
3.1	Neuroanatomie de la signalisation BDNF.....	75
3.1.1	Dans le conditionnement de la peur	75
3.1.2	Dans l'extinction de la peur	76
3.1.3	Épigénétique et expression du Bdnf dans le comportement de peur	78
4.	Le BDNF dans le traumatisme crânien	80
4.1	Réponse du BDNF après un traumatisme crânien.....	80
4.2	Effet des interventions sur le BDNF.....	82
5.	Le système "insulin-like growth factor"	83
5.1	Généralités	83
5.2	Les protéines de transport de l'IGF.....	85
6.	L'IGF1	86
6.1	Généralités	86
6.2	Structure de l'Igf1	87
6.3	Fonctions de l'IGF1 dans le cerveau	88
6.4	Cognition, émotion et état de stress post-traumatique	89
6.5	L'IGF1 dans le traumatisme crânien.....	91
6.5.1	Réponse spontanée de l'axe GH/IGF1	91
6.5.2	Effet d'interventions sur l'IGF1	92
7.	L'IGF-2	94
7.1	Généralités	94
7.2	Structure de l'Igf2.....	94
7.3	Fonctions de l'IGF2	95
7.3.1	Lien avec l'état de stress post-traumatique	96
7.3.2	Lien avec le traumatisme crânien	97
Objectifs de l'étude	99	
Matériels et méthodes détaillés.....	100	
1.	Traumatisme crânien par impact cortical contrôlé	100
2.	Conditionnement et extinction de la peur	101
3.	Score neurologique.....	103
4.	Mémoire spatiale et flexibilité cognitive (test de Barnes)	104
5.	Profil d'anxiété et comportements de risque	106
6.	Immunohistochimie et analyse d'image.....	107
7.	Analyses de la transcription et de la méthylation de l'ADN	110

8. Expression des résultats et analyses statistiques.....	116
Résultats expérimentaux	117
Article 1	118
Spontaneous resurgence of conditioned fear weeks after successful extinction in brain injured mice.....	118
Supplementary data.....	131
.....	133
.....	134
Résultats supplémentaires sur les modifications épigénétiques du Bdnf suite au traumatisme crânien	135
Article 2	137
Limitations of Insulin-like Growth Factors as specific markers of traumatic brain injury: Effects of stress	137
Supplementary data.....	167
Discussion générale	170
1. Le traumatisme crânien léger, facteur de vulnérabilité psychiatrique	171
1.1 Un traumatisme crânien vraiment léger ?.....	171
1.2 Conséquences neuroanatomiques et comportementales du modèle de l'impact cortical contrôlé	172
2. Utilité des facteurs trophiques en tant que marqueurs.....	178
2.1 Les facteurs trophiques dans le traumatisme crânien.....	179
2.2 Pertinence des deux groupes contrôles, naïf et sham	181
2.3 Variation des facteurs trophiques en relation avec le comportement de peur	182
2.4 Épigénétique des facteurs trophiques	183
3. Conclusions et perspectives	185
Bibliographie.....	188
Annexe 1	218

Abréviations

Lorsqu'une abréviation est en majuscules (XYZ), elle traite d'une protéine. Lorsqu'une abréviation n'a que sa première lettre en majuscule, les autres étant en minuscules (Xyz), elle traite d'un gène.

A β : amyloïde bêta

ADNc : ADN complémentaire

AKT : protéine kinase B

AMPc : adénosine mono-phosphate cyclique

ATP : adénosine tri-phosphate

BDNF : brain-derived neurotrophic factor (protéine)

BHE : barrière hémato-encéphalique

CC : corps calleux

CCA : cortex cingulaire antérieur

CeA : central amygdala

CPF : cortex préfrontal

CPFvm : cortex préfrontal ventromédian

CREB : c-AMP response element

CS : conditioned stimulus

Ct : nombre de cycles nécessaires au dépassement du seuil

DNMT : DNA methyl-transférase (protéine)

DSM : diagnostics and statistical manual of mental disorders

ERO : espèces réactives de l'oxygène

ERK : extracellular signal-regulated kinase

ESPT : état de stress post-traumatique

FOXO : forkhead box O

GAPDH : D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (protéine)

GFAP : glial fibrillary acidic protein

GH : growth hormone

GSK3 : glycogen synthase kinase 3

HDAC : histone désacétylase

IL : interleukine

IGF : insulin-like growth factor
IGFBP : insulin-like growth factor-binding protein
IGFR : insulin-like growth factor receptor
IRM : imagerie par résonance magnétique
IRMf : imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
LA : lateral amygdala
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MBP : myelin basic protein
MeCP2 : methyl CpG-binding protein
MPD : mode par défaut
mTOR : mammalian target of rapamycin
NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide
NGF : nerve growth factor
NIA : noyau intercalaire amygdalien
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NT : neurotrophine
p75^{NTR} : p75 neurotrophin receptor
PARP : poly-ADP-ribose polymérase
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
PKA : protéine kinase A
PBS : phosphate buffer solution
TC : traumatisme crânien
TCL : traumatisme crânien léger
TrK : tropomyosin-related kinase
TNF- α : tumor necrosis factor alpha
US : unconditioned stimulus

Liste des publications

Publications écrites

Corne R; Leconte C; Ouradou M; Fassina V; Zhu Y; Deou Z; Besson V; Plotkine M; Mongeau R. Spontaneous resurgence of conditioned fear weeks after successful extinction in brain injured mice (2019) *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* 88:276-286

Corne R; Mongeau R. Utilisation des psychédéliques en psychiatrie : Lien avec la signalisation BDNF-TrKB (*Sous presse*) *Biologie Aujourd'hui*

Corne R; Ogier M; Besson V; Xue S; Ait Si Slimane S; Palhas M; Coutant M; Marchand-Leroux C; Mongeau R. (*En Préparation*) Limitations of Insulin-like Growth Factors as specific markers of traumatic brain injury: Effects of stress

Communications orales

Corne R; Leconte C; Ouradou M; Fassina V; Zhu Y; Deou Z; Besson V; Plotkine M; Mongeau R. Spontaneous resurgence of conditioned fear weeks after successful extinction in brain injured mice. 20ème Journée ABC des Psychotraumas, 18 juin 2019, Paris

Corne R; Ogier M; Besson V; Xue S; Ait Si Slimane S; Palhas M; Coutan M; Marchand-Leroux C; Mongeau R. Système IGF et vulnérabilité psychiatrique suite au traumatisme crânien : marqueur de lésions cérébrale ou du stress traumatique ? Journée scientifique de la Société Cerveau et Maladies Cérébrovasculaires, 28 Mars 2019, Lille

Corne R. Utilisation des psychédéliques en psychiatrie : Lien avec la signalisation BDNF-TrKB. Société de Biologie, 16 avril 2019, Paris

Communications affichées

Corne R; Ogier M; Besson V; Xue S; Ait Si Slimane S; Palhas M; Coutant M; Marchand-Leroux C; Mongeau R. Is the IGF system a marker of traumatic brain injury and/or "traumatic" stress? 32nd congress of the European College of Neuropsychopharmacology, Copenhagen, 7-10 September 2019

Résumés

Vulnérabilité au stress post-traumatique suite à un traumatisme crânien : marqueurs neuroanatomiques, neurotrophiques et épigénétiques

Le traumatisme crânien (TC) est un facteur de vulnérabilité aux troubles psychiatriques, notamment à l'état de stress post-traumatique (ESPT). Les patients ESPT souffrent d'une altération de la mémoire conditionnée suite à un événement traumatisant. Ils ont une capacité réduite à éteindre les mémoires de peur : ils répondent bien aux thérapies comportementales, mais les rechutes sont fréquentes. Le TC et l'ESPT ont en commun des altérations au niveau neuroanatomique et des systèmes neurotrophiques. La substance blanche et certaines régions impliquées dans les comportements de peur présentent des irrégularités chez les patients TC et ESPT pouvant impliquer une dérégulation des facteurs trophiques. Le « brain-derived neurotrophic factor » (BDNF) et le système « insulin-like growth factor » (IGF1 et IGF2) ont été suggérés comme marqueurs du TC, et donc des vulnérabilités psychiatriques résultantes. Dans un modèle murin de TC, nous avons modélisé certains symptômes de l'ESPT et mesuré les altérations neuroanatomiques et de facteurs neurotrophiques concomitantes.

Un TC par impact cortical contrôlé a été induit chez des souris C57BL6/J mâles. Les comportements de peur de type ESPT ont été évalués avec le modèle du conditionnement de la peur 3 semaines après le TC. Notre première étude a évalué la rétention à long terme de l'extinction de la mémoire de peur, les comportements de prise de risque (tests de l'« open-field » et du labyrinthe en croix surélevée), et la mémoire spatiale (test de Barnes). Les volumes et les altérations de la substance blanche ont été évalués dans les circuits de la peur par immunohistochimie. Dans ces régions, l'expression et l'état épigénétique du *Bdnf* ont été évalués par qPCR et immunoprécipitation de l'ADN méthylé.

Notre deuxième étude a déterminé l'utilité de l'IGF en tant que marqueur du TC à court et long terme (à 3 jours et à 3 semaines), en lien ou non avec le conditionnement de la peur. Les niveaux d'IGF1 et d'IGF2 sanguins, et d'IGF1 cérébraux ont été évalués par ELISA, ainsi que l'expression et la méthylation d'*Igf1* dans les régions liées aux comportements de peur conditionnée. La répartition cellulaire d'IGF2 a été étudiée par immunohistochimie.

Le TC n'affecte pas l'acquisition et l'extinction de la peur conditionnée, mais il rend plus labile à long terme la rétention de l'extinction de la peur, provoquant une résurgence spontanée de la peur conditionnée. Le TC induit aussi des comportements de prise de risque et une baisse de la flexibilité cognitive, symptômes présents chez les patients ESPT et TC. Les témoins opérés ont des déficits intermédiaires par rapport aux souris naïves. Dans les circuits de la peur, des diminutions de volumes et des déficits de la substance blanche ont été observés, ainsi qu'une altération de l'expression et la méthylation du *Bdnf* dans le cortex frontal. Relativement au BDNF, le système IGF évolue de manière plus

robuste dans l'hippocampe. Suite au TC, les niveaux centraux d'IGF1 ainsi que l'expression et la méthylation de son gène augmentent à court et à long terme. La distribution d'IGF2 dans l'épithélium du ventricule latéral est réorganisée à court et à long terme. Les niveaux sanguins d'IGF1 et d'IGF2 diminuent seulement à long terme suite au TC et en réaction à la peur. L'IGF1, mais pas l'IGF2, diminue aussi avec l'exposition au conditionnement de la peur seule, en l'absence de TC.

Nos travaux confirment que le TC expérimental prédispose aux symptômes de type ESPT, ceux-ci étant associés à des altérations neuroanatomiques et de facteurs trophiques. Si les modifications de BDNF et d'IGF pourraient rendre compte des déficits comportementaux et neurobiologiques, l'IGF1 périphérique ne semble pas être un marqueur spécifique du trauma physique ou psychologique. Ce manque de spécificité est problématique dans le cadre de la comorbidité TC/ESPT. Néanmoins, il pourrait être un marqueur du rétablissement après un TC, ainsi qu'une cible thérapeutique dans le TC/ESPT.

Vulnerability to post-traumatic stress following a traumatic brain injury: neuroanatomical, neurotrophic and epigenetic markers

Traumatic brain injury (TBI) is a major public health concern and vulnerability factor for psychiatric illness, post-traumatic stress disorder (PTSD) in particular. PTSD patients suffer from traumatic conditioned fear memory alterations, and display a reduced capacity for fear memory extinction: relapse of PTSD symptoms is frequent despite the effectiveness of behavioural therapy. TBI and PTSD share pathophysiological characteristics such as neuroanatomical abnormalities and defects in the functioning of neurotrophic systems. Irregularities in white matter and fear behaviour circuitry may be seen in both TBI and PTSD, and these could involve deregulated trophic factors. As such, the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and the insulin-like growth factor system (IGF1 and IGF2) have been suggested as markers of TBI, and, by extension, psychiatric vulnerability. In a mouse model of TBI, we modelled certain behavioural aspects of PTSD and measured co-occurring neuroanatomical and trophic factor alterations.

We induced TBI by controlled cortical impact in male C57BL/6J mice. Three weeks post-TBI, PTSD-like fear behaviours were assessed using a classical fear conditioning procedure. Our first study evaluated long-term fear extinction retention, risk-taking behaviours (in the open-field and elevated-plus maze tests), and spatial memory (Barnes maze test). Volumes of brain regions and white matter alterations were assessed in the fear circuitry by immunohistochemistry. In these regions, *Bdnf* expression and methylation status was evaluated by qPCR and methylated DNA immunoprecipitation.

Our second study focused on the usefulness of the IGF system as a marker of TBI on the short- and long-term (3 days vs. 3 weeks), with or without subsequent fear conditioning. ELISA was used to determine blood IGF1 and IGF2 levels, and brain IGF1 levels in the conditioned fear circuitry. *Igf1* expression and methylation status were also assessed. IGF2 cellular distribution was studied using immunohistochemistry.

TBI does not affect fear acquisition and extinction, but weakens the long-term retention of fear extinction memory, causing spontaneous resurgence of conditioned fear. In addition, TBI induces risk-taking behaviours and a decrease in cognitive flexibility, symptoms also present in TBI and PTSD patients. Sham animals showed intermediary deficits relative to naïve mice. In the fear circuitry, white matter deficits and atrophies of some brain regions were found as well as alterations in *Bdnf* expression and methylation levels in the frontal cortex. Relative to BDNF, the IGF system responds more robustly to TBI in the hippocampus. Central IGF1 levels strongly increase on both the short and long term, with concomitant increases in gene expression and methylation levels. IGF2 undergoes massive reorganisation in the epithelium of the lateral ventricles on both the short and long term. Peripheral IGF1 and IGF2 levels are decreased after both long term TBI and a traumatic-like stress but are unchanged in the short term by traumatic brain injury. Peripheral IGF1 is also decreased following fear-conditioning exposure alone, in the absence of TBI.

Our work shows that experimental TBI predisposes to PTSD-like symptoms while simultaneously inducing neuroanatomical and trophic factor changes. While BDNF and IGF modifications may account for the behavioural and neurobiological deficits, peripheral IGF1 does not seem useful as a specific marker of physical or psychological trauma. Following TBI, the central IGF system undergoes reorganization in both the short and long term, but peripheral IGF1 and IGF2 are only affected on the long term after TBI. In addition, peripheral IGF1 is similarly affected by “traumatic” stress alone, a lack of specificity that is problematic in the context of the TBI/PTSD comorbidity. Nonetheless,

it could be a marker of post-TBI recovery as well as a therapeutic target to treat the TBI/PTSD comorbidity.

Introduction générale

Le traumatisme crânien (TC) est un problème majeur de santé publique affectant des millions d'individus tous les ans. Si les risques de séquelles graves et même de mort après un TC modéré ou sévère sont connus depuis longtemps, les risques encourus après un TC léger (TCL) sont de plus en plus étudiés. En effet, même en l'absence de déficits majeurs, celui-ci semble prédisposer à nombre de troubles psychiatriques. Ceux-ci vont des troubles neurodégénératifs aux troubles anxio-dépressifs. Les troubles anxieux sont les plus fréquents après un TCL, en particulier l'état de stress post-traumatique (ESPT).

L'ESPT, défini par le "*Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders*" (DSM), survient suite à l'exposition à un événement traumatique dans le lequel l'intégrité physique du sujet ou d'autrui a pu être menacée, conduisant à un sentiment d'impuissance ou d'horreur. Il est principalement caractérisé par des souvenirs intrusifs de reviviscence de l'événement traumatisant, ainsi qu'une difficulté à éteindre la peur associée à ce souvenir, appelée déficit d'extinction de la mémoire de peur. Néanmoins, les patients ESPT souffrent aussi de symptômes anxio-dépressifs, d'insomnies, d'irritabilité, et d'un état d'éveil accru. Ces derniers symptômes sont également présentés par les individus TC, et la fréquence de la comorbidité TC/ESPT mérite d'explorer les mécanismes neurobiologiques communs à ces deux troubles, ainsi que ceux pour lesquels le TC devient un facteur de vulnérabilité psychiatrique.

Les victimes de TC ne présentent pas nécessairement de troubles anxio-dépressifs à court terme après un TC. La vulnérabilité psychiatrique fait généralement son apparition avec le temps, montrant ainsi la nature progressive du TC. Cette évolution peut aussi être retrouvée au niveau neuroanatomique. Le TC en lui-même induit une lésion primaire, sous la forme de contusion locale ou de lésions diffuses, du fait de la déformation du cerveau lors du choc. De plus, les perturbations biochimiques causées par le TC vont se répandre à des sites plus distants et y induire une neuro-dégénérescence. Ces lésions secondaires émergent avec le temps, et peuvent atteindre le cortex préfrontal (CPF), impliqué dans la cognition et le contrôle des émotions, et l'amygdale, impliquée en particulier dans la peur. Ces deux régions cruciales sont donc susceptibles d'être affectées dans les troubles anxieux et l'ESPT. Particulièrement vulnérables au TC sont l'hippocampe, impliqué dans la mémoire contextuelle dans l'ESPT et l'axe du stress

(hypothalamo-hypophysaire) dans les troubles anxio-dépressifs, ainsi que les fibres de substance blanche permettant la communication entre toutes ces régions. Une réponse inflammatoire, initialement bénéfique, s'installe suite au TC afin d'éliminer les cellules endommagées et les débris qu'elles laissent. En effet, le choc initial cause des lésions diffuses des axones et donc la libération de débris d'axones et de la gaine de myéline qui les entoure (pour assurer leur nutrition et faciliter l'influx électrique). Par la suite, cette réponse inflammatoire perdure et devient délétère, inhibant la neuroréparation, et provoquant une mort neuronale additionnelle, c'est la phase chronique du TC. Dans un effort de réparation, le cerveau met en place des mécanismes neurotrophiques afin de limiter la progression des lésions secondaires et réparer celles qui sont déjà survenues. Plusieurs systèmes de signalisation neurotrophique sont mis en jeu, et nous avons choisi de nous focaliser sur celui impliquant le « brain-derived neurotrophic factor » (BDNF) et le système « insulin-like growth factor » (IGF, incluant IGF1 et IGF2). Ceux-ci participent notamment à la remyélinisation de la substance blanche, c'est-à-dire le recouvrement des axones endommagés par une nouvelle gaine de myéline. Ils sont aussi impliqués dans la neurogenèse et les phénomènes de plasticité synaptique dans l'hippocampe. Ces facteurs ont également été impliqués dans certains troubles anxio-dépressifs incluant l'ESPT, ce qui pourrait en faire des marqueurs intéressants pour détecter la vulnérabilité psychiatrique induite par le TC. Le BDNF par exemple joue un rôle crucial dans les apprentissages liés à la peur, y compris l'extinction de la mémoire peur. Le système IGF quant à lui, serait particulièrement important dans la neuroréparation post-TC, mais est aussi affecté par le stress et les apprentissages liés à la peur. L'objectif de cette thèse était donc d'étudier les conséquences neuroanatomiques du TC pouvant être impliquées dans l'émergence de l'ESPT, puis de déterminer les altérations de facteurs trophiques et épigénétiques associées pouvant être utilisées comme marqueurs.

Rappels bibliographiques

Chapitre 1. Le Traumatisme crânien

1. Historique et épidémiologie

1.1 Histoire du traumatisme crânien

Le TC est une lésion physique connue depuis longtemps. Les conséquences du TC modéré et sévère sont généralement évidentes à repérer et peuvent se manifester sous la forme de troubles moteurs et cognitifs de gravité variée, allant jusqu'au coma et même la mort. Le TC toucherait 262 pour 100 000 habitants par an (Peeters et al., 2015) et constitue la première cause de handicap et de mort chez les jeunes (www.center-tbi.eu, 2019a). Néanmoins, les formes plus légères du TC commencent à être reconnues pour le fléau qu'elles sont. Bien que le TCL ne cause généralement pas de séquelles à court terme (dans les semaines suivant la blessure), il serait un facteur de vulnérabilité pour nombre de troubles psychiatriques, en particulier les troubles de stress et d'anxiété.

Les TCL furent observés à grande échelle dans le contexte militaire de la Première Guerre Mondiale. De par l'exposition fréquente et répétée à des déflagrations causées par l'utilisation massive d'obus, l'observation de symptômes neurologiques et psychiatriques liés à la commotion cérébrale fut faite chez beaucoup de soldats. Les symptômes incluait des maux de tête, de l'amnésie, une difficulté à se concentrer et à dormir, de la dépression et des idéations suicidaires. L'ensemble de ces troubles fut regroupé sous l'appellation « shell shock », en 1915 par Charles Samuel Meyers. À l'époque, il était difficile de séparer le traumatisme physique (TC) du traumatisme psychologique puisque les deux pouvaient être provoqués par le même évènement : les soldats pouvaient être terrifiés par le son seul d'un bombardement d'artillerie lourde et/ou subir directement la déflagration des explosions. Par ailleurs, étant donné que ces bombardements pouvaient durer des heures, le grand nombre de déflagrations devait produire des dommages cérébraux qui s'accumulaient, même si une seule de ces déflagrations ne constituait pas une agression suffisante pour causer des séquelles graves. Cette répétition devait aussi induire un apprentissage de type peur conditionnée chez les soldats, phénomène dont nous discuterons dans la partie sur l'ESPT (chapitre 2). En dépit d'une

absence d'études physiopathologiques, les comités de guerre en charge du problème décidèrent que ces symptômes, lorsqu'ils étaient observés en l'absence de lésions physiques, résultaient d'une condition psychiatrique plutôt que physique. Les individus ainsi atteints étaient souvent considérés comme des lâches et renvoyés sur le front (Auxéméry & Mongeau, 2017).

Les TC auxquels sont exposés les soldats sont parfois de nature légère ne causant pas de perte de conscience. Néanmoins, une répétition massive d'un traumatisme même léger peut induire des conséquences pathologiques importantes. Une observation similaire a été faite peu après dans le contexte sportif de la boxe, où la même symptomatologie a été décrite, avec des perturbations motrices, des symptômes d'irritabilité, et de paranoïa. Ce complexe de symptômes fut d'abord regroupé sous le terme « punch drunk » (ivresse du coup de poing). Les cas d'étude réalisés dans les décennies suivantes parlèrent aussi de « *dementia pugilistica* », maintenant appelée « encéphalopathie traumatique chronique » (McKee & Robinson, 2014). Ce concept fut de plus en plus appliqué aux civils victimes de TC répétés, et la généralisation du problème fut vraiment acceptée à la suite de l'article séminal d'Omalu (2005) décrivant ce phénomène chez des joueurs de football américain (Omalu et al., 2005). Dans le contexte des modèles de TC expérimentaux explorés dans cette thèse, il doit être noté que les TCL peuvent ou non être répétés et induire néanmoins des déficits neurobiologiques dont l'évolution progressive et chronique constitue un facteur de vulnérabilité psychiatrique.

Les patients TCL présentent généralement des symptômes autant psychologiques que somatiques immédiatement après la blessure. Ces symptômes psychiatriques incluent l'irritabilité, la dépression et l'anxiété, et si un faible pourcentage de patients continue de rapporter la présence de symptômes 12 mois après la blessure, ceux-ci se dissipent généralement dans les semaines voir les mois suivants (Cole & Bailie, 2016). Néanmoins, les analyses statistiques réalisées suggèrent que le TCL est un facteur de risque pour nombre de troubles neuropsychiatriques. D'un côté, ceux-ci peuvent être plutôt neurologiques, allant du trouble de déficit de l'attention et d'hyperactivité à la maladie d'Alzheimer, en passant par l'épilepsie post-traumatique (Cole & Bailie, 2016). De l'autre, ils peuvent être plutôt de nature psychiatrique, incluant des épisodes dépressifs, des psychoses, mais surtout des troubles anxieux, notamment l'ESPT. Bien que la littérature clinique sur les TC puisse parfois paraître incohérente, les régions du

cerveau lésées, le temps post-TCL, et les prédispositions de l'individu (ex. génétiques) déterminent la nature des symptômes (Cole & Bailie, 2016).

Les complications psychiatriques post-TCL ont d'importantes conséquences sociétales, ce qui a mené le TCL à être considéré comme une « épidémie silencieuse ». Puisque les complications post-TCL surviennent après un délai plus ou moins long, il est estimé que 25% de ceux-ci ne sont jamais rapportés auprès des autorités médicales. Si la dépression (25-50% d'occurrence) et l'ESPT (10-50% d'occurrence ; Bryant, 2011) sont parmi les complications post-TC les plus étudiées, il augmente aussi simultanément le risque de troubles anxieux en général (10-70% ; Vaishnavi et al., 2009). De plus, les symptômes neuropsychiatriques dans l'ensemble sont plus prévalents et persistants chez les victimes de TC (Vaishnavi et al., 2009). La comorbidité TC/troubles anxieux est encore plus profonde : les symptômes post-TC peuvent être très similaires à ceux des troubles anxieux. Par conséquent, ils ont souvent été confondus (Bryant, 2011).

1.2 Définition et sévérité du traumatisme crânien

Le TC résulte de dommages cérébraux induits par une agression extérieure. Il peut avoir plusieurs origines, le plus souvent causé par un choc crânien direct (dit « impact focal », Figure 1A), blessure du contrecoup (qui affecte le côté opposé à celui initialement impacté, du fait de hochement de la tête qui provoque un « rebond » du cerveau dans la boîte crânienne, Figure 1A), accélération/décélération rapide de la tête (Figure 1B), ou onde de choc (déflagration, Figure 1C). Les causes les plus fréquentes de TC sont les chutes et les accidents de véhicules motorisés, et dans le cadre de cette thèse, il faut garder à l'esprit que les circonstances menant au trauma physique peuvent également engendrer un stress psychologique. Ceci a certainement son importance pour la compréhension de l'interaction entre les troubles du stress et le TC.

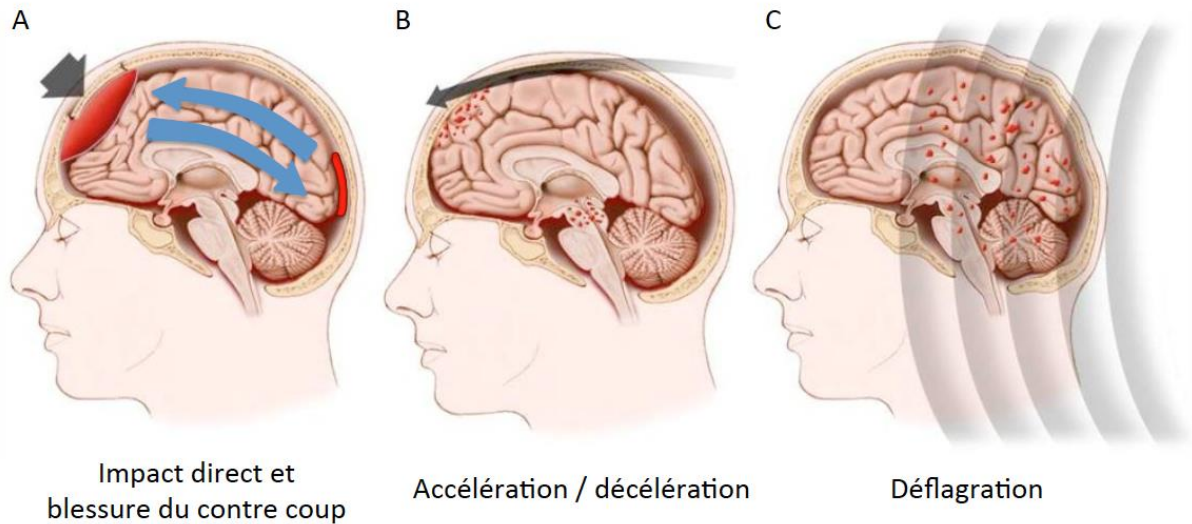


Figure 1. Les différentes causes de traumatisme crânien. A) TC par impact focal induisant un coup à l'endroit de l'impact et un contrecoup de l'autre côté du cerveau. **B)** TC par accélération/décélération. **C)** TC induit par l'onde de choc d'une déflagration.

La sévérité du TC a été séparée en 3 classes, dépendantes du score obtenu sur l'échelle de Coma de Glasgow : léger (score entre 13 et 15), modéré (score entre 9 et 12), et sévère (score de 8 et inférieur). Le score final est la somme des scores obtenus pour les 3 critères servant à établir le degré d' « éveil » suite au TC. Ces critères sont la réponse oculaire, verbale, et motrice (Table 1). Ces classes reflètent également la durée d'inconscience et d'amnésie post-traumatique : un TCL doit induire moins de 30 minutes d'inconscience et moins de 24h d'amnésie, un TC modéré moins de 24h d'inconscience et 7 jours d'amnésie, et le TC sévère couvre les cas restants. Les patients ayant un TCL représentent la grande majorité des cas et n'ont généralement pas d'anormalités structurales du cerveau (Mallya et al., 2015). Des tests de type neurologiques chez le rongeur, basés sur des observations comportementales de la réponse motrice, ont aussi été développés pour estimer la sévérité du TC (voir section Matériel et Méthodes, section 3).

La lésion primaire induite par le trauma focal évolue, dans les jours et même les années suivantes, et génère des lésions dites secondaires distantes du site d'impact (Taib et al., 2017). Ceci serait une conséquence des déficits biochimiques induits par le trauma (voir section 2), et de la neuroinflammation chronique qui en résulte (Prasad & Bondy, 2015). Finalement, le TC est considéré comme un facteur de risque pour des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et de Parkinson (Perry et al., 2016), les personnes ayant subi un TC souffrant de neurodégénérescence précoce (Johnson et

al., 2012). C'est cette nature progressive du TC qui rend importante la détermination de marqueurs permettant d'évaluer le risque encouru par une victime de TC, et donc la nécessité d'intervention thérapeutique.

Réponse	1	2	3	4	5	6
Oculaire	N'ouvre pas les yeux	En réponse à la douleur	En réponse à la parole	Ouvre les yeux spontanément	-	-
Verbale	Ne fait pas de sons	Fait des sons	Forme des mots	Est confus, désorienté	Converse normalement	-
Motrice	Ne fait pas de mouvements	Extension des membres en réponse à la douleur	Flexion anormale en réponse à la douleur	Flexion normale en réponse à la douleur	Mouvement localisé et dirigé vers la douleur	Répond aux commandes

Table 1. Le score attribué à chaque réponse possible pour un des 3 critères utilisés pour calculer le score de coma de Glasgow.

2. Physiopathologie du traumatisme crânien

2.1 Mécanisme général

La lésion primaire du TC progresse à travers différents stades impliquant des réponses biochimiques, cellulaires, et physiologiques qui ont pour résultat la mort neuronale et des atteintes tissulaires. Ces processus peuvent avoir lieu à des échelles de temps distincts, interagir entre eux, et se superposer à des désordres préexistants.

À l'échelle macroscopique, immédiatement après le trauma, la barrière hémato-encéphalique (BHE), qui régule les échanges entre le cerveau et la périphérie, est perturbée. Sa perméabilité est augmentée, pouvant conduire à la formation d'un œdème et même d'un hématome (Corps et al., 2015). Ceci augmente la pression intracrânienne, un facteur crucial déterminant le pronostic. En effet, l'augmentation de la pression intracrânienne peut provoquer une diminution de la perfusion du tissu cérébral, conduisant à une ischémie. L'accumulation de lactate qui en résulte génère de l'acidose, perturbant l'homéostasie. La déformation du tissu cérébral peut également mener à l'apparition de lésions axonales diffuses, c'est-à-dire la rupture de certains des axones faisant la connexion entre des régions distantes. Ces lésions vont par ailleurs conduire à la dispersion de débris toxiques, notamment de la myéline qui recouvre les axones

endommagés (Corps et al., 2015). Cette compression peut également affecter les centres de maintien des fonctions vitales, conduisant à la mort du patient.

Au niveau cellulaire, les dommages et la mort seront principalement causés par 3 phénomènes : l'excitotoxicité et le stress oxydant qui surviennent immédiatement et simultanément, et l'inflammation qui arrive peu après et persiste au long terme (Corps et al., 2015).

2.2 Excitotoxicité et stress oxydant

Le stress oxydant et l'excitotoxicité surviennent simultanément, immédiatement après le trauma (<30 minutes), et vont par ailleurs interagir entre eux et se renforcer mutuellement. Ces phénomènes induisent de la mort astrocytaire qui va perturber la BHE (Figure 2) et stimuler le recrutement de cellules immunitaires, et donc l'inflammation (Roth et al., 2014). Suite à la perturbation de la BHE, du glutamate est libéré dans l'espace extracellulaire. Ceci active les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA), induisant un influx de Ca^{2+} et une dépolarisation prolongée de la membrane des cellules nerveuses, qui mènent à un déséquilibre homéostatique des concentrations ioniques (Figure 2) de part et d'autre de la membrane (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}). Cette excitotoxicité est aussi amplifiée par la nature mécano-sensible de certaines sous-unités des récepteurs NMDA : la sous unité GluN2B des récepteurs NMDA provoque des influx de Ca^{2+} en réponse au déchirement et à la contraction/dilatation des tissus (Tehse & Taghibiglou, 2019). Ces mécanismes excitotoxiques ajoutent à la rupture de l'homéostasie, menant à une déplétion des stocks cellulaires d'adénosine tri-phosphate (ATP ; Figure 2), une perturbation de la fonction mitochondriale, et l'activation des voies d'apoptose. De plus, la perturbation de l'homéostasie mitochondriale induit une augmentation drastique des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans la cellule, elle-même amplifiée par l'activation des voies de signalisation apoptotiques (Figure 2). Les ERO vont induire des dommages à l'ADN et aux protéines du fait de leur action oxydative. La réparation de l'ADN va mettre en jeu l'activation de la poly ADP-ribose polymérase (PARP), qui est impliquée dans la décondensation de l'ADN en vue d'y ouvrir l'accès aux mécanismes de réparation. Notre laboratoire a beaucoup travaillé sur cette enzyme dans le contexte de l'ischémie cérébrale et du TC, et a pu montrer qu'elle est hyperactive en réponse aux dommages massifs

causés à l'ADN (Besson et al., 2003). Or, la PARP nécessite la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) pour exercer ses fonctions, son hyperactivation conduit donc à une déplétion des stocks cellulaires de NAD⁺. Ce dernier étant nécessaire à l'oxydation du glucose et donc la production d'ATP, il s'ensuit un emballement de la déplétion énergétique (Besson et al., 2003, 2005), qui accentue la mort mitochondriale et donc la libération d'ERO dans la cellule (Figure 2). Certaines enzymes sont mises hors d'action par le stress oxydant, notamment la superoxyde dismutase, un des principaux acteurs dans l'élimination des ERO et donc régulant le stress oxydant. Ceci conduit à un emballement du stress oxydant, qui, lorsque l'accumulation des ERO est suffisante pour submerger les systèmes de défense cellulaires, endommage de façon irréversible l'ADN et conduit à la mort des cellules (Schimmel et al., 2017).

Une étude très élégante employant une combinaison de microscopie bi-photonique et de marqueurs fluorescents de la mort cellulaire et des ERO a pu mettre en évidence la dynamique cellulaire dans un modèle de TC par compression. Ce modèle, assez peu utilisé, consiste à affiner l'épaisseur d'une partie du crâne pour le rendre malléable, afin d'y appliquer une pression blessant le cerveau par compression. Les auteurs ont pu montrer que la forte augmentation des ERO dans les 30 minutes après le trauma était bien la principale cause de mort cellulaire, puisqu'un prétraitement, et pas un post-traitement, par le glutathion (une molécule synthétisée par l'organisme dans l'objectif de neutraliser les ERO et ainsi éviter l'oxydation des protéines) pouvait réduire la mort des cellules méningiales d'environ 50%. Ils ont également montré que cette « vague » oxydante se répand des méninges au parenchyme, où la mort cellulaire commence environ 9 heures post-TC (Roth et al., 2014).



Figure 2. Multiples mécanismes de lésions secondaires induits par la lésion primaire.

2.3 La réponse inflammatoire post-traumatisme crânien

Amorcé par le trauma initial et l'excitotoxicité, le système immunitaire répond par l'induction d'une réponse inflammatoire (Figure 2). Les microglies, les cellules immunitaires résidentes du système nerveux central, vont être recrutées par la présence de débris d'astrocytes endommagés. Elles vont éliminer ces débris et être recrutées à la BHE pour remplir les espaces laissés par les astrocytes morts (Roth et al., 2014). Avec l'aide des astrocytes, les microglies préparent la phase subaiguë de la réponse inflammatoire par la sécrétion de cytokines. Ces molécules de signalisation inter-cellule peuvent générer des effets pro- ou anti-inflammatoires, c'est-à-dire exacerbant ou

diminuant l'agressivité de la réponse inflammatoire. Après un TC, la réponse inflammatoire serait exagérée par la sécrétion excessive de cytokines pro-inflammatoires comme le « tumor necrosis factor alpha » (TNF- α) et les interleukines (IL) pro-inflammatoires comme IL-1 β , IL-6, et IL-8 (Schimmel et al., 2017). Néanmoins, des cytokines anti-inflammatoires, comme IL-4 et IL-10, sont aussi secrétées (Werhane et al., 2017). Les cytokines peuvent interagir avec et amplifier les processus excitotoxiques et apoptotiques, causant de la mort cellulaire dans les phases initiales de la réponse post-trauma. Néanmoins, elles préparent la voie pour les événements neurotrophiques et réparateurs qui interviennent par la suite. Les cytokines pro- et anti-inflammatoires atteignent leur pic de production dans les 24h post-TC, et signalent le recrutement des monocytes, macrophages, neutrophiles, lymphocytes T et microglies au site de la lésion.

Le rôle des monocytes et des macrophages, qui sont d'origine périphérique et qui surviennent du fait de la rupture de la BHE, n'est pas clair après le TC. Ils sont mis en jeu avec du retard, entre 24 et 48 h après le TC et il a été supposé qu'ils participeraient à la phase chronique délétère du TC (Corps et al., 2015). Les neutrophiles sont la population de cellules immunitaires la plus présente après un TC. Ils sont impliqués dans la phagocytose des cellules endommagées et des débris de myéline résultant des atteintes de la substance blanche, et préparent aussi la voie pour la réparation post-TC en sécrétant des facteurs trophiques (Corps et al., 2015). Les lymphocytes T, aussi capables de sécréter des facteurs trophiques, seraient impliqués dans la protection en réponse aux antigènes produits par le système nerveux central. En effet, les débris de myéline libérés suite aux lésions axonales diffuses induites par le TC contiennent de grosses protéines, comme la « myelin basic protein » (MBP). Celle-ci mobiliserait les lymphocytes T aux zones atteintes, leur permettant d'exercer une action neurotrophique dans les zones lésées (Cohen & Schwartz, 1999). Ainsi, l'inhibition de cette réponse inflammatoire initiale peut aggraver les séquelles post-TC (Da Silva Meirelles et al., 2017; Schimmel et al., 2017). En effet, cette réponse pro-inflammatoire locale et aiguë doit être distinguée des événements anti-inflammatoires qui simultanément prennent place dans la pénombre de la lésion primaire (Da Silva Meirelles et al., 2017), et même au niveau de la lésion primaire elle-même à plus long terme. Cette dichotomie se reflète notamment au niveau des phénotypes microgliaux. Suite à leur activation par le TC, les microglies sont capables de phagocytose et de sécrétion des cytokines, mais aussi de participer à la neuroréparation. Ceci a donné lieu à une classification des microglies en deux phénotypes, M1 et M2. Pour

généraliser, on peut dire que les microglies de type M1, qui sont pro-inflammatoires et pro-apoptotiques, sont délétères après la phase aiguë. À ce stade, l'essentiel des dommages a été nettoyé et c'est la neuroréparation qui devrait être favorisée. Le type microglial anti-inflammatoire M2 entre alors en jeu, limitant l'aggravation des lésions cérébrales, favorisant la survie et la prolifération des oligodendrocytes, et donc la réparation de la substance blanche (Wang et al., 2015).

2.4 Persistance de l'inflammation suite au traumatisme crânien

Comme décrit précédemment, une forte réponse inflammatoire est induite immédiatement après le TC. Néanmoins, celle-ci peut se maintenir à moyen terme (jours, semaines) et long terme (mois, années). Par exemple, les niveaux de TNF- α demeurent élevés dans le sérum de patients TC sévères 5 jours après le trauma (Goodman et al., 1990). Une forte élévation de TNF- α a aussi été trouvée dans le sérum et le fluide cébrospinal 6 jours post-TC (Juengst et al., 2014). Cette augmentation était maintenue 6 mois après le trauma et frôlait la significativité à 12 mois. D'autres cytokines comme IL-6, IL-1 β et IL-8 ont été mesurées à des niveaux élevés dans le sérum après un TC sévère (Devoto et al., 2017; Kumar et al., 2015). Ces augmentations subaiguës et chroniques des niveaux de cytokines peuvent même être utilisées pour prédire la récupération à long terme. Les auteurs menant cette recherche conseillent maintenant l'emploi d'un score inflammatoire reflétant les mesures de plusieurs cytokines plutôt qu'une seule cytokine (par exemple, le ratio IL-6/IL-10, représentant l'action pro- vs. anti-inflammatoire, respectivement; Devoto et al., 2017; Hinson et al., 2015; Kumar et al., 2015; Woiciechowsky et al., 2002).

Chez l'homme, les rapports concernant des marqueurs inflammatoires périphériques ou dans le fluide cébrospinal sont rares au-delà des 12 mois post-TC. Les études à long terme se focalisent donc plutôt sur des marqueurs reflétant des phénotypes microgliaux activés. Les microglies peuvent être activées ou non, leur activation reflétant un niveau d'activité inflammatoire persistante. Cette activation peut être attestée par la présence de marqueurs de microglies immunoréactives comme les protéines CD68 et CR3/43 qui se trouvent sur la surface membranaire.

Deux études cliniques constatent une augmentation extensive de ces marqueurs, et donc d'immunoréactivité microgliale, des années après le TC (Gentleman et al., 2004; Johnson et al., 2013). Dans la substance blanche ce phénomène est observé jusqu'à 16 années après le TC (Gentleman et al., 2004). De façon intéressante, CD68 se trouvait à ses niveaux les plus élevés 4 années après le TC, suggérant que l'activité inflammatoire pourrait rester très élevée même longtemps après le TC. Une étude plus récente (Smith et al., 2013) et comprenant plus de sujets a montré que CD68 et CR3/43 augmentaient suite au TC pour atteindre un pic à 3 mois, retournant au niveau des contrôles dans les années suivantes. Les auteurs ont aussi évalué l'existence de lésions axonales diffuses par la présence de la protéine précurseur de l'amyloïde, qui s'accumule dans les zones lésées. Les patients présentant des lésions axonales diffuses avaient des niveaux plus élevés de CD68 et CR3/43 (Smith et al., 2013), suggérant bien une inflammation persistante du fait des lésions induites par le TC. Finalement, une étude en tomographie par émission de positons employant un ligand mettant en évidence les microglies activées s'est elle aussi intéressée au lien entre inflammation et lésions secondaires. Cette étude aussi montre une augmentation conjointe de ces lésions axonales diffuses et de l'immunoréactivité microgliale, persistant des années après le TC. Étant donné que la présence de microglies activées n'avait pas été observée au niveau du site originel de la lésion focale (Ramlackhansingh et al., 2011), l'inflammation et les lésions secondaires diffuses semblent bien être liées. En effet, les microglies activées sont généralement présentes au niveau de zones de lésions actives, même s'il est difficile de statuer sur la relation de causalité (Johnson et al., 2013). Dans le TC modéré, l'activation microgliale se fait conjointement à des atteintes de la myéline (Loane et al., 2014), et de la neurodégénérescence dans des régions comme le cortex et l'hippocampe (Smith et al., 1997). Ces régions sont impliquées dans les fonctions cognitives et certaines pathologies psychiatriques, et leur dégénérescence pourrait ainsi jouer un rôle dans l'émergence de troubles après un TC. En effet, un an après le TC, ces altérations sont toujours présentes, et une détérioration progressive de ces régions est observée, associée à des déficits cognitifs et comportementaux (Dixon et al., 1999).

Étant donné que seuls les patients sévèrement atteints bénéficient d'un réel suivi, ce même type de données manque en ce qui concerne les victimes de TCL. Néanmoins, ces résultats suggèrent dans l'ensemble un niveau d'inflammation chronique persistant

bien après le trauma, qui pourrait être impliqué dans la neurodégénérescence et donc la nature progressive des conséquences post-TC.

3. Les différents modèles de traumatisme crânien

Il existe différents modèles de TC chacun se rapprochant, d'une façon ou d'une autre, de causes physiques réelles du TC chez l'homme. Par exemple, les modèles de l'impact cortical contrôlé et de la percussion de fluide vont plutôt s'apparenter à un TC pénétrant du fait de l'ouverture du crâne, même si l'impact ne pénètre pas à proprement parler dans le parenchyme cérébral. Le modèle du lâcher de poids est un TC par impact direct avec ou sans fracture du crâne, et le modèle de la déflagration est un TC diffus causé par une explosion que peuvent subir, par exemple, les soldats.

L'impact cortical contrôlé (Figure 3A) : le modèle par impact cortical contrôlé consiste à induire la blessure en impactant directement la surface de cerveau. Une craniotomie (une ouverture circulaire du crâne à l'aide d'un foret dentaire) est d'abord réalisée directement au-dessus de la zone visée, puis un impact est produit sur le parenchyme cérébral, toujours protégé par la dure mère, par un cylindre en métal. Les paramètres de l'impact vont définir la sévérité du TC. Ces paramètres sont la vitesse, la profondeur, et la durée de l'impact. C'est un des modèles les plus récents et celui sur lequel nous avons travaillé. Il sera décrit plus en détail dans la partie Matériel et Méthodes.

La percussion de fluide (Figure 3B) : dans ce modèle, une craniotomie est également réalisée. L'impact n'est pas ici délivré par un objet, mais par un jet de fluide. Un tube relié à la craniotomie est rempli de solution saline, et une onde de choc est générée dans ce tube en impactant un piston au bout du tube. La pression créée par ce choc est donc transmise au cerveau par le biais du fluide. Ici, les paramètres contrôlant la sévérité de l'impact sont la durée et l'amplitude de la pression.

Le lâcher de poids (Figure 3C) : ce modèle consiste à lâcher un poids cylindrique dans un tube le guidant jusqu'au crâne de l'animal. Le cylindre peut alors directement frapper le crâne de l'animal ou une plaque en métal qui aura préalablement été fixée sur le crâne,

pour répartir l'impact. La tête peut être maintenue, ou non, selon que l'on veuille aussi induire une accélération de la boîte crânienne, ou non. Le poids du cylindre et la hauteur de la chute déterminent ici la sévérité du TC.

La déflagration (Figure 3D): ce modèle consiste à exposer l'animal à une déflagration dont la puissance est choisie en fonction de la sévérité désirée. L'animal se trouve dans un tube en métal fermé d'un côté, au niveau duquel une pression est générée grâce à de l'air comprimé ou une déflagration pour induire un TC. Ce modèle est assez rare dans la littérature car compliqué à mettre en place, mais reste pertinent dans le cadre de l'ESPT puisque les soldats sont souvent exposés à des déflagrations.

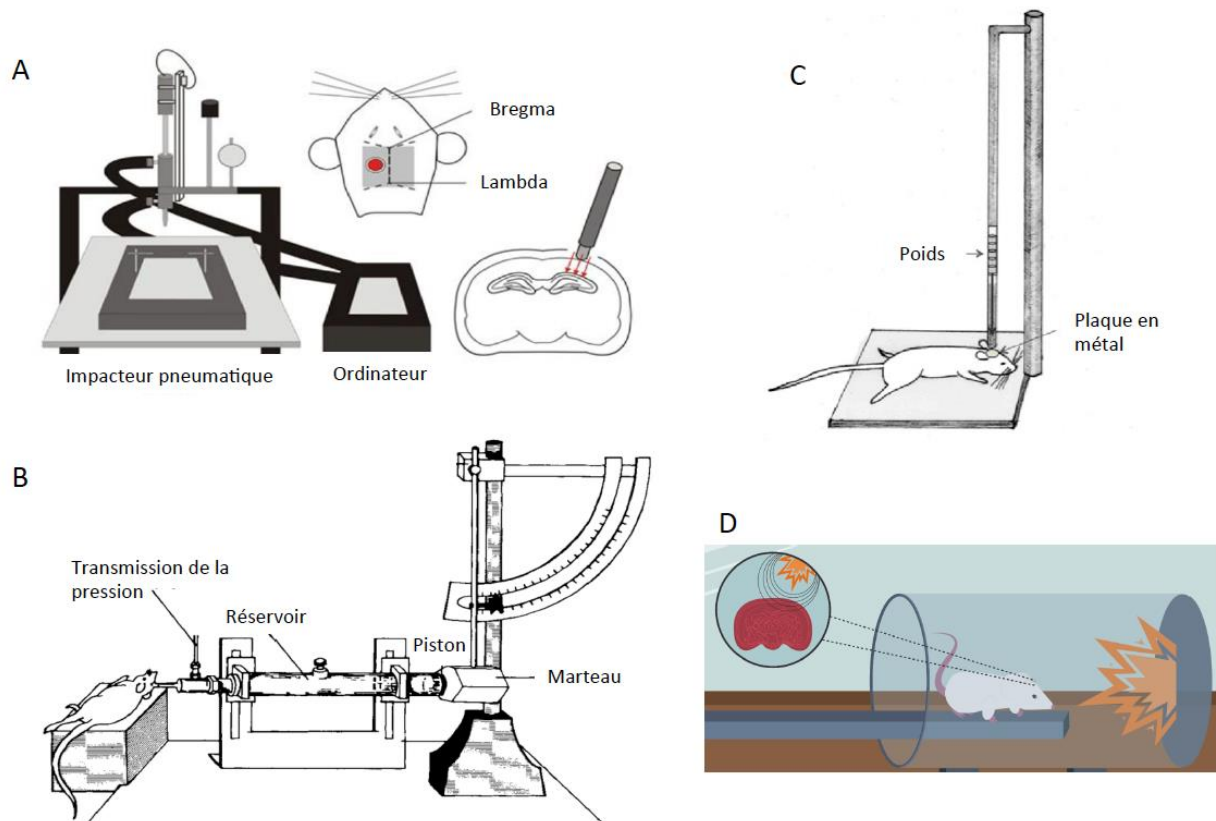


Figure 3. Modèles de traumatisme crânien les plus employés dans la littérature. A) Dans le modèle de l'impact cortical contrôlé, la souris est placée dans un cadre stéréotaxique où son crâne est maintenu fixe par des barres. Après réalisation de la craniotomie, l'impact est délivré à l'aide d'un impacteur pneumatique situé au-dessus de la souris, avec des paramètres choisis et contrôlés par un ordinateur. **B)** Dans le modèle de la percussion de fluide, la souris est également placée dans un cadre stéréotaxique. Un tube rempli de sérum physiologique et connecté à une seringue est directement fixé autour de la craniotomie. Un marteau vient frapper le piston de la seringue, transférant la force générée par le biais d'une onde dans le liquide qui va percuter le cerveau. **C)** Le lâcher de poids peut se faire avec la tête de l'animal fixée ou non. Les lésions engendrées seront alors plus focales ou diffuses, respectivement. Quelquefois une plaque en métal est fixée sur le crâne de l'animal puis le poids est lâché d'une hauteur prédéfinie, à travers un tube qui le guide. **D)** La souris est placée dans un cylindre fermé d'un côté au niveau duquel une forte pression est produite par le biais d'air comprimé ou d'une déflagration.

3.1 Comparaison des différents modèles

Le modèle de la déflagration est particulièrement intéressant pour les TC militaires, quoique difficile à mettre en place. De plus les civils constituent la majorité des TC et sont généralement exposés à des TC focaux. Parmi ceux-ci, les modèles de lâcher de poids présentent bien évidemment l'avantage d'être plus ressemblants à ce qui peut se passer dans la réalité chez l'homme. De plus l'absence de craniotomie permet de limiter l'inflammation chez les animaux contrôles. Néanmoins, ils sont moins facilement reproductibles de par l'imprécision du lieu exact sur lequel le poids tombe. Il est également difficile de contrôler la force exacte générée par le poids, ce qui peut induire des fractures et des hémorragies chez certains animaux. Cette répétabilité est l'avantage des modèles chirurgicaux. Ils permettent de contrôler précisément le lieu du choc, en immobilisant la tête de l'animal par stéréotaxie, et les paramètres régulant sa sévérité, grâce à des instruments de mesure très précis. Cependant, les chirurgies nécessaires pour les réaliser sont plus fastidieuses, en particulier pour la percussion de fluide, et requièrent beaucoup plus de temps d'anesthésie que pour le lâcher de poids (Johnson et al., 2015). De plus, la réalisation d'une craniotomie nécessite l'emploi d'un groupe contrôle supplémentaire, le groupe témoin opéré ou « sham », qui subit l'ensemble de la chirurgie à l'exception de l'impact. Nous verrons par la suite que la craniotomie n'est pas neutre et qu'il serait important de toujours contrôler ses effets propres, avec l'utilisation de deux groupes contrôles (naïf et sham).

Dans l'ensemble ces modèles génèrent normalement une augmentation de la pression intracrânienne, à la fois au moment de l'impact, et par la l'arrivée de contusion, d'œdème ou d'hématome. Cependant, les modèles nécessitant une craniotomie limitent les conséquences délétères du TC en soulageant la pression intracrânienne (Rossini et al., 2019). Puisque nous cherchons à étudier les effets d'un TCL, les modèles avec craniotomie ont cet avantage. Le modèle de l'impact cortical contrôlé avec des paramètres de sévérité légers, par rapport au modèle de percussion de fluides, présente de plus l'avantage de générer beaucoup moins de pression intracrânienne au moment de l'impact.

3.2 Types de lésions générées

Certains aspects des TC humains sont plus difficilement modélisables. En effet, le volume et le poids élevé du cerveau humain lui confèrent des propriétés physiques qui le rendent particulièrement vulnérable à la contraction/dilatation, et donc aux lésions plus diffuses causées par les phénomènes d'accélération et de décélération. Les mouvements relatifs de régions distantes peuvent causer un déchirement des fibres projetant d'une région cérébrale à l'autre, une manifestation pathologique nommée « lésions axonales diffuses ». La petite taille du cerveau de rongeur en fait une masse plus difficilement « déformable » et donc moins sujette à ce type de dommages. C'est pourquoi les TC expérimentaux sont classifiés par leur nature focale ou diffuse, même si les TC focaux induisent tout de même des lésions diffuses (Figure 4). L'impact cortical contrôlé et la percussion de fluide sont donc des modèles focaux. Le lâcher de poids, quant à lui, est plutôt focal si le crâne est maintenu en place lors de l'impact, et plutôt diffus sinon, du fait de l'accélération de la tête produite par l'impact du poids (Figure 4). Une déflagration quant à elle produit des lésions diffuses du fait de la propagation de l'onde de choc dans tout le corps, incluant le cerveau (Johnson et al., 2015).

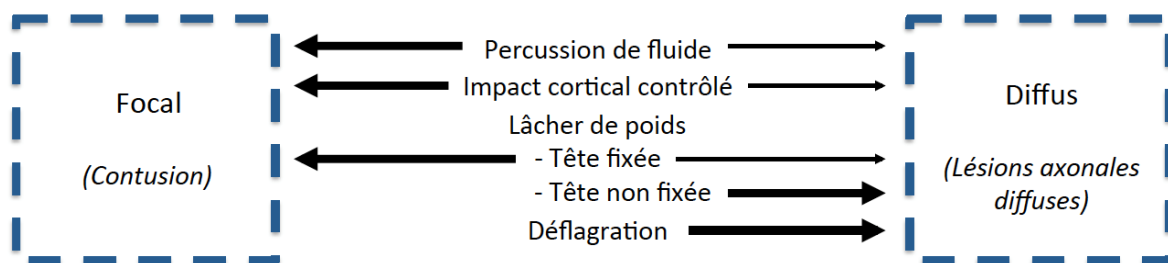


Figure 4. Nature des lésions causées par divers types de traumatismes crâniens. Adapté d'après Johnson et al. (2015)

4. Neurobiologie et progression du traumatisme crânien

4.1 Le traumatisme crânien en tant que trouble neurodégénératif

Un des arguments les plus convaincants pour considérer le TC comme un trouble neurodégénératif est le risque accru de maladie d'Alzheimer ou de démence suite à un TC modéré ou sévère (Nemetz et al., 1999; Plassman et al., 2000). En effet, des plaques

amyloïdes bêta ($A\beta$) sont observées dans les années suivant un TC modéré ou sévère (Johnson et al., 2012) et il existerait une relation sévérité-dépendante entre celle-ci et la vulnérabilité à la démence post-TC (Plassman et al., 2000). Ces plaques, résultant de l'agrégation de grandes quantités de la protéine $A\beta$, sont la manifestation la plus connue de la maladie d'Alzheimer. Elles feraient partie de sa physiopathologie, accompagnant les lésions axonales et aggravant la neurodégénérescence. Le mécanisme derrière l'émergence de ces plaques après un TC n'est pas connu, mais elles s'accumulent à proximité des axones lésés. D'ailleurs, les premières visualisations des lésions diffuses post-TCL furent possibles à l'aide de marquages de la protéine $A\beta$: chez les individus TCL, on pouvait retrouver de l'immunoréactivité $A\beta$ alors qu'elle était presque absente chez les individus normaux (Blumbergs et al., 1994). Parmi les victimes de TCL, les individus à risque génétique pour la maladie d'Alzheimer ont un cortex plus fin, ceci étant corrélé à des performances cognitives réduites (Hayes et al., 2017a). On retrouve aussi une diminution du volume de l'hippocampe chez les victimes de TCL répétés, mais il n'est pas clair que celle-ci ait eu lieu suite à une TCL unique (Singh et al., 2014). Malheureusement, les preuves concernant les atteintes suivant un TCL unique manquent chez l'homme puisque ce type de patients est mal détecté et bénéficie de peu de suivi (McKee & Robinson, 2014).

Ce sont les modèles animaux qui permettent le plus facilement d'étudier la neurodégénérescence post-TC. Les preuves basées sur l'immunoréactivité $A\beta$, montrent que celle-ci accompagne le gonflement, puis la dégénérescence des axones (McKee & Robinson, 2014). Un article récent employant la technique CLARITY, permettant de rendre le cerveau transparent et donc d'étudier sa microstructure tridimensionnelle plus en détail, suggère que ce processus est assez progressif (Weber et al., 2019). Les auteurs ont montré que les plaques $A\beta$ apparaissent effectivement avec les lésions axonales diffuses initiales lors du TC. Néanmoins, ces plaques ne sont pas nécessairement synonymes de gonflement et de dégénérescence axonale secondaire (Weber et al., 2019). Les atteintes neuroanatomiques secondaires post-TCL mettraient donc un certain temps à émerger, soulignant l'importance de trouver des marqueurs permettant d'identifier les individus à risque.

4.2 Progression des lésions secondaires après un traumatisme crânien

4.2.1 L'imagerie par tenseur de diffusion

La neurodégénérescence post-TC est souvent étudiée à travers l'évolution de la substance blanche. Chez l'homme, son état est généralement évalué en imagerie par résonance magnétique (IRM), notamment grâce à la technique du tenseur de diffusion : par l'analyse du mouvement des molécules d'eau, il est possible de déduire la microstructure des axones. Cette méthode, empiriquement validée, est utilisée pour étudier les fibres de substance blanche grâce à sa haute résolution et a permis de montrer nombre d'anomalies structurelles post-TC (Figure 5 ; Sharp & Ham, 2011). Chez l'animal, les descriptions de la substance blanche se font généralement par le biais d'immunohistochimies de la protéine MBP (décrite plus en détail section 4.2.3), et les observations que l'on fait par cette méthode sont généralement assez cohérentes avec celles réalisées en tenseur de diffusion chez l'homme (Herrera et al., 2017).

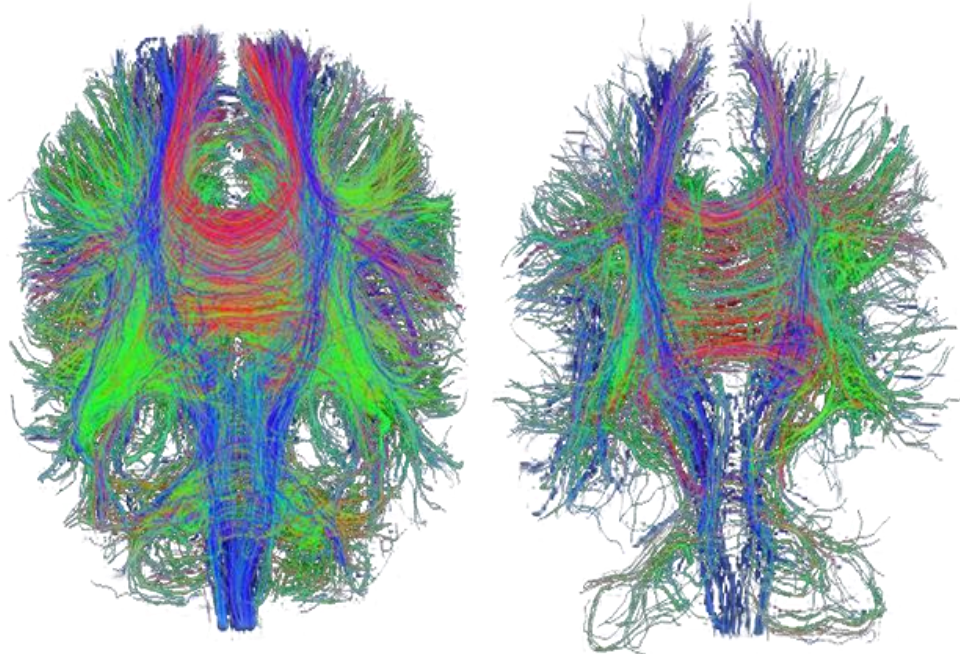


Figure 5. Type d'image obtenue par la technique du tenseur de diffusion. À gauche, un cerveau normal, à droite, le cerveau d'un patient ayant subi un TC sévère. Les diverses couleurs représentent des fibres le long d'axes différents. *D'après www.center-tbi.eu (2019b).*

4.2.2 Dégénérescence de la substance blanche

Chez des individus TC modérés, des lésions axonales diffuses peuvent être observées dans les jours suivants le TC, et celles-ci persistent 6 mois plus tard. En particulier, on observe une détérioration du corps calleux (CC) dans la phase aiguë, dont l'état s'aggrave à 6 mois post-TC (Kumar et al., 2009). Le CC est une des commissures du cerveau, c'est-à-dire une région constituée de faisceaux d'axones faisant le « câblage » entre des parties distantes. Le CC est la plus large commissure du cerveau et assure le lien entre les deux hémisphères cérébraux. Les axones passants par le CC sont particulièrement myélinisés, c'est donc un lieu privilégié pour l'étude des atteintes de la substance blanche. Chez les individus TCL on retrouve des atteintes similaires de la substance blanche : une étude longitudinale récente a pu montrer que des lésions axonales diffuses dans des réseaux de fibres frontaux et du CC sont observées dès la première semaine post-TC. Alors que les réseaux frontaux montraient des signes de réparation à 1 et 3 mois post-TC, la dégénérescence continuait de façon progressive dans le CC. Celle-ci était par ailleurs associée à la présence de symptômes de stress post-traumatique et de dépression (Yin et al., 2019).

4.2.3 La « myelin basic protein »

Chez l'animal, les atteintes de la substance blanche sont principalement étudiées *via* la MBP. Dans le système nerveux central, ce sont les oligodendrocytes qui génèrent la gaine de myéline entourant les axones des neurones. La gaine de myéline sert à protéger, nourrir, et faciliter la conduction des courants dans les axones connectant des régions distantes. Elle est constituée principalement de lipides et de protéines. Parmi les protéines, la MBP constitue environ 30% de la masse totale, faisant d'elle un bon marqueur de l'état de la myéline (Manivannan et al., 2018). Par ailleurs, la densité de MBP est corrélée à la présence de lésions axonales diffuses en imagerie par tenseur de diffusion (Chang et al., 2017), elle est donc un bon indicateur des lésions neuronales. Après un TC, il est observé chez l'homme une augmentation de la MBP dans le fluide cébrospinal et le sérum, probablement du fait de sa libération suite aux lésions axonales, par le biais d'une BHE très endommagée. Rappelons que la présence de débris

de myéline favorise le recrutement de microglies et de macrophages, propageant la neuroinflammation et augmentant la neurodégénérescence (Armstrong et al., 2016). À l'inverse, les diminutions de MBP au niveau de la substance blanche indiquent de la dégénérescence neuronale. Certains auteurs suggèrent d'ailleurs l'utilité des niveaux de MBP comme facteur prédictif de la gravité du TC (Manivannan et al., 2018).

De façon similaire à ce qui est observé chez l'homme, on constate des atteintes de la substance blanche chez l'animal post-TC. Des études de notre laboratoire ont pu mettre celles-ci en évidence. Dans le CC, un TCL par impact cortical contrôlé induit une diminution de la MBP dans le CC dès le 7^{ième} jour, qui se maintient jusqu'à 3 mois. Ceci est associé à des altérations de structure de la gaine de myéline observée en microscopie électronique (Taib et al., 2017).

4.2.4 Neurodégénérescence hors substance blanche

On retrouve aussi de la dégénérescence touchant d'autres régions que la substance blanche. Vingt-huit jours après un TCL par percussion de fluide, on peut voir de la neurodégénérescence au niveau du cortex directement atteint, mais aussi de l'hippocampe (Aungst et al., 2014). L'hippocampe ipsi- et contro-latéral étaient tous deux atteints suggérant la vulnérabilité de cette région et reflétant les connexions inter-hémisphériques. L'hippocampe serait si vulnérable que même une incision au niveau du scalp suffirait pour induire des niveaux de neurodégénérescence hippocampique comparables à ceux induits par un TC (Ezaki et al., 2016). La neurodégénérescence dans l'hippocampe a un impact fonctionnel puisqu'elle est associée à un déficit de la plasticité synaptique nécessaire aux apprentissages (Aungst et al., 2014). Cette neurodégénérescence progressive a aussi été retrouvée suite un TCL à crâne fermé. À 4 jours post-TC, celle-ci n'affecte pas encore l'hippocampe. À 9 jours en revanche, il y a une diminution de la densité neuronale dans l'hippocampe, associée à une augmentation de l'apoptose dans cette région (Meyer et al., 2012). Les auteurs se sont aussi intéressés à l'amygdale, une autre région du système limbique impliquée dans les émotions, en particulier dans les mémoires et les comportements de peur. De façon étonnante, le TC avait dans cette région l'effet inverse : une augmentation de son aire et de sa densité neuronale, associées à une diminution de l'apoptose (Meyer et al., 2012). Ce paradoxe

apparent pourrait être expliqué par l'existence d'un « bras de fer » entre la réponse inflammatoire et neurotrophique, les deux faces de la récupération post-traumatique. D'un côté, le système doit identifier et nettoyer les dommages induits par la blessure, de l'autre, il doit déterminer ce qui peut être sauvé et réparé. L'équilibre entre ces deux processus serait différent en fonction de la région considérée.

4.3 Importance de l'activation astrocytaire dans la neuroréparation après un traumatisme crânien

À côté de cette dégénérescence progressive de la substance blanche et de l'hippocampe, on peut observer une augmentation de la « glial fibrillary acidic protein » (GFAP) dans le CC et l'hippocampe (Ojo et al., 2014). La GFAP est la constituante principale des filaments astrocytaires, et son expression augmente lors de l'activation des astrocytes. Suite à un TC, les astrocytes sont activés par certaines cytokines. Leur activation permet la régulation du stress cellulaire, de limiter les dommages tissulaires, et de rétablir l'homéostasie. Les astrocytes vont permettre la sécrétion de facteurs neurotrophiques et ainsi promouvoir la neuroréparation (Pekny & Pekna, 2014). L'augmentation de GFAP qui survient suite au TC indique une activation astrocytaire, et donc un effort de neuroréparation (Ojo et al., 2014).

4.3.1 Neuroréparation, neurogenèse et facteurs trophiques

La neuroréparation englobe un ensemble de phénomènes conduisant à une récupération neurologique et fonctionnelle suivant une atteinte physique. Ces phénomènes peuvent avoir un effet indirect. Par exemple, l'angiogenèse, qui favorise l'irrigation des zones atteintes par une lésion. Ils peuvent aussi être plus directs en favorisant la remyélinisation et la réparation des fibres atteintes *via* l'oligodendrogenèse, c'est-à-dire la prolifération et la croissance des oligodendrocytes, qui vont par la suite reconstituer la gaine de myéline. Finalement, la neuroréparation peut impliquer de la neurogenèse, qui permet de remplacer certains des neurones perdus. Nous avons principalement décrit la réponse inflammatoire post-TC comme un processus favorisant

la neurodégénérescence et inhibant la neurogenèse (Acosta et al., 2013), mais comme nous allons le voir cette réponse a aussi un rôle bénéfique.

Comme décrit précédemment, l'inflammation va conduire à l'activation des astrocytes. Par le biais d'une signalisation trophique, les astrocytes vont à leur tour stimuler la prolifération cellulaire. En particulier, on peut observer une augmentation de la prolifération de cellules souches progénitrices de neurones dans l'hippocampe lors de la phase inflammatoire aiguë (Bye et al., 2011; Gao & Chen, 2013). En se différenciant en neurones, ces cellules souches pourraient éventuellement conduire à la neurogenèse, et donc, suite à leur migration, la neuroréparation des aires endommagées par le TC. Néanmoins, leur prolifération ne conduit pas nécessairement à la neurogenèse à cause de la surrégulation de la réponse inflammatoire chronique. L'hyperactivité des microglies limiterait l'intégration des précurseurs de neurones dans les régions atteintes, et donc la neuroréparation (Loane & Kumar, 2016). Néanmoins, les microglies réactives ne sont pas nécessairement néfastes suite à une blessure cérébrale puisqu'elles favorisent le nettoyage des débris de myéline, décrit précédemment, et sont un lieu majeur de production d'IGF1, un facteur trophique essentiel dans la neuroréparation post-TC (Scheepens et al., 2000). Étant donné que les débris de myéline inhibent la prolifération des oligodendrocytes, un certain niveau d'activation microglial est nécessaire pour éliminer ces débris et donc permettre la neuroréparation post-TC (Armstrong et al., 2016). La remyélinisation de la substance blanche a d'ailleurs été observée dans les semaines suivant un TC, et des astrocytes réactifs et microglies activées sont présents dans les mêmes zones de substance blanche (Mierzwa et al., 2015). Rappelons qu'à ce stade les microglies de type M1 sont pro-inflammatoires et délétères et que le type microglial M2 lui, est anti-inflammatoire et bénéfique. En effet, alors que les microglies M1 bloquent l'oligodendrogenèse (Butovsky et al., 2006a), ceux de phénotypes M2, par le biais de la libération d'IGF1, vont favoriser à la fois l'oligodendrogenèse et la neurogenèse (Butovsky et al., 2006b). Notamment, il a été montré que la sécrétion d'IGF1 est inhibée par la stimulation pro-inflammatoire (Fan et al., 1996; Suh et al., 2013). D'un point de vue thérapeutique, il serait nécessaire de faire pencher la balance neuroinflammation/neuroréparation en faveur de la neuroréparation et la production de facteurs trophiques comme IGF1 et IGF2 qui sont protecteurs vis-à-vis de l'apoptose induite par les cytokines (Suh et al., 2013). Cette stratégie a été tentée avec l'administration d'érythropoïétine (un facteur trophique favorisant, entre autres, la

prolifération des précurseurs neuronaux), et il a été montré que celle-ci favorise la neurogenèse, diminue les microglies réactives dans l'hippocampe, et améliore l'apprentissage spatial (Zhang et al., 2012).

En conclusion, bien que le TC puisse être considéré comme un trouble neurodégénératif, il engendre de la neuroréparation visant à rétablir les fonctions cérébrales. Les facteurs trophiques jouent donc un rôle essentiel dans le devenir à long terme des patients, et pourraient ainsi être utilisés en tant que marqueurs de l'évolution de la pathologie, mais aussi en tant que cibles d'intervention thérapeutique. Nous discuterons le rôle des différents facteurs trophiques dans la troisième partie de cette introduction.

4.4 L'étude de la neuroanatomie du traumatisme crânien

4.4.1 Rappels anatomiques

Dans le cadre de la vulnérabilité aux troubles psychiatriques suite au TC, nous porterons surtout nos discussions sur les altérations anatomiques affectant les régions impliquées dans ces troubles. Dans le contexte des mémoires de peur et de l'anxiété, les régions qui nous intéressent principalement, aussi bien chez l'homme que chez le rongeur, sont le cortex frontal, l'amygdale, et l'hippocampe. Ces régions font partie du système limbique, principalement connu pour son rôle dans l'émotion et la motivation, mais aussi son rôle dans la mémoire à long terme et la mémoire de peur.

Situé à l'avant du cerveau dans la partie frontale (Figure 6), le cortex frontal est sans doute la région cérébrale la plus caractéristique des mammifères. Elle est impliquée dans les comportements cognitifs complexes, comme l'attention et la mémoire, la personnalité, la prise de décision, et régule les émotions. Le cortex frontal est subdivisé en plusieurs parties incluant le CPF et le cortex cingulaire antérieur (CCA). Le cortex cingulaire antérieur (dont la partie dorsale correspondrait fonctionnellement à l'aire prélimbique chez la souris (VanElzakker et al., 2014); Figure 6) est impliqué dans les apprentissages motivés (Fitzgerald et al., 2018), et son importance a été soulignée dans la dépression. En lien avec les comportements de peur, le CCA est impliqué dans la perception et la discrimination des stimuli neutres et menaçants. Le CPF, lui, est impliqué

dans la régulation des émotions et la cognition. Chez l'homme, il peut être subdivisé en 4 régions prenant en charge des aspects plus fins de la régulation émotionnelle et cognitive. Celles-ci projettent de manière différentielle vers des régions sous corticales comme l'amygdale, l'hippocampe, et le thalamus, aussi impliquées dans les fonctions cognitives et émotionnelles. L'amygdale (Figure 6), région centrale dans l'émotion et la motivation, est un des centres les plus étudiés dans l'expression et la consolidation des mémoires de peur (VanElzakker et al., 2014). Elle comporte plusieurs noyaux dont l'anatomie et les fonctions précises seront décrites en détail dans la partie sur l'ESPT (chapitre, 2 section 3.3). L'hippocampe (Figure 6) est le lieu principal de formation et de stockage de la mémoire à court et long terme, notamment la mémoire épisodique, contextuelle et spatiale. Ces différentes régions sont assez distantes, et nécessitent donc des réseaux de fibres de substance blanche pour assurer leur communication. Le CC (Figure 6) remplit en partie ce rôle, mais la région principalement impliquée dans ces connexions réciproques est le septum.

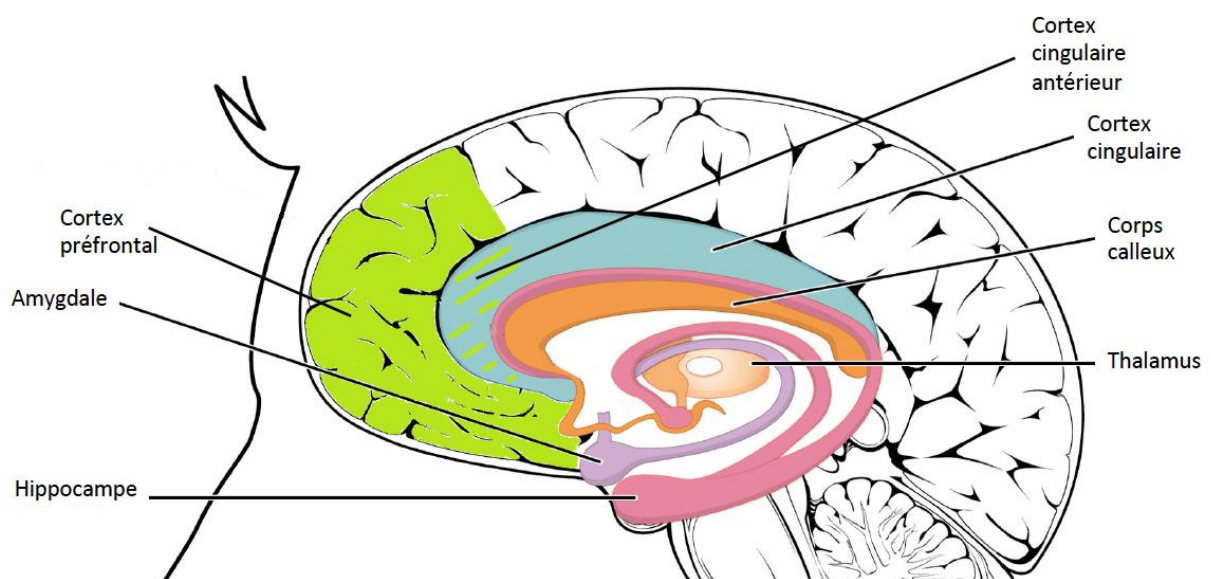


Figure 6. Régions anatomiques importantes en psychiatrie et pouvant être affectées dans le TC. Le cortex frontal impliqué dans l'émotion et la cognition couvre l'avant du cerveau et inclut le CPF (vert) et le CCA (hachuré en vert), la partie antérieure du cortex cingulaire (bleu). L'hippocampe, centre de la mémoire, est en rose, et l'amygdale, centre émotionnel et de la peur en violet clair. Le thalamus, carrefour sensoriel, est en orange claire au centre du cerveau, et le corps calleux, constitué de fibres de substance blanche, en orange foncé.

Bien évidemment, la neurobiologie des atteintes psychiatriques post-TC est plus complexe et peut mettre en jeu d'autres régions. Par exemple, l'*insula* est impliquée dans la conscience intéroceptive des états émotionnels et le thalamus dans la transmission des signaux sensoriels entre régions corticales et sous-corticales. Néanmoins, les régions

principalement impliquées dans les comportements qui nous intéressent sont celles décrites plus haut.

4.4.2 Techniques d'étude neuroanatomique

Les considérations anatomiques sont centrales dans l'évaluation des déficits fonctionnels générés par le TC, et les diverses techniques d'étude apportent des informations de nature différente. Les atteintes neurobiologiques post-TC sont le plus souvent étudiées en imagerie par résonance magnétique (IRM). Cette technologie peut s'intéresser aux caractéristiques purement anatomiques de régions d'intérêts, comme le volume, l'épaisseur ou la forme. Elle peut aussi, comme avec la technique du tenseur de diffusion décrite précédemment, s'intéresser à l'interconnexion des régions. Dans ce cas, c'est par l'étude de la diffusion de l'eau dans les fibres de substance blanche, décrite précédemment (chapitre 1, section 4.2.1). Avec l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf), il est possible d'étudier les flux sanguins cérébraux par le biais de la consommation d'oxygène, afin de déduire l'activité et le rôle fonctionnel de régions d'intérêt. Avec cette dernière technique, on suppose qu'une région s'active lorsque le flux sanguin qui l'irrigue augmente. En s'intéressant aux corrélations entre l'activité de différentes régions, il est possible d'extrapoler la connectivité fonctionnelle de ces régions. Cette mesure de la communication interrégion permet, en l'absence de défauts anatomiques visibles, d'expliquer des altérations comportementales ou cognitives (Xiao et al., 2015).

4.5 Altérations anatomiques et lien avec la cognition et l'émotion

À plus ou moins long terme, des symptômes psychiatriques et atteintes cognitives sont fréquemment rapportés chez les patients ayant subi un TCL, et ceux-ci peuvent être liés aux altérations neuroanatomiques. Par exemple, il existe des défauts de la substance blanche au niveau du CPF chez les victimes de TCL souffrant de maux de tête (Leung et al., 2018). Si les atteintes cognitives diminuent avec le temps, jusqu'à 44% des victimes continuent de rapporter des symptômes psychiatriques à un an (Dikmen et al., 2010). Ces

patients présentent généralement un trouble psychiatrique comme la dépression ou l'ESPT (Losoi et al., 2016).

4.5.1 Données cliniques

- Neuroanatomie du TC modéré-sévère

En ce qui concerne les altérations anatomiques, des diminutions de volumes, à la fois dans les aires corticales et dans la substance blanche, ont été largement documentées chez les victimes de TC sévère (Farbota et al., 2012; Trivedi et al., 2007). On dénote aussi des atrophies de régions impliquées dans les comportements de peur comme l'amygdale, l'hippocampe et le thalamus (Rushby et al., 2016), ou encore le cortex frontal (Farbota et al., 2012). Les diminutions du volume de l'hippocampe et du fornix sont corrélées à la sévérité du TC (Tate & Bigler, 2000), mais aussi à la diminution de la mémoire (Tomaiuolo et al., 2004). De plus, la diminution du volume de l'hippocampe est plus forte chez ceux qui ont développé des troubles de l'humeur (Jorge et al., 2007). Au tenseur de diffusion, on observe également des détériorations dans les connexions neuronales à la fois dans la substance grise et dans la substance blanche (en particulier le CC), et ce plusieurs années après le TC (Bendlin et al., 2008; Xu et al., 2007). Les diminutions de substance blanche sont corrélées à la baisse des capacités cognitives (Farbota et al., 2012). En effet l'état de la substance blanche est un des meilleurs prédicteurs des déficits cognitifs : chez les patients qui récupèrent, une amélioration de la structure et de la circulation au sein des axones peut être observée (Sidaros et al., 2008). En revanche, les marqueurs purement neuroanatomiques et les capacités cognitives post-TC peuvent parfois être découplés. Chez certaines victimes les capacités cognitives ne s'améliorent que des années plus tard, mais ceci traduit un rétablissement fonctionnel plutôt que neurobiologique : le volume de l'hippocampe, diminué 1 an post-TC, reste réduit 8 ans plus tard, et le volume du CC continue à diminuer pendant ce temps (Tomaiuolo et al., 2012).

- Neuroanatomie du TC léger

Chez les individus TCL ce sont surtout des lésions axonales diffuses et des altérations de la substance blanche que l'on retrouve, à la fois à moyen terme, 3 mois post-TCL (Yuh et al., 2013), et à long terme, des années après le TC (Kraus et al., 2007).

Des atteintes plus subtiles peuvent également être observées, par exemple une altération de la vascularisation du CPF, conduisant à une baisse de l'oxygénation de cette région lors d'une tâche cognitive (Vacchiano & Silva, 2017). Néanmoins, les atteintes axonales ou de substance blanche restent le type d'observation neurobiologique principal après un TCL et pourraient être impliquées dans la survenue à long terme de la vulnérabilité psychiatrique des patients TCL. Elles sont la cause principale des atteintes cognitives : l'étendue des lésions du CC après un TCL est corrélée au temps de réaction lors de réponses dans des tâches d'attention (Niogi et al., 2008). On retrouve aussi des atteintes de la substance blanche dans le CCA, et plus diffusément dans le cerveau entier, qui sont corrélées à des déficits de la mémoire verbale et de l'attention (Zhou et al., 2013). Encore une fois, la gravité du déficit d'attention est moins expliquée par la présence de lésions focales dans des régions précises, que par les altérations globales des réseaux de substance blanche (Bonnelle et al., 2011). En effet, il est de plus en plus accepté que la caractérisation neuroanatomique du TC devrait se faire par l'étude des altérations subies par des réseaux neuronaux plutôt que des régions d'intérêt, puisque ce sont généralement celles-ci qui sont prédictives de troubles cognitifs (Sharp & Ham, 2011). Néanmoins, la substance blanche n'est pas la seule vulnérable au TC. Par exemple, chez des athlètes universitaires exposés à des TCL sportifs, une atrophie de l'hippocampe a été trouvée. Comme une relation inverse a été trouvée entre la durée de participation aux activités sportives universitaires en l'absence de TC déclaré, et le volume de l'hippocampe, il semblerait que même des TC en dessous du seuil diagnostique peuvent constituer un risque neurologique (Singh et al., 2014).

- *Neuroanatomie fonctionnelle du TC léger*

Un des réseaux neuronaux d'intérêt est le réseau appelé « mode par défaut » (MPD). Il est constitué de l'activité synchrone de régions impliquées dans les fonctions cognitives supérieures, notamment les lobes pariétaux inférieurs, le gyrus frontal supérieur, le cortex cingulaire postérieur, et le CPF. On observe l'activation du MPD chez un individu au repos dont l'attention n'est pas accaparée par une tâche, et il est impliqué dans la préparation face aux modifications de l'environnement (Zidda et al., 2018). Les déficits de substance blanche sont généralement corrélés aux altérations du MPD (Bonnelle et al., 2011). L'étude du MPD permet ainsi de voir des conséquences fonctionnelles du TCL là où les lésions ne sont pas nécessairement très impressionnantes.

Dans les semaines suivant le TCL, des altérations de la connectivité fonctionnelle du MPD sont observées. Notamment, une augmentation de la connectivité fonctionnelle du CPF avec le CCA, mais aussi une augmentation de la connectivité au sein du MPD, qui ont été interprétées comme une compensation en réponse à des atteintes cognitives ou psychiatriques, respectivement (Zhou et al., 2012). Par ailleurs, une corrélation négative existe entre la connectivité du CPF avec le MPD et le niveau de dépression et d'anxiété (Zhou et al., 2012). Des irrégularités ont aussi été trouvées dans les réseaux thalamiques de repos, notamment une augmentation de leur activité corrélée aux symptômes post-trauma, mais aussi au score de dépression (Tang et al., 2011). Nous avons donc des altérations de la connectivité fonctionnelle du MPD qui sont liées aux conséquences psychiatriques du TC. Au vu de l'importance des différentes régions évoquées dans les comportements de peur, ces altérations de connectivité pourraient aussi être impliquées dans la vulnérabilité post-TC à l'ESPT. Le MPD est également le sujet d'étude dans le cadre de l'ESPT, et nous en reparlerons dans la partie dédiée à ce sujet.

4.5.2 Modèles animaux, lésions primaires et secondaires

Chez l'animal des résultats sensiblement similaires à ceux obtenus chez l'homme ont été trouvés. Les TC modérés ou sévères peuvent causer des atteintes neuroanatomiques claires, mais les TCL vont surtout affecter la substance blanche. Ceci dépend également du modèle de TC employé : les TC par lâcher de poids auront des conséquences plus vastes et les TC focaux plus locales.

- Neuroanatomie du TC modéré-sévère

Lors d'un TC par lâcher de poids d'intensité modéré-sévère chez le rat, on peut observer des lésions dans l'hippocampe et le cortex frontal dans les jours suivant la blessure (Szczygielski et al., 2016) qui perdurent des mois après la blessure (Arulsamy et al., 2018). Celles-ci sont associées à une diminution de l'intégrité et du fonctionnement synaptique dans l'hippocampe. D'un point de vue comportemental, une diminution de la flexibilité cognitive ainsi que des comportements de type dépressifs apparaissent dès un mois post-TC (Arulsamy et al., 2018). Néanmoins, dans les modèles de TC par lâcher de poids, il est difficile de distinguer les lésions secondaires (résultant des mécanismes

décrits section 4.2) des lésions primaires causées par l'impact. D'une part, l'impact « résonne » à travers le crâne et, d'autre part, l'augmentation de la pression intracrânienne va induire des atteintes diffuses du fait de la compression du cerveau. Le modèle de l'impact cortical contrôlé est donc intéressant pour observer les conséquences diffuses d'une lésion locale. Avec un impact cortical sévère, on peut voir une atrophie de l'hippocampe et du CC, ainsi qu'un déficit de la mémoire spatiale dès les premiers jours (Smith et al., 1995). C'est dans les mois suivants que l'apparition des lésions secondaires est plus évidente. Les lésions progressent dans l'hippocampe et s'étendent au cortex pariétal postérieur. On observe aussi une diminution de l'épaisseur du cortex controlatéral, et l'ensemble de ces modifications se fait conjointement à une diminution de la mémoire spatiale, comme dans les premiers jours post-TC (Kamper et al., 2013). Les atteintes physiques et cognitives dépendent de la sévérité : le volume de l'hippocampe et l'ampleur du déficit de mémoire spatiale augmentent avec la sévérité du TC (Washington et al., 2012). En ce qui concerne les aspects psychiatriques, notamment les comportements de type dépressif ou anxieux, la sévérité semble ne pas les moduler. Ainsi, dans un modèle d'impact cortical contrôlé il a été montré que les différents degrés de sévérité augmentent les comportements à risque et de type dépressifs dans les mêmes proportions (Washington et al., 2012).

- *Neuroanatomie du TC léger*

Lorsque le TC par lâcher de poids est léger, on n'observe pas d'altérations macroscopiques régionales dans les jours suivants. Néanmoins, des lésions axonales diffuses (observées en IRM) similaires à celles observées chez l'homme sont présentes dans les faisceaux de fibres comme le splénium et la fimbria. Celles-ci sont associées à des diminutions de la MBP, qui touchent aussi le CC (Herrera et al., 2017). De façon intéressante, ces lésions ne sont pas présentes à proximité de l'impact, et l'imagerie par tenseur de diffusion révèle qu'elles affectent les divers faisceaux de substance blanche, montrant bien leur vulnérabilité au TC (Kikinis et al., 2017). Dans le modèle de l'impact cortical contrôlé, le TCL, comme le TC sévère, induirait une progression de la lésion primaire en lésions secondaires. Alors que la contusion est seulement présente au niveau du cortex lésé dans les deux jours post-TC, l'hippocampe et les cortex plus distants sont aussi affectés après une semaine (Hall et al., 2008). Le marquage employé dans cette étude a par ailleurs permis de montrer que les corps cellulaires sont atteints dans des

régions portant des projections afférentes et efférentes, traduisant un fois de plus la vulnérabilité des réseaux neuronaux. Après quelques semaines, on peut ainsi voir des astrocytes réactifs et de l'inflammation dans le thalamus (Hazra et al., 2014) ainsi que dans les régions impliquées dans les comportements de récompense comme le noyau accumbens et l'aire tegmentale ventrale (Merkel et al., 2017). Ces altérations neurobiologiques se font conjointement à l'apparition de symptômes de type psychiatrique : le sommeil des animaux est perturbé à un mois post-TC (Hazra et al., 2014). De manière intéressante, c'est toujours dans la substance blanche que l'on voit le plus d'altérations. Dans les études d'IRM et de spectroscopie, on observe l'apparition de lésions axonales diffuses dans les heures post-TCL (Xu et al., 2011), qui continuent de progresser dans les semaines suivantes (Makinde et al., 2018). Ici encore, les études d'IRM montrent que le CC est particulièrement vulnérable (Li et al., 2016). Chez l'animal, les atteintes de la substance blanche sont généralement prédictives des troubles de mémoire (An et al., 2016) et les altérations en imagerie par tenseur de diffusion et les niveaux de MBP dans la substance blanche corrélerent avec les performances de mémoire spatiale (Cengiz et al., 2011). Une des études les plus détaillées des conséquences à long terme d'un TCL chez l'animal a été menée par notre laboratoire. Celle-ci a pu montrer que plusieurs mois après un TCL, conjointement à l'atrophie du CC, on peut observer une diminution de l'anxiété dans un « open field » et dans le test de la croix surélevé. On voit également une diminution de la flexibilité cognitive dans un test évaluant la mémoire spatiale : le test de Barnes (Taib et al., 2017). De façon intéressante, si l'atrophie du CC apparaît dès la première semaine, les altérations comportementales n'apparaissent qu'à 3 mois. En lien avec l'ESPT, le TC affecte aussi la mémoire de peur. Par exemple, une percussion de fluide diminue la densité synaptique dans le cortex infralimbique, et ceci pourrait être associé à un déficit de l'extinction de la mémoire de peur (Zhao et al., 2017).

5. Le traumatisme crânien : facteur de vulnérabilité psychiatrique

Au vu des altérations décrites précédemment, il n'est pas surprenant que le TC prédispose aux troubles psychiatriques, comme cela a clairement été montré dans une méta-analyse récente (Perry et al., 2016). Chez les civils, une étude a pu montrer une multiplication par 2,8 de la probabilité de développer un trouble psychiatrique chez les

individus ayant un historique de TC (Bryant, 2011). Ce risque concernerait les troubles cognitifs, mais aussi anxieux. Par exemple, des pensées suicidaires ont été rapportées chez au moins 10% des victimes de TC dans l'année suivant l'accident, et les niveaux de troubles anxieux ou de dépression seraient entre 10 et 20% (Ahmed et al., 2017; Deb et al., 1999). Les estimations peuvent varier, mais le lien entre TC et troubles anxieux/dépressifs est assez clair : un rapport récent et important du « *Department of Veteran Affairs* » américain ayant fait une revue extensive de la littérature concernant la comorbidité TC/troubles psychiatriques a démontré que le TC est bien un facteur de risque pour l'anxiété et la dépression (Greer et al., 2019). Ce lien était particulièrement clair pour l'EPST avec une augmentation de 20% de sa prévalence. Étant donné que le TC peut conduire à des déficits mnésiques, *a priori* il ne devrait pas pouvoir être un facteur de vulnérabilité pour l'ESPT, particulièrement si le traumatisme a eu lieu en proximité avec le TC. Une étude a d'ailleurs montré chez des individus TC que l'intensité du souvenir de l'évènement traumatique en relation avec le TC était prédictive du risque de développer un ESPT (Gil et al., 2005). Néanmoins, les patients ESPT parviennent généralement à se souvenir de la détresse liée au trauma psychologique même si une forme d'amnésie les empêche de se souvenir des détails contextuels. Il a été montré chez les militaires qu'un TCL multiplie par 3 la probabilité de développer un ESPT (Bryant, 2011). Chez des civils ayant subi un TCL, 14% développaient un trouble de stress aigu dans le mois suivant l'accident. Après 2 ans, 73% de ceux ayant eu un trouble de stress aigu avaient développé un ESPT (Harvey & Bryant, 2000). Certains auteurs ont argumenté que la vulnérabilité de l'hippocampe suite au TC serait impliquée dans cette vulnérabilité à l'ESPT (voir chapitre 2 section 3.3 ; Ahmed et al., 2017).

Il est à noter que les troubles du sommeil sont assez fréquents après un TC (Grima et al., 2016), et, vu l'importance du sommeil en lien avec les désordres psychiatriques, on pourrait supposer une interaction entre sommeil et vulnérabilité psychiatrique (Sutton, 2014). En particulier, les troubles du sommeil sont fréquents dans l'ESPT. Cela pourrait sembler normal puisque l'ESPT est un trouble de stress, mais une étude longitudinale a montré que les troubles de sommeil précédant l'exposition à un évènement traumatisant étaient un facteur de risque pour la dépression et l'ESPT, et pas l'inverse (Gerhart et al., 2014). Ceci pourrait être lié à une perturbation des facteurs trophiques. En effet, le BDNF et l'IGF subissent des variations circadiennes (Cain et al., 2017; Stratakis et al., 1996). La

perturbation des facteurs trophiques suite aux troubles du sommeil post-TC pourrait limiter la neuroréparation et donc être impliquée dans la vulnérabilité psychiatrique.

Chapitre 2. L'état de stress post-traumatique

1. Histoire et définition

L'état de stress post-traumatique est un trouble anxieux qui se manifeste suite à l'exposition à un (ou des) évènement(s) traumatisant(s). Une de ses caractéristiques principales est l'altération du fonctionnement de la mémoire. D'un côté, on observe une hypermnésie d'indices sensoriels rappelant l'évènement traumatisant, conduisant l'individu à réinterpréter sa vie en fonction de celui-ci. De l'autre, les victimes ont une difficulté à se souvenir précisément du contexte de l'évènement, et une perte de la spécificité de leur mémoire les conduit à mal interpréter des indices contextuels. Une phrase se référant au passé dans une conversation, ou des sons, images, et odeurs peuvent ainsi générer une forte anxiété, un phénomène appelé généralisation de la peur. Finalement, on observe chez ces individus d'autres altérations plus générales de la mémoire, comme des déficits de la mémoire verbale, visuelle, ou de travail. Néanmoins, il n'est toujours pas clair si ces altérations sont vraiment le résultat de l'ESPT ou bien de facteurs de risque (Brewin, 2011).

1.1 L'état de stress post-traumatique dans l'histoire

Les descriptions les plus anciennes d'un état psychologique chroniquement altéré suite à l'exposition à un traumatisme remontent à l'antiquité. En effet, les guerres fréquentes de l'époque nécessitaient des confrontations au corps à corps qui devaient être particulièrement terrifiantes, et l'interprétation pathologique des cauchemars et de l'anxiété causée par la guerre, souvent appelée mélancolie ou nostalgie, avait déjà été faite par Hérodote, Xénophon, et Hippocrate (Battesti et al., 2017). Néanmoins, cette interprétation pouvait être remise en cause et le « diagnostic » de lâcheté était tout aussi fréquent, son traitement étant d'autant plus brutal. C'est dans l'ère moderne, d'abord avec Charcot puis Freud, son élève, qu'une caractérisation réellement psychologique de ce trouble a été proposée. On vit l'apparition de l'inconscient (ou subconscient selon l'école psychanalytique), dans lequel les souvenirs traumatiques étaient réfugiés, hors de

portée, inspirant des reviviscences inadaptées tandis que le reste de la conscience tentait de continuer son fonctionnement normal. Néanmoins, le trouble était alors considéré comme une névrose plutôt que causé par un stress extérieur. C'est ensuite pendant la Première Guerre Mondiale que l'ampleur du phénomène fut vraiment découverte, et il est estimé qu'un quart des blessés de l'armée française était atteint de troubles nerveux dont les symptômes pouvaient être très variés. L'ensemble de ces troubles fut regroupé sous l'appellation « shell shock », déjà évoquée précédemment (chapitre 1, section 1.1). Lors de la Première Guerre Mondiale, de par l'exposition répétée des soldats à des déflagrations, le « shell shock » (ou syndrome du « vent de boulet » pendant les guerres napoléoniennes) confondait le TC induit par l'explosion et le traumatisme psychique causé par une menace contre laquelle rien ne peut être fait. C'est possiblement ce mélange des causes qui pourrait expliquer la diversité des symptômes documentés, d'autant plus que ces deux troubles partagent certaines caractéristiques (Figure 7). C'est pendant la grande guerre que les services de psychiatrie de front furent mis en place, une procédure qui se développa encore pendant la Deuxième Guerre Mondiale et la guerre de Corée. En effet, il avait été remarqué que l'éloignement du front permettait un meilleur rétablissement des individus atteints. Ces précautions semblaient faire effet lors de la guerre du Vietnam, jusqu'à ce que les soldats ne soient revenus sur le territoire, développant des symptômes psychiatriques après des laps de temps variés. L'ampleur de ce phénomène, surprenant, donna naissance à des mouvements sociaux contestataires demandant des réparations. C'est alors qu'en 1980, l'état de stress post-traumatique fut décrit pour la première fois, dans le manuel de psychiatrie DSMIII. Sa définition incluait aussi les victimes civiles de viol, les femmes battues et les enfants maltraités (Battesti et al., 2017).

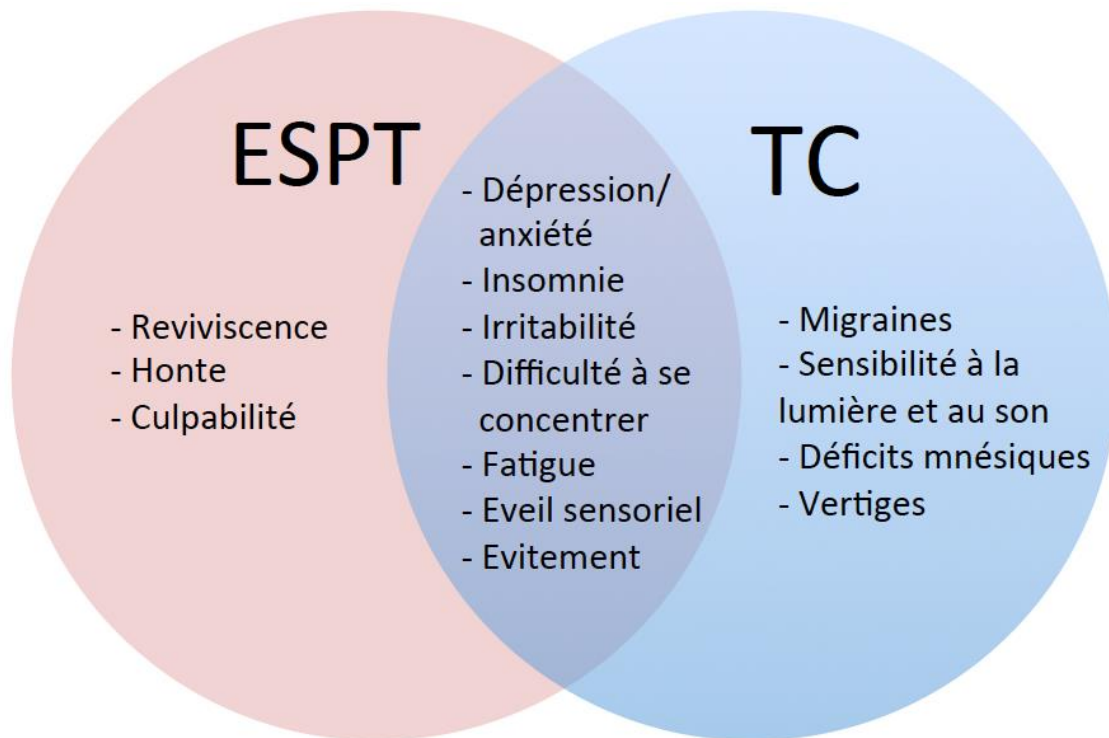


Figure 7. Symptômes affectant les patients TC et ESPT. Bien que chacun de ces deux troubles soit caractérisé par des symptômes qui leur sont propres, on peut voir qu'ils partagent un grand nombre de symptômes en commun. Repris d'après Stein et McAllister (2009).

1.2 Définition de l'état de stress post-traumatique

Un état de stress aigu est fréquent après un événement traumatisant, mais généralement transitoire. L'ESPT est une pathologie plutôt chronique caractérisée par la présence de trois classes de symptômes qui se maintiennent pendant plus d'un mois.

1) La présence de symptômes intrusifs : souvenirs ou cauchemars répétitifs de l'événement traumatisant, reviviscence de l'événement traumatisant ou réactions physiologiques intenses en réponse à certains stimuli. 2) La présence de symptômes d'évitement : évitement des pensées ou activités éveillant le souvenir du traumatisme, incapacité à se rappeler certains aspects importants du traumatisme, détachement vis-à-vis des activités antérieures à l'événement et des proches. 3) La présence de symptômes neurovégétatifs : perturbations du sommeil et de la concentration, irritabilité, hypervigilance. Plus récemment, dans le DSMV, certains des critères ont été subdivisés différemment même s'ils sont toujours présents, et d'autres ont été rajoutés. En particulier, une altération de la représentation personnelle, conduisant à une perception

exagérément négative de soi et du monde, et des idées déformées concernant l'événement qui induisent un sentiment de culpabilité ou de honte. Puisque ces émotions qui sont au dehors du spectre peur/anxiété sont centrales dans l'ESPT, celui-ci a été reclassé dans le DSMV comme un trouble lié à un événement stressant plutôt qu'un trouble de l'anxiété, comme il l'était dans le DSMIV (Pai et al., 2017).

Dans le cadre de cette thèse, c'est surtout sur la première classe de symptômes que nous avons choisi de nous focaliser, en particulier celui de la reviviscence de l'événement traumatisant en réponse à certains stimuli environnementaux. Celui-ci, qui est de la même famille que le phénomène de rappel des mémoires de peur, a la particularité d'être facilement modélisable chez l'animal, et par ailleurs d'être directement ciblé par une des thérapies les plus efficaces pour traiter l'ESPT : la thérapie d'exposition.

2. La thérapie d'exposition

La thérapie d'exposition prolongée est l'une des approches les plus efficaces pour traiter l'ESPT. Elle consiste à réexposer de manière progressive les patients à un contexte ou des stimuli sensoriels associés à leur traumatisme, et ce de façon répétée, afin de produire en eux une mémoire d'extinction qui inhibera leurs mémoires de peur (Norrholm & Jovanovic, 2018). Cette thérapie peut se faire par l'exposition au témoignage écrit des victimes ou bien à des scènes ressemblant à leur traumatisme simulées en réalité virtuelle. Généralement, des paramètres physiologiques sont mesurés simultanément à l'exposition afin d'évaluer la réponse de peur et sa diminution progressive. Ces paramètres sont généralement la fréquence cardiaque et la réponse de conductance de la peau. Malgré l'efficacité de cette thérapie, on observe fréquemment des rechutes quelque temps après une thérapie d'exposition, à savoir une résurgence spontanée des souvenirs traumatiques (Wurtz et al., 2016). C'est à cause de ce phénomène et d'autres altérations de la mémoire d'extinction chez les patients ESPT, que l'on considère qu'au centre de ce trouble existe le déficit d'extinction (Blechert et al., 2007).

3. Modélisation de l'état de stress post-traumatique chez l'animal

Du fait de la diversité des symptômes présentés par les patients ESPT, il existe plusieurs paradigmes valables pour les modéliser. Dans tous les cas, ces modèles consistent à exposer les animaux à un ou des événements très stressants, qu'ils soient de nature physique ou sociale.

3.1 Exemples de modèles de l'état de stress post-traumatique

- Modèles de stress social

Les modèles de stress social consistent à exposer l'animal à un prédateur ou un congénère agressif. La durée d'exposition est de quelques minutes, mais peut varier selon l'intensité du stress que l'on souhaite administrer. Généralement, l'exposition au prédateur ou au congénère agressif est répétée plusieurs fois sur une période allant de 5 à 10 jours. L'exposition peut être directe, permettant le contact entre stresser et stressé, ou indirecte, limitant la possibilité du stresser d'interagir avec le stressé en le restreignant. Ce modèle présente une bonne validité dans la mesure où il induit des altérations dans l'axe hypothalamo-hypophysaire du stress similaires à celles retrouvées chez les patients ESPT, des comportements de type anxieux ou dépressif, et est sensible aux traitements pharmacologiques parfois employés chez les patients ESPT comme les antidépresseurs inhibant la recapture de la sérotonine. Par ailleurs, il reproduit une des causes les plus fréquentes d'ESPT chez l'homme : la violence interpersonnelle. Dans certains cas, il est même possible d'étudier l'extinction de la mémoire de peur en réexposant l'animal stressé aux stimuli présents lors de son exposition au stress. Néanmoins, ces modèles sont assez compliqués à mettre en place. De plus ils sont assez variables puisque l'agressivité du prédateur ou du congénère n'est pas identique pour tous les animaux testés (Flandreau & Toth, 2018).

- Modèles de stress physique

Les modèles de stress physique présentent l'avantage d'être plus reproductible grâce au contrôle qu'il est possible d'exercer sur le/les stresser(s) physique(s) employé(s). Le plus souvent, c'est une contrainte physique de deux heures qui est utilisée,

ou bien une nage forcée d'une minute. Néanmoins, une des procédures les plus employées, celle du « stress seul prolongé », combine ces différents stress. L'animal subit la restriction physique, suivie de la nage forcée, suivie d'une anesthésie à l'éther. Cette procédure induit des comportements d'anxiété, une altération du fonctionnement de l'axe du stress, et des modifications neuroanatomiques similaires à celles observées chez les patients ESPT comme une atrophie de l'hippocampe. Néanmoins, cette procédure ne permet pas aisément d'étudier la mémoire d'extinction (Flandreau & Toth, 2018).

Pour cette raison, les modèles utilisant de légers chocs électriques sont les plus employés. Ceux-ci consistent à mettre l'animal dans une cage dont le sol de la grille est électrifiable. Le stress est induit par l'administration d'un choc plantaire à l'animal. Ces modèles sont les plus reproductibles de par le contrôle précis qu'il est possible d'exercer sur les paramètres du choc électrique (durée, courant, intensité) et des stimuli sensoriels conjoints (auditifs, visuels, et olfactifs). Il est possible d'utiliser ce paradigme en tant qu'un *stresseur traumatique excessif unique* ou afin d'induire un *conditionnement de la peur*. Cette deuxième possibilité permet d'étudier plus finement les différentes mémoires de peur.

3.2 Pertinence du modèle de conditionnement de la peur

Le modèle du conditionnement de la peur consiste à exposer le sujet à un stimulus aversif (stimulus non conditionné ou en anglais « unconditioned stimulus », US), généralement un choc électrique, immédiatement après l'exposition à un indice sonore ou visuel (stimulus conditionné ou en anglais « conditioned stimulus », CS). La répétition de cette association CS-US va, une fois le conditionnement acquis, induire le sujet à exprimer une réponse de peur au CS seul, en l'absence de l'US, une fois le conditionnement acquis (conditionnement indicé). Le contexte dans lequel l'animal a été exposé au US sera lui aussi conditionné et générera également une réponse de peur (conditionnement contextuel). Cette réponse de peur se traduit par l'absence totale de mouvement de l'animal ou « freezing ». Lorsque ce modèle est employé chez l'homme, on mesure plutôt des paramètres physiologiques comme la fréquence cardiaque et la réponse de conductance épidermique (qui reflète la sudation induite par la peur ; VanElzakker et al., 2014).

D'après les critères du DSMV, un individu doit vivre un trauma psychologique qui induira par la suite des symptômes psychologiques, comportementaux, et physiologiques lorsque cet individu est exposé à des stimuli (similaires à des CS) suffisamment ressemblants à ceux présents au moment du trauma (qui constitue le US). Le modèle de la peur conditionnée a donc en théorie une bonne validité pour étudier la neurobiologie de l'ESPT même si, comme nous l'avons vu dans l'historique, la conception dite psychanalytique, elle, ne considère pas vraiment les stress traumatiques comme étant la cause du trouble. Quoiqu'il en soit, ce modèle a une certaine valeur prédictive : chez des soldats exposés au combat 2 mois plus tôt, la capacité à éteindre la peur conditionnée est prédictive de la présence de symptômes ESPT 7 mois plus tard (Sijbrandij et al., 2013). Le phénomène de généralisation peut aussi être étudié par le conditionnement de la peur. Cela se fait par l'emploi de deux CS, un CS+ qui sera associé au US, et un CS- qui ne sera associé à rien, et dont la présentation devrait ainsi indiquer la sécurité. Ceci permet de vérifier la spécificité de la réponse et d'évaluer la capacité des sujets à discriminer entre un stimulus menaçant et un stimulus neutre, et il sera donc possible d'évaluer les niveaux de généralisation en étudiant la différence d'amplitude entre la réponse au CS+ et la réponse au CS-. Lorsqu'on emploie ce type de procédure, on peut constater que les patients ESPT présentent une réponse de peur au CS-, c'est la généralisation de la peur (Kaczkurkin et al., 2017). Par ailleurs, la sévérité de cette généralisation est corrélée à la sévérité des autres symptômes ESPT chez les patients.

Finalement, ce modèle présente aussi l'avantage de pouvoir modéliser l'extinction de la peur. En exposant le sujet de façon répétée au CS, en l'absence de l'US, il est possible de produire une mémoire de « sécurité », éteignant ainsi la réponse de peur qu'il générerait. Lors de la thérapie d'exposition, la réponse physiologique de peur du patient traité diminue, et ce de façon corrélée aux symptômes subjectifs lorsqu'un test diagnostique est réalisé à la fin de la thérapie (Wangelin & Tuerk, 2015). Cette même évolution de paramètres physiologiques peut être observée en réponse à l'extinction d'un CS, au fil des expositions répétées. Ce modèle permet donc de reproduire le déficit d'extinction de la peur (VanElzakker et al., 2014). En effet, chez les patients ESPT exposés au conditionnement puis à l'extinction de la peur, on peut observer parfois dans ce modèle une résurgence spontanée de la peur conditionnée lorsqu'on les réexpose au CS normalement éteint la veille (Milad et al., 2009). Ce phénomène ressemble fortement à la résurgence spontanée du souvenir traumatique après la thérapie d'exposition. Ceci

suggère bien que l'extinction ne conduit pas à l'« oubli » de l'association CS-US, mais plutôt à l'acquisition d'une mémoire supplémentaire (indiquant la sécurité du CS) qui inhibe l'expression de la peur associée auparavant au US (VanElzakker et al., 2014). Ces réflexions légitiment l'étude de la mémoire d'extinction comme un phénomène d'intérêt dans l'ESPT.

3.3 Neuroanatomie des comportements de peur

Dans ce contexte des mémoires de peur, les régions qui nous intéressent principalement, aussi bien chez l'homme que chez le rongeur, sont à nouveau le cortex frontal, l'amygdale, et l'hippocampe. Ces régions sont les principaux acteurs dans l'acquisition et l'extinction de la mémoire de peur.

3.3.1 Principaux acteurs

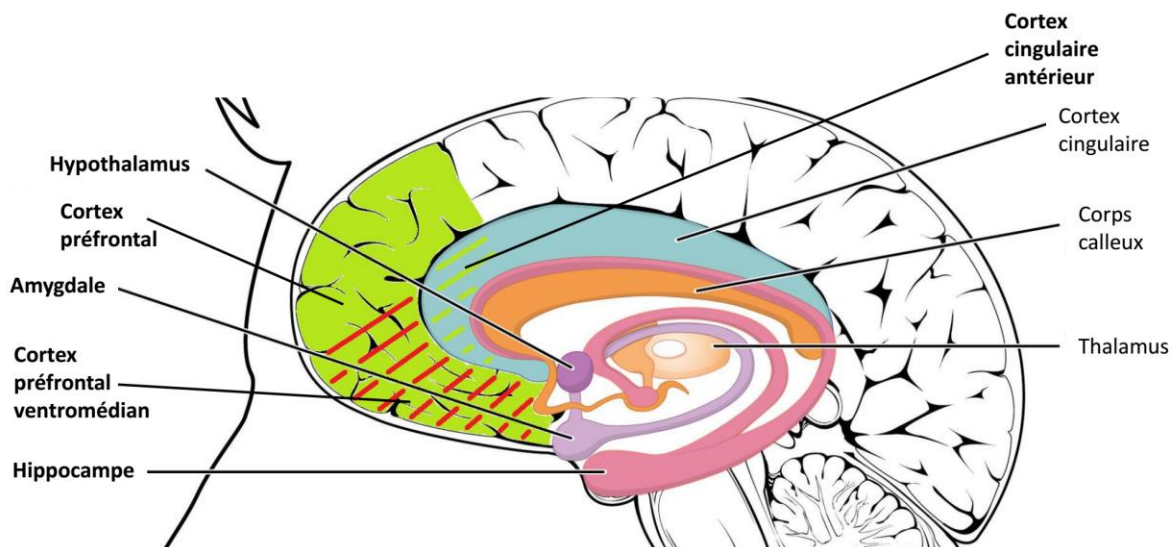


Figure 8. Régions anatomiques impliquées dans les comportements de peur. Le cortex préfrontal ventromédian (vert hachuré rouge) est impliqué dans l'extinction de la peur, le cortex cingulaire antérieur (bleu hachuré vert) dans l'acquisition de la peur indicée et la discrimination entre stimuli neutres et menaçants comme l'hippocampe (rose), qui lui est impliqué dans l'acquisition de la peur contextuelle. L'amygdale (violet clair) est impliquée dans tous les phénomènes de peur. Le thalamus (orange clair), est impliqué dans la perception des stimuli liés à la peur et l'hypothalamus (violet foncé) dans la mise en place de la réponse de peur, notamment neuroendocrinienne.

Le cortex frontal est subdivisé en plusieurs parties. Le CCA (sa partie dorsale correspondrait à l'aire prélimbique chez la souris ; Figure 8) est impliqué dans les apprentissages motivés (Fitzgerald et al., 2018), et son importance a été soulignée dans la dépression. Concernant les comportements de peur, le CCA est impliqué dans la perception et la discrimination des stimuli, et donc l'association entre un stimulus neutre et un stimulus menaçant. Pendant le conditionnement, l'intensité de la réponse de peur est corrélée à l'activation du CCA en IRMf (VanElzakker et al., 2014), et on observe de plus une augmentation de sa connectivité avec l'amygdale post-conditionnement. Mais le CCA n'a pas simplement un rôle dans l'expression de la peur puisque cette connectivité traduit aussi une meilleure capacité à la discrimination entre des stimuli conditionnés et indiquant la sécurité : le CS+ et le CS-, respectivement (Schultz et al., 2012).

Le CPF, décrit précédemment, peut être subdivisé en 4 régions prenant en charge des aspects plus fins de la régulation émotionnelle et cognitive. Celles-ci projettent de manière différentielle vers des régions sous corticales comme le thalamus, l'amygdale, et l'hippocampe, aussi impliqués dans les comportements de peur. Sa partie ventromédiale (CPFvm ou aire infralimbique chez la souris, Figure 8 ; dû à la nature désordonnée et non standardisée du progrès en neuroanatomie, le cortex préfrontal ventromédian de souris inclurait l'aire prélimbique et l'aire infralimbique) est généralement considérée comme étant instrumentale dans la régulation de la peur et l'inhibition de l'amygdale (Figure 9 ; Fitzgerald et al., 2018).

L'amygdale (Figure 8), un des centres les plus étudiés dans l'expression et la consolidation des mémoires de peur, comporte plusieurs noyaux. Son noyau latéral (« lateral amygdala » en anglais, LA) est la principale aire recevant des afférences sensorielles (LeDoux, 2000). Lorsque l'animal est exposé à une association « stimulus neutre - stimulus aversif », le LA est faiblement activé par le son, mais le choc induit une dépolarisation forte des neurones de ce noyau, les conduisant à potentialiser leur réponse au stimulus neutre (Figure 9). Cette plasticité va par la suite permettre au stimulus initialement neutre d'activer le noyau latéral. Celui-ci propage ensuite son activité électrique au noyau central (« central amygdala » en anglais, CeA) qui va initier la réponse comportementale de peur (Figure 9) par le biais du tronc cérébral (LeDoux, 2014). Lorsque la réponse de peur doit être inhibée, par exemple lorsqu'un stimulus n'est plus considéré comme étant menaçant, le CPFvm va activer une autre partie de l'amygdale, le noyau intercalaire (NIA), qui exercera un contrôle inhibiteur sur le CeA et

donc la réponse de peur (Figure 9). L'apprentissage de l'association « CS-aucun événement » se fait conjointement à une diminution de l'activité de l'amygdale, associée à une augmentation de l'activité du CPFvm (Linnman et al., 2012).

En revanche, dans les cas du conditionnement au contexte, c'est surtout l'hippocampe (Figure 8) qui est mis en jeu. Il va permettre la discrimination entre contextes menaçants ou non, et un déficit hippocampal peut conduire à la généralisation de la peur. L'hippocampe est nécessaire dans la peur contextuelle, notamment via son aire CA1 et le *subiculum* qui projettent sur le LA (LeDoux, 2000). Son aire du gyrus dentelé, le lieu principal de neurogenèse dans le cerveau adulte, serait elle aussi impliquée dans l'acquisition de l'extinction de la peur contextuelle (Bernier et al., 2017). Finalement, l'hippocampe participe également à la discrimination entre stimuli neutres (CS-) et menaçants (CS+). Lorsqu'on module le CS- pour qu'il ressemble plus au CS+ (dans le cas d'un son par exemple, en modifiant sa fréquence pour qu'elle soit plus proche) on observe que la connectivité fonctionnelle de l'hippocampe avec l'amygdale augmente (Lissek et al., 2014).

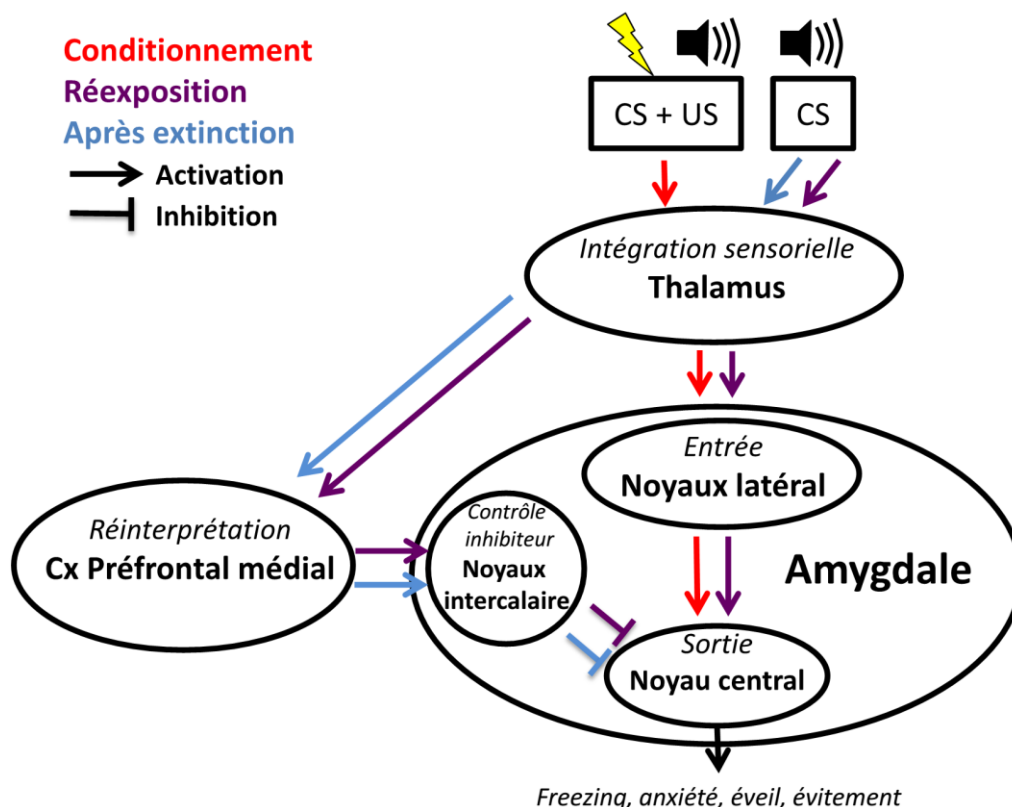


Figure 9. Schéma représentant la neuroanatomie du conditionnement de la peur. Les flèches rouges indiquent les voies stimulées pour l'acquisition de l'association CS - US. Lors de l'exposition à la procédure d'extinction, les voies en violet sont stimulées. Une fois l'extinction complète, les voies en bleu clair sont stimulées lors de l'exposition au CS. Adapté d'après Lissek (2012).

3.3.2 Autres régions impliquées

Bien évidemment, la neurobiologie des comportements de peur et de l'ESPT est plus complexe et peut mettre en jeu bien d'autres régions. Concernant l'acquisition et l'extinction de la peur, on peut par exemple citer le cortex retrosplénial qui est nécessaire à l'acquisition de la peur contextuelle (Todd et al., 2017). Aussi importantes sont la substance grise périaqueducale, la voie commune finale pour l'intégration des réponses de défense, et l'hypothalamus, impliqué dans les réponses neuroendocriniennes. Ces régions effectrices de la réponse de peur reçoivent toutes les deux des projections du CCA, du CPFvm et de l'amygdale (Keifer et al., 2015). Il a d'ailleurs été montré que leur manipulation (pharmacologique ou autre) permettait d'interférer avec le conditionnement et l'extinction de la peur. L'hypothalamus (Figure 8) est aussi impliqué dans le stress psychologique et la réponse à la mémoire de peur. Finalement, le thalamus aussi a son importance comme centre de relais des afférences (Figure 8). Bien que les aires corticales soient impliquées dans l'intégration des stimuli, les informations sensorielles sont principalement véhiculées par les voies thalamo-amygdaliennes (Figure 9). En effet, le thalamus reçoit les afférences sensorielles en provenance des voies spino-thalamiques, qu'il transmet au LA (LeDoux, 2000). En lien avec d'autres aspects de l'ESPT, l'insula, impliquée dans la conscience intéroceptive des états émotionnels, a son importance dans les symptômes d'évitement et de reviviscence du traumatisme (Fitzgerald et al., 2018). Néanmoins, les régions principalement impliquées dans les comportements qui nous intéressent sont celles décrites dans la figure 9.

4. Neurobiologie de l'état de stress post-traumatique

Certaines théories considèrent l'anxiété comme le résultat d'erreurs de généralisation, consistant à percevoir des stimuli neutres comme menaçants (Lissek et al., 2014). On retrouve d'ailleurs chez les patients anxieux des phénomènes de généralisation en réponse à un stimulus qui indique normalement la sécurité (CS-), mais ce n'est pas le cas chez les patients dépressifs (Jovanovic et al., 2010). Chez les patients anxieux et ESPT, ceci est associé à une hyperactivation de l'amygdale (Etkin & Wager, 2007; Patel et al., 2012). Il a de plus été observé qu'une amygdale plus développée était

associée à une réponse (épidermique) de peur accentuée lors de l'acquisition de la peur indicée (Winkelmann et al., 2016).

4.1 Reviviscence et généralisation

Malgré les nombreuses anomalies observées dans l'amygdale, il ressort toujours un rôle important pour le CPF : les patients ESPT, mais pas les patients souffrant d'anxiété généralisée, présentent une hypoactivité du CCA et du CPFvm (Etkin & Wager, 2007). Notons par ailleurs que l'épaisseur du CPFvm est corrélée à la capacité d'extinction (Winkelmann et al., 2016). Rappelons que l'hippocampe est relié au CCA et au CPFvm, et impliqué dans la discrimination entre les indices associés à la sécurité (CS-) et ceux associés au danger (CS+ ; VanElzakker et al., 2014). Or il existe une diminution de la connectivité fonctionnelle entre le cortex frontal (incluant le CCA et le CPFvm) et l'hippocampe chez les patients ESPT (Spielberg et al., 2015). Ceci traduirait une diminution de la capacité de ces régions à recruter l'hippocampe pour exercer ses capacités de contextualisation et de discrimination entre stimuli menaçants et non menaçants. Cette baisse de connectivité est d'ailleurs corrélée à l'intensité des symptômes de reviviscence chez les patients (Spielberg et al., 2015). Étant donné que la communication entre ces différentes régions se fait *via* des fibres de substance blanche, il n'est pas étonnant d'observer une relation entre déficit de substance blanche et symptômes chez les patients ESPT (Fani et al., 2012).

Néanmoins, d'autres auteurs ont trouvé une augmentation de la connectivité entre le CPF et l'hippocampe, et suggèrent que ceci traduit une tentative cérébrale de compensation pour limiter la généralisation de la peur (Kaczurkin et al., 2017). Finalement, l'hippocampe est souvent hyperactif chez les patients ESPT, et il est estimé que ceci favorise le conditionnement de la peur dans des situations neutres tout en perturbant les processus d'extinction normaux (Patel et al., 2012). Des réductions du volume de l'hippocampe ont souvent été trouvées, mais celles-ci semblent survenir plutôt suite à l'exposition au stress qu'au cours du développement de l'ESPT (Bonne et al., 2001; Winter & Irle, 2004). Les altérations exactes subies par l'hippocampe détermineraient ses interactions avec les autres régions (CCA, CPFvm, amygdale) impliquées dans ce trouble, et donc la prépondérance des symptômes vécus par le patient, par exemple

l'intensité des symptômes de reviviscence ou de généralisation de la peur contextuelle (Patel et al., 2012).

4.2 Le déficit d'extinction de la peur

4.2.1 Neuroanatomie fonctionnelle du déficit d'extinction

Nous avons déjà vu qu'en réponse à des stimuli de peur, l'activité de l'amygdale est plus élevée chez les sujets ESPT et traumatisés par rapport aux contrôles. Par ailleurs, l'activité du CPFvm est diminuée chez les patients ESPT, mais augmentée chez les individus qui ont subi un événement traumatisant sans développer d'ESPT, par rapport aux contrôles sains (Patel et al., 2012). Le CPFvm est responsable de l'inhibition de la réponse de peur, il n'est donc pas surprenant que son activité soit diminuée chez les patients ESPT. En revanche, l'augmentation de son activité chez les individus ayant subi un événement traumatisant sans développer d'ESPT suggère un meilleur contrôle inhibiteur en dépit du traumatisme. Il est donc possible soit d'acquérir une forme de résilience suite à un traumatisme psychologique, ou sinon de s'en retrouver traumatisé.

Ce déficit d'extinction peut être observé en lien avec l'activité du réseau « mode par défaut » (MPD), décrit précédemment (chapitre 1, section 4.5.1). Rappelons que celui-ci est actif chez un individu au repos se sentant en sécurité. Lors de l'acquisition de l'extinction de la peur, l'activité du MPD augmente en même temps que la réponse de peur diminue. Le MPD est d'ailleurs considéré comme étant instrumental à cet apprentissage (Marstaller et al., 2017), et son étude permet de prédire certains types de vulnérabilités en réponse aux apprentissages de peur. Par exemple, il a été montré qu'une forte connectivité du MPD avec l'hippocampe est prédictive d'une capacité moindre à discriminer entre les *contextes* neutres et menaçants. Une forte connectivité du MPD avec le CPF et l'amygdale, en revanche, est prédictive d'une capacité moindre à discriminer entre les *indices* neutres et menaçants (Zidda et al., 2018). Ces observations sont cohérentes avec la neurobiologie des mémoires de peur décrite précédemment (section 3.3.1) et pourraient avoir une utilité prédictive dans le cadre de l'ESPT. Au repos, l'activité du MPD est moins forte chez les patients ESPT (Patel et al., 2012), traduisant une fois de plus un dysfonctionnement de leur capacité à éteindre la peur. Les individus ESPT

présentent ainsi une réponse de peur exagérée en réponse au CS+, associé au stimulus aversif (Norrholm et al., 2011), et peinent à inhiber leur frayeur face au CS-, qui devrait rester neutre (Jovanovic et al., 2009). Ils sont donc plus sensibles au conditionnement de la peur que des sujets traumatisés sans ESPT (Orr et al., 2000). Par ailleurs, une fois que le conditionnement de la peur est acquis, les patients peinent à éteindre la peur associée au CS lors de la procédure d'extinction (Blechert et al., 2007), et l'on observe une activation exacerbée de l'amygdale en réponse au CS (Milad et al., 2009). Lorsqu'on teste leur mémoire d'extinction le lendemain, celle-ci est moins forte que celle des individus contrôles (Milad et al., 2009). Cette résurgence de la peur conditionnée est observée conjointement à une activation réduite du CPFvm et de l'hippocampe, et une activité augmentée du CCA. En effet, la force de la mémoire d'extinction est corrélée à l'activité de l'hippocampe et du CPFvm au cours du test d'extinction, et ce pour tous les sujets (Milad et al., 2009). Le déficit d'extinction de la peur se manifeste donc à plusieurs niveaux : face à un stimulus indiquant la sécurité, face à un CS, et face à un CS qui devrait être éteint (Norrholm & Jovanovic, 2018).

4.2.2 Le déficit d'extinction : inné ou acquis ?

Il n'est cependant pas clair si le déficit d'extinction est vraiment une conséquence de l'ESPT plutôt qu'un facteur de vulnérabilité. Chez des pompiers ayant subi une procédure de conditionnement et d'extinction de la peur avant leur déploiement, il a été montré qu'une capacité réduite à éteindre le CS prédisait l'anxiété ressentie en lien et suite à l'exposition à des événements de type traumatisants pendant leur travail (Guthrie & Bryant, 2006). À l'inverse, des études sur des jumeaux ont montré un déficit de la mémoire d'extinction chez le jumeau ayant un ESPT (Milad et al., 2008), ainsi que des réductions de matière grise dans l'hippocampe et le CCA, suggérant que les dysfonctionnements associés peuvent être acquis (Kasai et al., 2008). Dans le contexte de la vulnérabilité post-TC à l'ESPT, deux scénarios sont donc possibles. Ou bien le TC provoque des altérations anatomo-fonctionnelles suffisantes en elles-mêmes pour induire un ESPT, ou bien des prédispositions innées se combinent à l'exposition à un événement traumatisant pour générer finalement la pathologie de l'ESPT.

4.3 Plasticité et implication des facteurs trophiques

La possibilité d'apprentissage évoque naturellement la plasticité neuronale et synaptique. S'il est possible de former des mémoires, c'est que des connexions nouvelles se forment ou se défont entre différentes régions du cerveau. Il en est de même pour le déficit d'extinction qui résulterait en revanche d'une plasticité synaptique insuffisante. Ces phénomènes de plasticité, qui sont altérés chez les patients ESPT, dépendent entre autres de facteurs trophiques (Michopoulos et al., 2017). En conséquence, un certain nombre de modifications des systèmes neurotrophiques pourraient être retrouvées chez les patients ESPT, et les traitements pourraient induire leurs effets bénéfiques tout en affectant ces mêmes systèmes neurotrophiques. Dans le troisième chapitre de cette thèse, nous discuterons des modifications de facteurs trophiques que l'on peut retrouver chez les patients ESPT, ainsi que de l'utilité de ces facteurs en tant que marqueurs biologiques du développement de la maladie.

5. Comorbidité traumatisme crânien et état de stress post-traumatique

Des tests de conditionnement de la peur ont été réalisés chez des soldats exposés à des TC, mettant en évidence un niveau de peur plus élevé chez ceux-ci lors du conditionnement et du début de l'extinction de la peur, un résultat similaire à celui obtenu chez les individus ESPT. En revanche, l'acquisition de l'extinction était normale. De façon intéressante, cette réponse exagérée au conditionnement de la peur était prédictive des symptômes ESPT post-déploiement (Glenn et al., 2017). C'est probablement la combinaison stress + TC qui engage les victimes dans la pathologie, puisque 43% des soldats de la guerre d'Irak ayant subi un TC présentent des symptômes d'ESPT (Kaplan et al., 2018). L'effet de ce « double coup » peut se voir en IRM : des études chez des vétérans montrent une altération de la connectivité fonctionnelle entre l'amygdale et le cortex préfrontal ou le cortex cingulaire chez les patients TC+ESPT, alors que les patients ayant subi seulement un TC sont similaires aux contrôles sains (Bomyea et al., 2017). La comorbidité TC+ESPT serait aussi associée à une diminution du volume de l'amygdale (Depue et al., 2014). Ceci prédirait un contrôle inhibiteur réduit et une

augmentation de l'impulsivité, et, en conséquence, possiblement des comportements de prise de risque.

5.1 Effet combinatoire des traumatismes physiques et psychologiques

Quelques études animales ont modélisé l'interaction entre le TC et l'ESPT, apportant d'autres évidences pour un effet délétère cumulatif du « double coup ». Une étude assez particulière (Ojo et al., 2014) a cherché à étudier l'interaction entre ESPT et TC en croisant un modèle de TC à crâne fermé par impact contrôlé, et un modèle d'induction de l'ESPT combinant une exposition à l'odeur de chats et un stress de contrainte. Dans le modèle de la peur conditionnée, les animaux de type ESPT exprimaient plus de freezing lors du test de peur contextuelle. Le TC seul n'avait pas d'effet, mais la combinaison des deux ramenait le freezing à un niveau équivalent à celui des animaux naïfs (Ojo et al., 2014). Cet effet paradoxal d'une combinaison TC + stress a été trouvé par d'autres auteurs (Teutsch et al., 2018). Pour la peur indicée en revanche, le freezing était augmenté par l'ESPT sans être affecté par le TC. On observe aussi un effet paradoxal en ce qui concerne les tests d'interaction et de reconnaissance sociale : alors que les animaux de type ESPT présentent des altérations de leurs capacités sociales, les animaux TC ou TC + ESPT sont normaux (Ojo et al., 2014). Dans les tests d'anxiété, le TC augmente les comportements à risque (temps passé au centre de l'open field et dans les bras ouverts du labyrinthe en croix), chez les animaux exposés au protocole ESPT ou non (Ojo et al., 2014), un résultat retrouvé par d'autres auteurs 3 mois post-TC (Taib et al., 2017). De façon intéressante, on retrouverait ce paradoxe au niveau inflammatoire. La cytokine IL-17A est augmentée dans le plasma par la procédure ESPT, mais pas chez les animaux également exposés au TC (Ojo et al., 2014). On voit ainsi que la combinaison TC + ESPT est qualitativement différente de chacune de ces interventions lorsque réalisées seules, et induit des effets qui ne sont pas facilement prévisibles.

Un autre niveau de complexité est ajouté par le modèle de TC employé. Dans un modèle de TC par lâcher de poids chez le rat, on observe une augmentation du freezing lors du test de peur contextuelle -alors qu'il n'avait pas d'effet dans le modèle de l'impact cortical contrôlé- sans effet sur l'extinction ou sa rétention à long terme (Meyer et al., 2012). En ce qui concerne le labyrinthe en croix surélevé, le TC par lâcher de poids a à

aussi un effet différent de l'impact cortical contrôlé puisqu'il induit un profil plutôt anxieux (Meyer et al., 2012). La balance entre comportements anxieux vs comportement de risque pourrait donc dépendre du type de TC et de sa sévérité.

Dans une autre étude (Davies et al., 2016), les mêmes auteurs ont testé l'interaction du TC avec un modèle de stress par défaite sociale. Ils ont retrouvé une diminution des comportements de risque suite au TC, qui étaient par contre augmentés par l'exposition à la défaite sociale. Concernant la peur contextuelle, le TC, la défaite sociale et leur combinaison augmentaient le freezing pendant le test de rétention. C'est au niveau de l'extinction que l'on voit ici apparaître l'effet du « double coup ». Alors que le TC ou la défaite sociale seule n'affectaient pas l'extinction, la combinaison des deux augmentait le freezing exprimé, et ce lors des 3 jours d'extinction (Davies et al., 2016). Les combinaisons TC + stress affectent ainsi l'acquisition de l'extinction. Malheureusement, aucun test de rétention à long terme de l'extinction n'a été fait pour évaluer sa consolidation.

En conclusion, les effets du TC sur les comportements de la peur sont loin d'être établis. Si certaines études animales ne montrent pas d'effets du TC sur le conditionnement de la peur (Sierra-Mercado et al., 2015), d'autres suggèrent une augmentation de l'expression de la peur conditionnée à la fois pendant le conditionnement et l'extinction de la peur (Meyer et al., 2012; Reger et al., 2012; Schneider et al., 2016). Cette apparente contradiction viendrait de l'imprécision de la définition du TC : celui se réfère à un événement traumatique sans apporter d'information sur ses conséquences neurobiologiques. Ainsi, seules les victimes de TC qui développent par la suite une pathologie cérébrale chronique pourraient être vulnérables psychiatriquement (Ragsdale et al., 2018). C'est pour cette raison qu'il est nécessaire de développer des modèles et des marqueurs post-TC qui pourraient être utilisés pour prédire la vulnérabilité. Nous allons donc discuter de l'importance de différents facteurs trophiques dans la plasticité liée au TC et à l'ESPT, et donc leur utilité potentielle, entre autres, en tant que marqueurs.

Chapitre 3. Les facteurs trophiques

Nous avons vu précédemment que la phase de récupération suite au TC implique la mise en jeu de facteurs trophiques. Nous avons également vu que l'ESPT est un trouble impliquant fondamentalement la mémoire et les apprentissages, des phénomènes soutenus par l'action de facteurs trophiques. Il en découle naturellement que l'étude des facteurs trophiques en réponse au TC, à un stress psychologique, ou à la combinaison des deux a un grand intérêt dans la prévention des troubles psychiatriques. Comme les études épidémiologiques ont impliqué les neurotrophines dans nombre de troubles psychiatriques comorbides (Koskela et al., 2017; Rao et al., 2017; Sharma et al., 2016) nous avons choisi de nous focaliser sur le BDNF, qui est sans doute la neurotrophine la plus exprimée et étudiée dans le système nerveux central (Park & Poo, 2013), mais aussi sur le système IGF qui implique un autre organe, le foie, et qui serait impliqué dans les comportements de peur et la neuroréparation post-TC (Agis-Balboa & Fischer, 2014; Santi et al., 2018a). Dans l'optique de trouver des marqueurs du TC pertinents à la vulnérabilité psychiatrique, nous nous sommes penchés sur la régulation des gènes de nos facteurs trophiques d'intérêt. En effet, si le fonctionnement de ces systèmes trophiques est bel et bien chroniquement altéré, cela devrait pouvoir être constaté au niveau génétique par des changements de la structure de la chromatine et de l'ADN, c'est-à-dire par des modifications épigénétiques.

1. L'épigénétique

1.1 Définition

Le terme épigénétique recouvre l'ensemble des modifications du matériel génétique qui altère la transcription et donc l'expression des gènes sans en affecter la séquence nucléotidique. Ces modifications sont réversibles et peuvent même être transmises de façon héréditaire. C'est l'existence de l'épigénome qui permet aux cellules d'avoir différentes fonctions et modalités de fonctionnement à partir du même matériel génétique. Les modifications épigénétiques peuvent changer chimiquement l'ADN, ou

bien certaines protéines qui permettent l'organisation physique de l'ADN en boucles : les histones. L'assemblage de l'ADN et des histones forme la chromatine, qui peut être dans deux états :

- l'euchromatine correspond à sa forme décondensée, rendant l'ADN accessible à la machinerie génétique et donc la transcription ;
- l'hétérochromatine correspond à la forme condensée dans laquelle il n'y a pas de transcription génique.

1.2 Les modifications des histones

Les modifications post-traductionnelles réalisées sur les histones vont affecter les interactions électrostatiques qu'elles ont entre elles et avec l'ADN, faisant ainsi tendre la chromatine vers un état plus ou moins condensé et donc favorisant plus ou moins la transcription. Il en existe un grand nombre, mais les plus connues et étudiées sont l'acétylation et la méthylation.

1.2.1 Les histones

Afin de former la chromatine, l'ADN et les histones doivent s'associer pour former le nucléosome. Un nucléosome est constitué d'un octamère d'histones assemblées, autour desquels l'ADN s'enroule 1,65 fois (147 paires de bases). Il existe quatre histones pour constituer un octamère qui contient donc deux copies de chacune des histones : H2A, H2B, H3 et H4 (Figure 10).

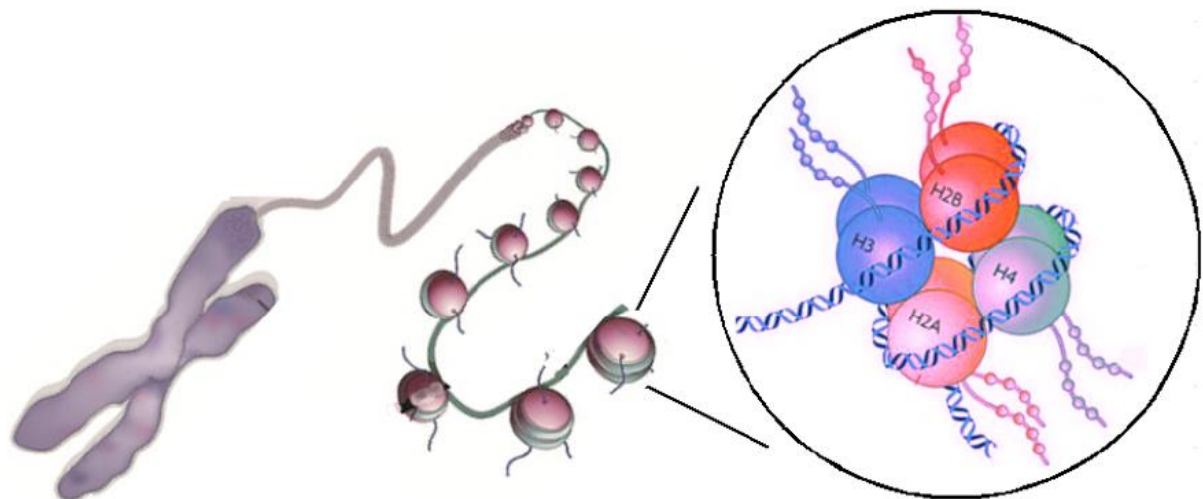


Figure 10. Représentation de la chromatine et de ses constituants. Le chromosome est un assemblage de chromatine elle-même constituée de nucléosomes. L'ADN s'enroule autour d'un octamère formé par les histones H2A, H2B, H3, et H4 afin de constituer le nucléosome. C'est cette structure qui donne sa compaction à l'ADN et lui permet de se condenser et se décondenser. D'après <https://phys.org>.

Les histones sont des protéines chargées positivement de par la présence de grandes quantités d'acides aminés lysine et arginine. Cette charge positive leur permet d'interagir avec l'ADN, lui-même chargé négativement, par les biais de liaisons hydrogène. Ainsi, les modifications épigénétiques touchant les histones vont moduler cette interaction en altérant la charge électrique des histones (Tsankova et al., 2007).

1.2.2 L'acétylation et la méthylation des histones

Les histones possèdent des queues en N-terminal sur lesquelles des modifications post-traductionnelles covalentes peuvent être greffées. Des résidus acétyle peuvent y être ajoutés, et cette réaction est catalysée par les enzymes histones acétyle-transférases. Dans l'objectif d'exercer une régulation transcriptionnelle fine, le système a aussi la capacité de retirer les acétylations par le biais des histones désacétylases (HDAC). Les acétylations se font exclusivement sur les résidus lysine, qui peuvent se trouver dans la queue des histones. À ce jour, les acétylations de H3 ou H4 sont les plus étudiées, car c'est sur ces histones que l'on trouve le plus de lysines pouvant être acétylées (Figure 11). L'hyperacétylation des histones est généralement considérée comme causant une décondensation de la chromatine permissive à la transcription des gènes, alors que l'hypoacétylation a l'effet inverse (Tsankova et al., 2007).

La méthylation des histones (Figure 11) quant à elle est réalisée par les histones méthyltransférases. Les résidus peuvent être mono- di- ou tri-méthylés, et comme dans le cas de l'acétylation, cette marque épigénétique est dynamique et peut être retirée par l'action des histones déméthylases. Contrairement à l'acétylation, la méthylation n'est pas simplement activatrice ou répressive, cela dépend du résidu touché. Par exemple, la méthylation des lysines 4, 36 et 79 de H3 est considérée comme une marque de transcription active, alors que celle des lysines 9 et 27 de H3, ou de la lysine 20 de H4 est considérée comme étant associée à une chromatine silencieuse.

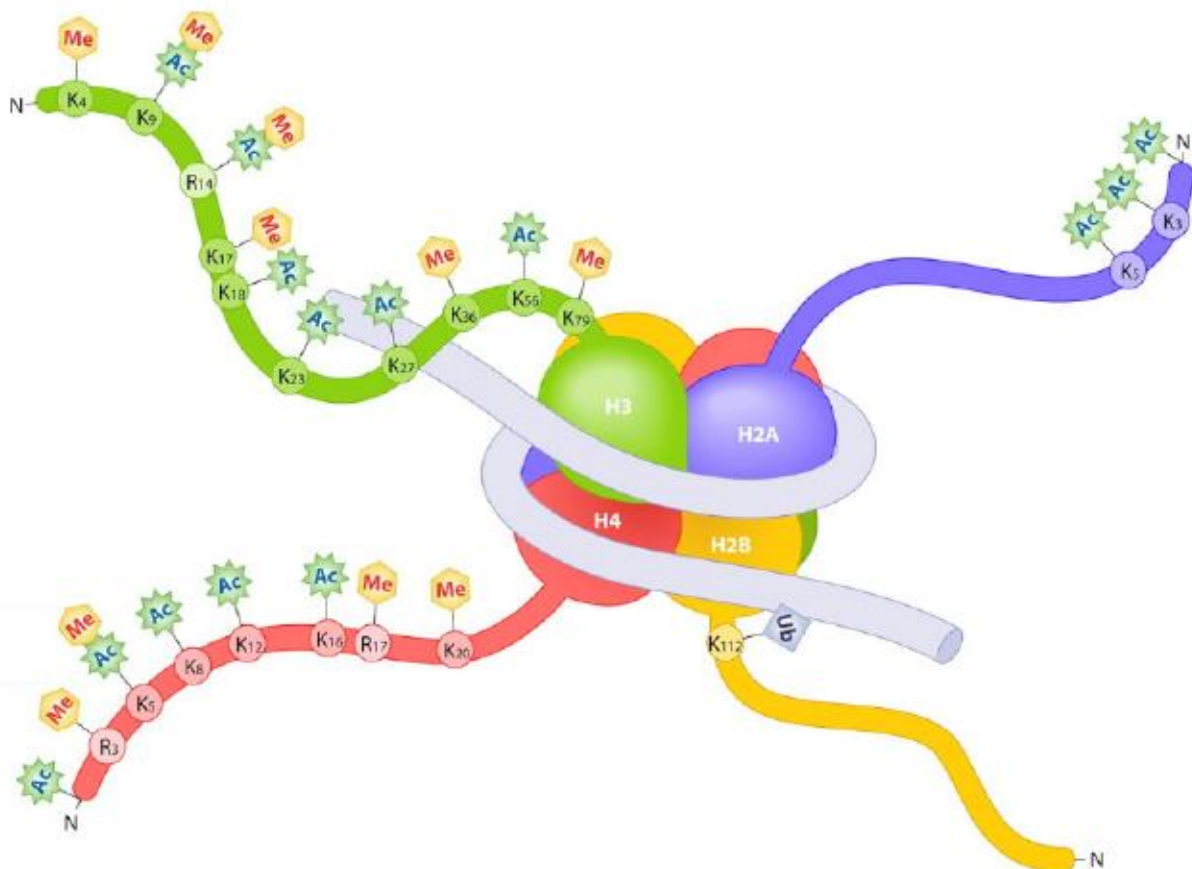


Figure 11. Représentation schématique du nucléosome et de certaines modifications épigénétiques pouvant se faire sur les histones. La queue des histones contient de nombreux sites sur lesquels des groupements acétyle, méthyle, ou ubiquitine peuvent s'ajouter. Les groupements acétyles vont souvent se trouver sur les résidus lysine (K), et les groupements méthyles sur les résidus arginines (R). *Modifié d'après www.amsbio.com.*

La méthylation des histones ne doit pas être confondue avec la méthylation de l'ADN, qui est sans doute la modification épigénétique la plus étudiée. C'est également celle sur laquelle nous avons choisi de nous focaliser, car c'est la plus simple à étudier autant chez le rongeur que chez l'homme post-mortem, et celle sur laquelle il existe le plus d'informations en lien avec les altérations des systèmes neurotrophiques.

1.3 La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est généralement décrite comme étant répressive sur la transcription. Cette modification consiste en l'ajout d'un groupement méthyle sur le carbone 5 des résidus cytosine, résultant en une 5-méthylcytosine. La méthylation d'une cytosine (C) se fait uniquement lorsque celle-ci est suivie d'une guanine (G), les deux étant reliées par un pont phosphodiester (p). Ceci forme le dinucléotide CpG. On considère que la méthylation de l'ADN exerce son activité répressiveur sur l'expression des gènes dans l'ADN soit en empêchant l'interaction d'une région avec des facteurs de transcription, soit en favorisant son interaction avec des protéines ayant une affinité pour les sites méthylés (les « methyl-CpG-binding protein »), qui seront généralement associés à un complexe de répression de la transcription.

Ces protéines sont au nombre de 10, et classées en 3 familles : la famille des protéines « methyl-CpG-binding domain » incluant MBD1, MBD2, MBD4 et MeCP2. Cette dernière est la plus étudiée des protéines se liant aux sites CpG. Il y a aussi la famille des protéines « set and ring finger-associated » comprenant UHRF1 et UHRF2, et la famille des protéines à doigt de zinc avec ZFP57, ZBTB4, ZBTB38 et Kaiso (Stragier, 2014).

Les enchaînements CpG sont moins fréquents que ce à quoi l'on pourrait s'attendre dans l'ensemble du génome, un phénomène qui serait causé par la tendance des cytosines méthylées à se déaminer en thymine. En revanche, dans la région promotrice des gènes, c'est-à-dire la région située en amont du site d'initiation de la transcription, il y a une quantité anormalement élevée de sites CpG (Edwards et al., 2017). Ces sites ont pour nom d' « îlots CpG », le terme définissant des régions pouvant faire quelques centaines à quelques milliers de paires de bases, ayant un pourcentage de C et de G supérieur à 50%, et un ratio de CpG observé/attendu supérieur à 0,6. Environ 75% des promoteurs se trouvent dans un îlot CpG (Edwards et al., 2017), et les études s'intéressant à la méthylation d'un gène en relation avec ses niveaux d'expression ont donc tendance à se focaliser sur la région promotrice.

1.3.1 Le contrôle de la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN se fait sous l'action des « DNA methyl-transferase » (DNMT), qui sont des enzymes utilisant la S-adénosyl-méthionine en tant que donneur

de groupement méthyle (Edwards et al., 2017). Les principales DNMT sont la DNMT1, impliquée dans le maintien de la méthylation entre les divisions cellulaires, et les DNMT3A et 3B, qui sont responsables de la méthylation *de novo* impliquée dans la régulation de l'expression des gènes, notamment pendant le développement embryonnaire (Figure 12).

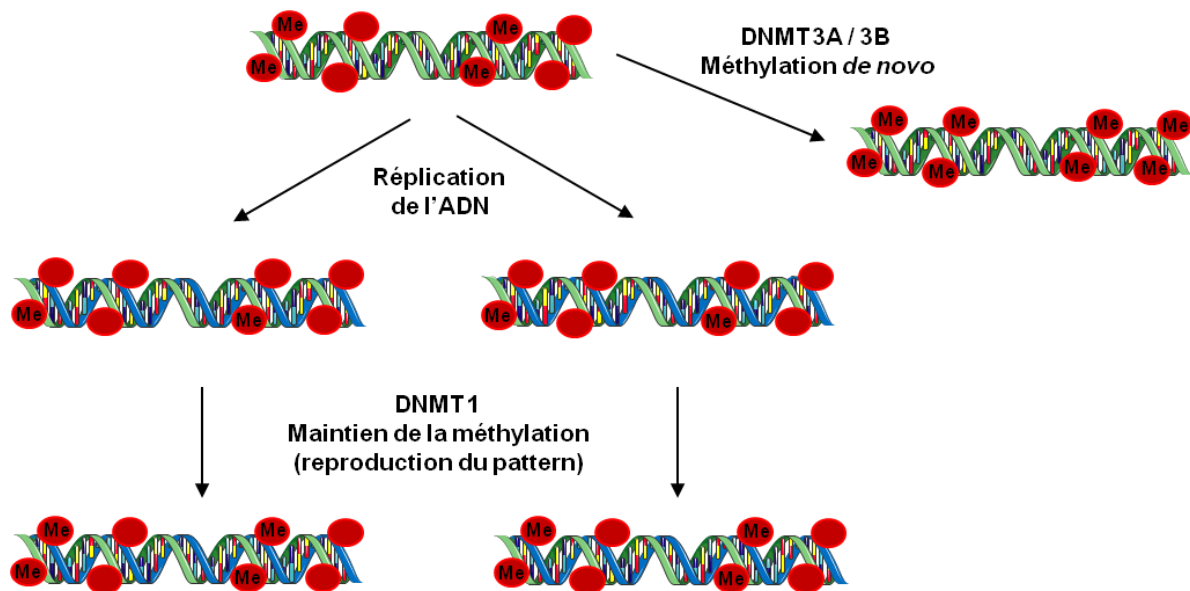


Figure 12. Illustration du rôle des différentes enzymes impliquées dans la méthylation de l'ADN. La DNMT1 serait responsable du maintien de la méthylation préexistante la division cellulaire, alors que les DNMT3A et 3B seraient impliquées dans la méthylation *de novo* de sites nécessitant une régulation dynamique. D'après Stragier (2014).

La déméthylation ne nécessite pas forcément d'enzyme pour se réaliser. Elle peut se faire passivement simplement par le blocage du maintien du profil de méthylation lors de la réplication de l'ADN, ou bien avec l'aide d'enzymes. La déméthylation active est un phénomène beaucoup plus complexe que la méthylation (ses détails ne sont pas nécessaires à la compréhension de cette thèse). Brièvement, la cytosine à déméthiler doit être déaminée ou oxydée, avant d'être excisée puis remplacée.

Dans le cadre de cette thèse nous avons choisi de nous intéresser à la méthylation des promoteurs des facteurs trophiques BDNF et IGF1 afin de déterminer s'il existait des marques épigénétiques associées au TC et à la vulnérabilité psychiatrique qui en résulte. Afin de déterminer l'étendue de la mise en jeu de l'épigénétique dans ce contexte, nous nous sommes aussi intéressés à l'état des enzymes impliquées dans la méthylation ainsi que le facteur de répression MeCP2.

2. Les neurotrophines

L'étude des neurotrophines a débuté avec la découverte du « nerve growth factor » (NGF). La découverte et l'étude de cette famille de facteurs neurotrophiques par Rita Levi-Montalcini fut récompensée en 1986 par un prix Nobel. Initialement en lien avec l'étude de leur rôle dans la maturation et le développement des circuits neuronaux (Castrén, 2014), des études plus récentes mettent en évidence leur rôle physiologique complexe chez l'adulte, et en ont fait des candidats de choix pour la compréhension des troubles psychiatriques (Kashyap et al., 2018). Cette famille de petites protéines sécrétées comprend le NGF, les neurotrophines 3 & 4 (NT-3 & 4), et le BDNF. Elles auraient une origine évolutive commune partageant environ 50% d'homologie de séquence (Kashyap et al., 2018), le terme « neurotrophine » ne s'applique donc pas à tous les facteurs neurotrophiques.

2.1 Signalisation des neurotrophines

Les neurotrophines se lient à l'un des 3 récepteurs « tropomyosine-related kinase » (TrK, généralement considéré comme protrophique) : NGF à TrKA, BDNF et NT4 à TrKB, et NT3 à TrKC (Figure 13 ; Park & Poo, 2013). La neurotrophine mature se présente généralement sous la forme d'homodimère (Skaper, 2018) et va se lier sélectivement à TrK avec une affinité nanomolaire. La fixation d'une neurotrophine à un récepteur TrK induit une dimérisation typique des récepteurs tyrosine-kinase, qui conduit à son autophosphorylation et à l'activation des boucles kinase (Skaper, 2018). Cette activation conduit au recrutement des voies MAPK (« mitogen activated protein kinase »), la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), la phospholipase C- γ 1 et de leurs partenaires intracellulaires, (comme la protéine kinase C et le « cAMP response binding element », CREB) et est modulée par l'endocytose des récepteurs et leur transfert dans d'autres compartiments cellulaires (Skaper, 2018). Ces voies de signalisation vont par la suite promouvoir la différenciation neuronale, la survie cellulaire et la croissance, ou la plasticité synaptique et la neurotransmission, respectivement. Les neurotrophines peuvent également se lier au récepteur p75 neurotrophine (p75^{NTR}), mais avec une faible affinité (Figure 13), et cette action est généralement considérée comme étant pro-

apoptotique. Pour complexifier la signalisation des neurotrophines, des croisements sont possibles. Il peut ainsi y avoir une association entre $p75^{NTR}$ et Trk, qui va moduler l'affinité de ce dernier pour les différentes neurotrophines, permettant un plus grand contrôle des interactions ligand-récepteur (Mitre et al., 2017).

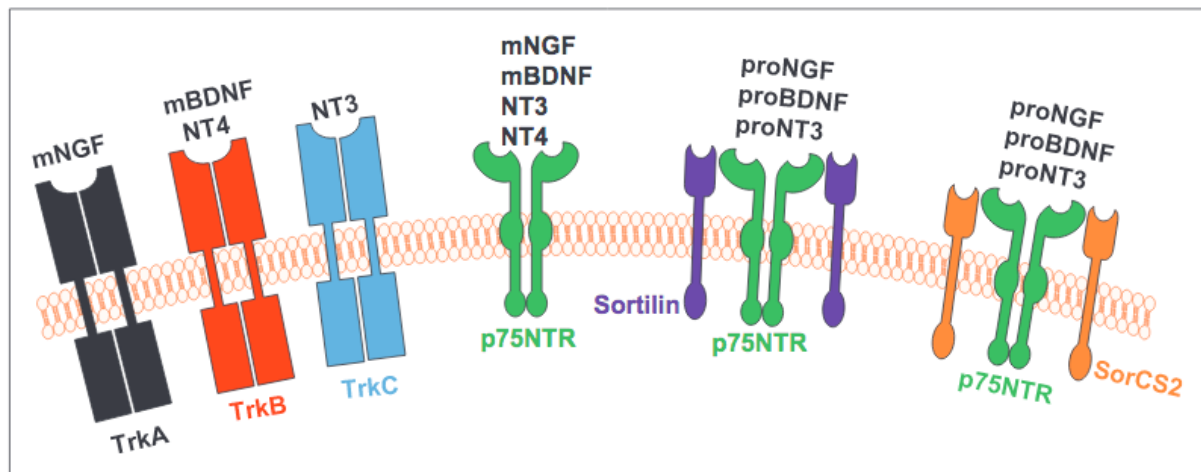


Figure 13. Les différentes neurotrophines et leurs récepteurs. Les neurotrophines ont tendance à se fixer sur les récepteurs Trk, et les proneurotrophines sur les récepteurs $p75^{NTR}$. Néanmoins, des croisements sont possibles avec plusieurs neurotrophines ou proneurotrophines pouvant se fixer sur un même récepteur. D'après Gibon & Barker (2017).

Les neurotrophines sont synthétisées sous la forme de protéine précurseur avec un prodomaine en N-terminal. Leur clivage peut être fait en intracellulaire par la plasmine ou la furine, ou en extracellulaire par les « matrix metalloproteinases » (Kashyap et al., 2018). La proneurotrophine ne peut pas se lier aux récepteurs Trk, mais elle peut se fixer à $p75^{NTR}$, ce qui aura pour effet de modifier les interactions Trk-neurotrophine ou, en l'absence de stimulation de Trk, d'induire la voie apoptotique (Gibon & Barker, 2017; Lee et al., 2001). En effet, l'activation de $p75^{NTR}$ recrute les jun kinases, les caspases, et d'autres voies de signalisation protéolytiques et proapoptotiques (Skaper, 2018). Néanmoins, il peut également recruter le « nuclear factor- κ B » qui a été impliqué dans la survie cellulaire. En ce qui concerne la plasticité et les apprentissages au niveau cellulaire, on peut dire qu'en général les neurotrophines favorisent la potentialisation à long terme, c'est-à-dire le renforcement des connexions synaptiques utiles et fréquemment stimulées, alors que les pro-neurotrophines favorisent la dépression à long terme, c'est-à-dire l'élimination de connexions ou de cellules non désirées. Les neurotrophines et la signalisation Trk sont des éléments essentiels dans les phénomènes d'activité et de plasticité synaptique impliqués dans la différenciation et

prolifération cellulaire, comme par exemple la prolifération des épines dendritiques notamment impliquées dans la dépression et son traitement (Skaper, 2018).

2.2 Le « brain-derived neurotrophic factor », la vedette des neurotrophines

Le BDNF est le facteur neurotrophique le plus exprimé dans le cerveau des mammifères, que ce soit pendant la période de développement ou de maturation (Lamb et al., 2015). Sa sécrétion serait plutôt constitutive pendant le développement, durant lequel la sécrétion de pro-BDNF est prévalente. Chez l'adulte en revanche, on voit majoritairement du BDNF mature et il est secrété de façon activité-dépendante par les neurones, en réponse à une dépolarisation de la membrane. Cette sécrétion est impliquée dans la neurogenèse hippocampique, mais aussi la protection contre la neurotoxicité induite par le glutamate, par des mécanismes pathophysiologiques impliqués dans des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et d'Huntington (Kowiański et al., 2018). Les effets du BDNF sur la plasticité seraient principalement induits par la voie AMPc/PKA/CREB (adénosine monophosphate cyclique, protéine kinase A, « cAMP response binding element »), et celle-ci est notamment inhibée par les phénomènes de stress. De plus, cette inhibition est en lien étroit avec l'inflammation puisque c'est la cyclo-oxygénase 2, une enzyme qui est souvent la cible des médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens, qui en est responsable. L'inhibition de cette enzyme permet d'inverser ces effets délétères du stress et normaliser les niveaux de BDNF hippocampiques (Luo et al., 2017). On voit une fois de plus l'interaction entre inflammation et axe neurotrophique, qui est d'importance dans le contexte d'inflammation chronique suivant des blessures cérébrales.

2.2.1 Importance du BDNF en psychiatrie

Le BDNF est sans doute le facteur trophique le plus étudié en lien avec les troubles psychiatriques. Son implication dans les émotions et la cognition est telle que l'on peut même observer des liens entre la personnalité d'un individu et ses niveaux de BDNF périphériques. En particulier, plusieurs études ont trouvé une corrélation négative entre

niveaux de BDNF et traits de personnalité reflétant la vulnérabilité aux émotions négatives (Lang et al., 2004; Minelli et al., 2011; Terracciano et al., 2011). Ces résultats suggèrent un rôle du BDNF dans les troubles psychiatriques impliquant un défaut de régulation des émotions négatives, par exemple la dépression ou des troubles anxieux et de stress comme l'ESPT.

En effet, l'importance du BDNF dans la dépression n'est plus à démontrer, mais plutôt à comprendre. De nombreuses études documentent des diminutions des niveaux périphériques de BDNF chez des patients dépressifs (Cattaneo et al., 2016; Gervasoni et al., 2005), ainsi qu'une augmentation de ces niveaux associée à une amélioration des symptômes après un traitement antidépresseur par les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (Molendijk et al., 2011). Chez des victimes du suicide, on observe des diminutions centrales du BDNF et de son récepteur TrKB dans l'hippocampe et le CPF (Dwivedi et al., 2003; Pandey et al., 2008). Bien que les liens entre BDNF périphérique et central ne soient pas totalement clairs, il est estimé que le cerveau produirait la moitié du BDNF retrouvé en périphérie (Rasmussen et al., 2009) : les mesures du BDNF périphérique sont généralement corrélées à celles du fluide cébrospinal (Pillai et al., 2010), reflétant ainsi l'état du cerveau. En effet, le BDNF traverse aisément la BHE (Pan et al., 1998) et pourrait donc être employé comme marqueur périphérique révélateur de l'état cérébral.

Dans le contexte des vulnérabilités psychiatriques post-TC, il serait intéressant de déterminer si des modifications du BDNF cérébral, en particulier en lien avec les comportements anxio-dépressifs, prédisent un état de type pathologique. Le BDNF périphérique pourrait être utilisé comme marqueur de ces modifications cérébrales, et donc des vulnérabilités psychiatriques.

2.2.2 Régulation transcriptionnelle du Bdnf

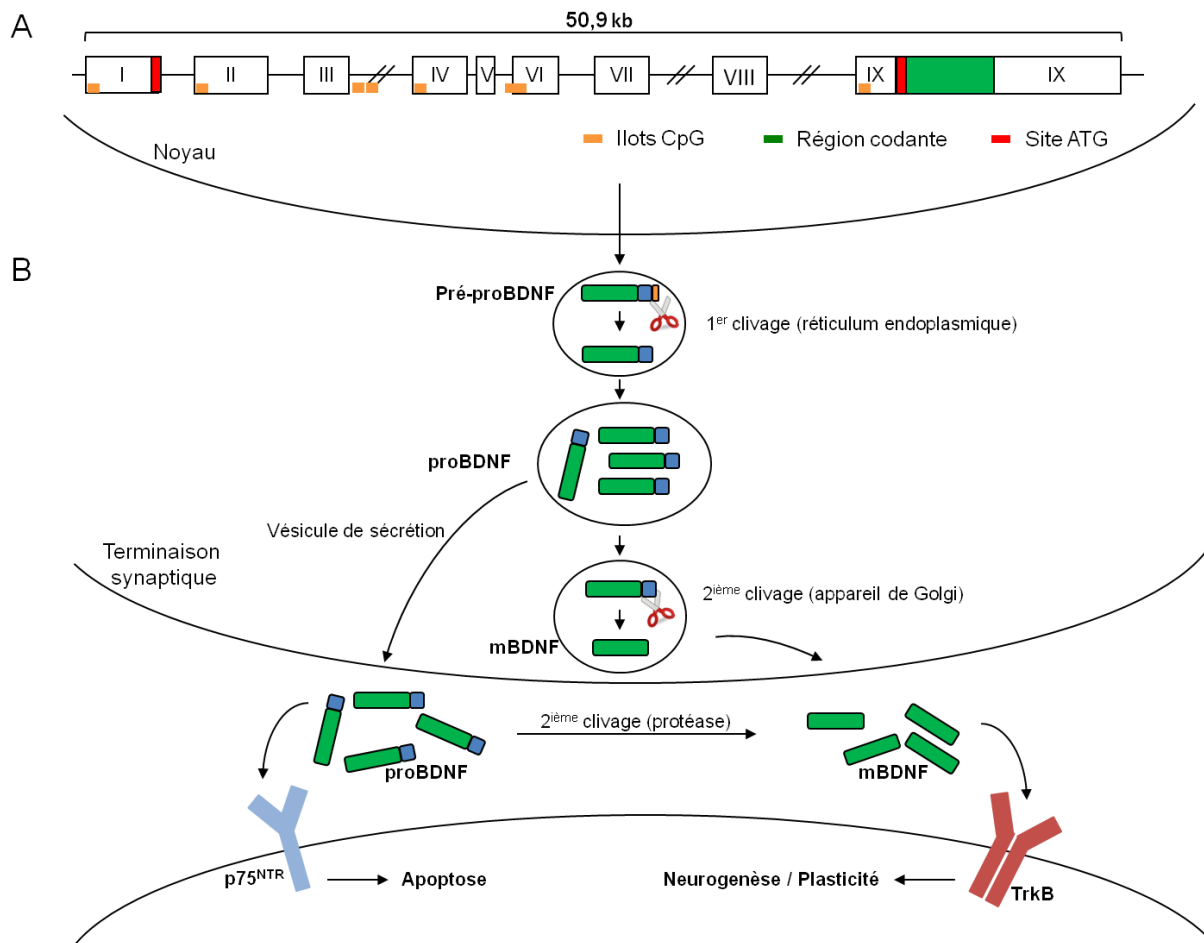


Figure 14. Régulation transcriptionnelle du Bdnf. Différents exons peuvent être transcrits avant l'exon IX à des fins de régulation de l'expression. L'exon IX est ensuite transcrit en pro-BDNF, qui est maturé en BDNF ou non, si le système doit stimuler soit p75^{NTR} ou soit TrkB. D'après Stragier (2014).

L'organisation structurale et l'expression du Bdnf sont complexes, mais il existe peu de différences entre celle des humains et celle des souris. Chez la souris, il comporte 9 exons d'après la nomenclature (Figure 14) définie par Aid et al (2007), contre 11 exons chez l'homme, menant à 11 et 19 transcrits, respectivement, d'après la base de données « Ensembl » (Ensembl.org, 2019). La complexité de ce gène provient du fait que seul le dernier exon sera traduit, les différents exons ayant chacun leur propre promoteur servant à l'adressage spatial et temporel régulant la sécrétion du BDNF. Dans le cerveau adulte, les exons I, III, IV, VI, et VIII sont les plus exprimés (l'exon IX reflétant la totalité des exons transcrits puisqu'il est toujours présent ; Figure 14), et on observe différents profils d'expression en fonction de la région cérébrale (Aid et al., 2007). Des expériences employant l'administration d'acide kaïnique, qui stimule l'activité neuronale, ont révélé

que les exons I, IV, V, VII et VIII sont activité-dépendants dans l'hippocampe, augmentant fortement à 3h et 6h post-administration, cette augmentation se maintenant jusqu'à 24h pour l'exon IV. Dans le contexte des comportements de peur, nous nous focaliserons sur les exons I et IV qui sont les plus étudiés dans la réponse au stress. Par exemple, on observe une diminution des exons IV et V dans l'hippocampe de souris exposées au stress social, un modèle de dépression (Tsankova et al., 2007)

2.2.3 Le génotype val66met

Une des méthodes permettant d'étudier l'impact causal du BDNF dans nombre de phénomènes psychiatriques est de s'intéresser à son polymorphisme le plus connu : celui touchant le nucléotide nommé rs6265. Ce génotype serait présent chez environ 30% de la population caucasienne à l'état hétérozygote et 4% à l'état homozygote. Aussi appelé val66met, celui-ci conduit au remplacement d'un acide aminé valine par un acide aminé méthionine en position 66. Étant localisée dans le pro-domaine du BDNF, cette mutation perturbe son interaction avec le récepteur à la sortiline, responsable du triage présécrétoire du BDNF (Kowiański et al., 2018). En la transfectant dans des neurones hippocampiques en culture, il a été montré que cette mutation limite le trafic dendritique du BDNF impliqué dans sa sécrétion activité-dépendante, conduisant à une diminution des capacités de potentialisation à long terme, et donc d'apprentissage. Chez l'homme, il a été associé à une activation des neurones hippocampiques plus faible lors d'une tâche de mémoire de travail, ainsi qu'à une mémoire épisodique diminuée (Egan et al., 2003).

Au niveau psychiatrique des méta-analyses ont associé ce génotype à la dépression (Zhao et al., 2018), aux comportements suicidaires (Zai et al., 2012), et à une réponse antidépressive diminuée suite aux traitements chroniques avec des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (Yan et al., 2014). En ce qui concerne les émotions et les comportements de peur, les individus ayant ce génotype ont un hippocampe réduit (Molendijk et al., 2012) et présentent une activation augmentée de l'hippocampe en réponse à des mots négatifs, ou de l'amygdale en réponse à des stimuli émotionnels (Montag et al., 2008). Lors du conditionnement de la peur, l'apprentissage de l'association CS-US se fait normalement, mais c'est l'extinction du CS qui est diminuée. Ceci est associé à une hypoactivation du vmPFC et une hyperactivité de l'amygdale lors

de la présentation du CS (Soliman et al., 2010). Cette perturbation des réponses émotionnelles est aussi observée chez les victimes d'abus dans l'enfance : les porteurs de val66met ont plus de difficulté à recontextualiser leurs souvenirs traumatiques en thérapie (Miu et al., 2017), un phénomène pouvant rendre difficile l'extinction de la peur associée.

Ces perturbations sont pertinentes au TC, dans lequel on observe que l'allèle val66met est associé à la présence de plus de symptômes dépressifs dans les semaines suivant l'accident (Wang et al., 2018b). Bien qu'il n'y aurait pas nécessairement d'association entre ce génotype et les niveaux périphériques de BDNF (Terracciano et al., 2013), l'étude des individus portant cette mutation ouvre une fenêtre sur l'importance du BDNF dans les vulnérabilités psychiatriques.

3. BDNF, état de stress post-traumatique et comportements de peur

3.1 Neuroanatomie de la signalisation BDNF

3.1.1 Dans le conditionnement de la peur

La mise en jeu complexe du BDNF dans les comportements de peur peut être étudiée par différentes manipulations du BDNF, et est désormais relativement bien établie.

- Dans l'amygdale

En ce qui concerne l'acquisition de la peur, c'est dans l'amygdale que le BDNF est impliqué. Ses niveaux sont augmentés par l'association son-choc, et ceci est associé à la phosphorylation de TrKB dans cette même région (Ou et al., 2010; Rattiner et al., 2004a). Une semaine plus tard, une augmentation de la croissance dendritique est observée dans l'amygdale. La délétion de TrKB bloque l'acquisition de la peur conditionnée sans affecter les réponses de peur innées (Ou et al., 2010; Rattiner et al., 2004a), suggérant une certaine spécificité de ce mécanisme pour l'apprentissage de la peur. Il en est de même chez les animaux hétérozygotes *Bdnf +/-* pour qui l'acquisition du CS est diminuée, tout comme l'activité de l'amygdale lors de l'exposition (Harris et al., 2016).

- L'aire prélimbique du cortex frontal

Rappelons d'abord que le cortex frontal contient deux sous-régions différenciellement impliquées dans les comportements de peur : le CCA et le CPFvm. Ici, nous emploierons les termes d'aire prélimbique et d'aire infralimbique, respectivement, puisque les études citées ont été réalisées chez l'animal.

L'aire prélimbique aussi est impliquée dans l'apprentissage de la peur. Bien qu'une délétion spécifique du Bdnf dans l'aire prélimbique n'affecte pas l'apprentissage de l'association CS-US, sa consolidation est diminuée (Choi et al., 2010). La consolidation est l'ensemble des phénomènes neurobiologiques mis en place à la suite d'un apprentissage ayant pour but de le cimenter afin qu'il puisse être utilisé à l'avenir. Ainsi, l'absence de BDNF dans l'aire infralimbique n'empêche pas l'animal d'exprimer la peur du CS lors de l'acquisition CS-US, mais lorsque le CS est testé le lendemain la mémoire associée est moins forte. Ceci peut être inversé par l'infusion d'un agoniste TrKB directement dans cette région. Cependant, l'extinction de la peur induite n'est pas affectée (Choi et al., 2010). En effet, le BDNF dans le cortex prélimbique serait impliqué seulement dans l'expression et la consolidation de la peur conditionnée (Choi et al., 2010). Néanmoins, l'administration dans l'aire prélimbique de rapamycine, un inhibiteur de la voie mTOR (« mammalian target of rapamycin », une voie de proplasticité activée par BDNF), diminue la reconsolidation de la peur et facilite l'extinction (Levin et al., 2017). On retrouve ici l'opposition dynamique qui existe entre la mémoire de peur, d'une part, et la mémoire d'extinction de la peur, d'autre part. L'une peut donc être affaiblie au profit de l'autre.

3.1.2 Dans l'extinction de la peur

- Rôle de l'hippocampe

Cette opposition dynamique est retrouvée au sein même de l'hippocampe. Nous avons déjà vu que l'hippocampe est impliqué dans le conditionnement contextuel, néanmoins, l'hippocampe est une région particulière en lien avec les mémoires de peur : les niveaux de BDNF dans l'hippocampe augmentent après le conditionnement (Takei et al., 2011), mais c'est aussi le cas après l'extinction (Rosas-Vidal et al., 2014). Le BDNF dans l'hippocampe est d'ailleurs parfois considéré comme étant plus important pour l'extinction que l'acquisition de la peur. Par exemple, une délétion du gène Bdnf dans

l'hippocampe dorsal n'affecte pas l'acquisition ou l'expression de la peur conditionnée, mais diminue la capacité à éteindre cette peur, qu'elle soit contextuelle ou indicée (Heldt et al., 2007). Le BDNF dans l'hippocampe est également mis en jeu pour la reconsolidation de la mémoire d'extinction, un processus qui intervient lorsqu'on réexpose l'animal au CS éteint. Cette réexposition provoque un rappel de la mémoire d'extinction qui la rend temporairement modulable, pouvant être soit renforcée, soit affaiblie. Durant cette période, l'infusion d'anticorps anti-BDNF dans l'hippocampe permet d'affaiblir la mémoire d'extinction, provoquant une résurgence de la peur conditionnée (Radiske et al., 2015).

L'hippocampe ne réalise pas toute cette fonction de manière isolée : l'infusion de BDNF dans l'hippocampe augmente l'activité neuronale dans le cortex infralimbique, mais pas dans le cortex prélimbique, et augmente en parallèle la capacité d'extinction de l'animal. De plus, chez les animaux ayant une capacité réduite d'acquies l'extinction de la peur, il a été trouvé une diminution du BDNF dans la partie de l'hippocampe innervant le cortex infralimbique. Chez ces animaux, l'infusion de BDNF dans l'hippocampe permet de diminuer l'expression de la peur conditionnée et ceci est aboli par l'infusion d'anticorps anti-BDNF dans le cortex infralimbique (Peters et al., 2010). Dans l'ensemble, ces données confirment l'implication du BDNF dans l'extinction induite par un réseau de neurones reliant le cortex infralimbique à l'hippocampe.

- L'aire infralimbique du cortex frontal

C'est dans l'aire infralimbique que le BDNF est « nécessaire » et, de façon plus étonnante, « suffisant » à l'extinction. Pour l'aspect dit « nécessaire », il a été montré que l'administration d'un anticorps anti-BDNF dans cette région supprime la capacité à éteindre la peur (Rosas-Vidal et al., 2014). Pour l'aspect dit « suffisant », des auteurs ont montré que la simple infusion de BDNF dans le cortex infralimbique permet d'induire l'extinction de la mémoire de peur conditionnée, même lorsqu'elle a été acquise jusqu'à 14 jours plus tôt (Rosas-Vidal et al., 2014). Néanmoins, comme vu précédemment, en conditions normales l'implication du cortex infralimbique dans l'extinction se fait suite à la mise en jeu de l'hippocampe.

Au vu de la centralité du BDNF dans la neurobiologie des comportements de peur, nous avons voulu nous intéresser à son évolution suite à un TC et en lien avec les

comportements de peur. Pour des questions techniques, les dosages de la protéine BDNF chez la souris posent souvent un obstacle, et nous avons donc choisi de nous intéresser plutôt à l'expression des ARNm de Bdnf.

3.1.3 Épigénétique et expression du Bdnf dans le comportement de peur

L'étude de l'expression du Bdnf dans le cadre des comportements de peur permet de voir la mise en jeu de ses différents exons selon le comportement précis étudié. Comme nous allons le voir, les exons principalement mis en jeu dans le conditionnement et l'extinction de la peur sont les exons I, IV, et VI.

- Dans le conditionnement de la peur

Lors de l'apprentissage de l'association CS-US, on observe une augmentation des exons I et IV dans l'amygdale, sans effet sur les exons II et VI (Rattiner et al., 2004b). Suivant le conditionnement au contexte chez le rat, les transcrits de l'exon IV augmentent, mais pas ceux de l'exon I. De façon cohérente, l'acétylation des histones H3 et H4 n'augmente qu'au niveau du promoteur de l'exon 4 (p4 ; Lubin et al., 2008). En revanche, on peut voir la complexité de l'épigénétique au niveau du profil de méthylation : les régions promotrices des exons I et IV sont moins méthylées post-conditionnement alors que seuls les transcrits de l'exon IV augmentent (Lubin et al., 2008). On retrouve cette complexité en employant des inhibiteurs des DNMT : ceux-ci induisent une augmentation de la méthylation du p4, associée à une diminution des ARNm de l'exon IV, alors que l'inverse aurait été attendu (Lubin et al., 2008). Chez la souris, les exons I, IV, et VI sont augmentés dans l'hippocampe par le conditionnement contextuel jusqu'à 24h post-séance, et ceci était associé à une hypométhylation de l'îlot CpG entre les exons III et IV seulement.

Malgré certains résultats difficiles à comprendre, les marques épigénétiques restent très pertinentes pour la compréhension des comportements de peur de type pathologique. Les souris femelles ont parfois une capacité moindre à éteindre la peur indicée comparativement aux souris mâles. La faculté d'extinction des femelles peut être améliorée par une administration d'un agoniste TrKB. De façon logique, les transcrits de

l'exon IV sont moins augmentés dans le CPF des femelles après la séance d'extinction et ceci est associé à une hyperméthylation du p4 (Baker-Andresen et al., 2013).

Le stress en lui-même a un effet sur l'expression du Bdnf dans les régions qui nous intéressent. Dans un modèle de stress psychosocial d'ESPT impliquant des stress sociaux et des expositions à des chats, il a été trouvé une augmentation de la méthylation de l'exon IV du Bdnf dans l'aire CA1 de l'hippocampe, la région la plus sensible dans la résistance à la plasticité synaptique liée au stress, et une diminution des ARNm correspondants (Roth et al., 2011). La sensibilité du BDNF au stress pourrait être impliquée dans la diminution de la capacité à éteindre la réponse de peur. Dans un autre modèle, il a été montré qu'un « double coup », ici par l'exposition à un stress seul prolongé (décrit chapitre 2, section 3.1) avant l'administration du conditionnement de la peur, augmente la réponse de peur des animaux lors du conditionnement. Les auteurs ont mesuré les exons IV et IX après la procédure de conditionnement de la peur, et ils étaient augmentés dans l'hippocampe. Néanmoins, cette augmentation était plus forte chez les animaux exposés au « double coup ». De plus, l'exon I était augmenté en réponse au conditionnement de la peur alors qu'il ne l'était pas chez les animaux non exposés au « stress seul prolongé » (Takei et al., 2011).

-Dans l'extinction de la peur

Alors que le conditionnement de la peur semble ne pas affecter l'expression du Bdnf dans le CPF, de façon prédictible, les exons I et IV y sont augmentés par l'extinction (Bredy et al., 2007). L'exon IV est d'ailleurs nécessaire à l'extinction et une délétion de ce gène produit un déficit de cette mémoire ainsi qu'une altération de la connectivité CPF-hippocampe (Hill et al., 2016). L'augmentation des exons I et IV se retrouve au niveau de l'acétylation des histones, qui est augmentée au niveau de leurs promoteurs (Bredy et al., 2007). L'épigénétique ne sert pas seulement de marqueur, c'est aussi un phénomène sur lequel on peut intervenir, d'où l'intérêt de son étude. Il avait déjà été montré que l'administration intrahippocampale de trichostatine A (un inhibiteur des HDAC) permettait de favoriser l'extinction de la peur (Lattal et al., 2007), mais le mécanisme n'avait pas été exploré. D'autres auteurs ont pu montrer l'implication du BDNF. En employant un protocole d'extinction faible (n'induisant pas l'extinction complète de la réponse de peur), ils ont montré que le BDNF peut être amplifié par l'administration systémique de valproate (un inhibiteur des HDAC). Ceci était associé à une augmentation

de l'acétylation H4 des promoteurs p1 et p4 ainsi que des ARNm de l'exon IV dans le CPF (Bredy et al., 2007).

4. Le BDNF dans le traumatisme crânien

4.1 Réponse du BDNF après un traumatisme crânien

- Dans le système nerveux central

La littérature sur l'évolution du BDNF du système nerveux central suite à un TC peut paraître discordante, montrant parfois des augmentations du BDNF suite au TC et parfois des diminutions. En réalité, cela serait dû à la sévérité de la lésion. Lorsque la lésion est trop sévère, le système ne parviendrait pas à en mitiger les effets et pencherait vers l'élimination des tissus endommagés, conduisant à une diminution du BDNF. Lorsque la lésion est moindre en revanche, le BDNF augmenterait dans un effort de neuroréparation.

À court terme, le BDNF a tendance à augmenter suite à un TC, à la fois dans la zone lésée, mais aussi dans les régions plus distantes. Récemment, la cinétique du BDNF post-TC balistique (consistant à faire pénétrer un objet pointu au niveau du cortex frontal pour mimer l'effet d'un projectile balistique) a été assez précisément caractérisée dans le CPF et l'hippocampe. On observe une augmentation de celui-ci à court terme (après 1h dans le cortex lésé, après 6h dans l'hippocampe ; Madathil et al., 2017), qui se maintiendrait jusqu'à 14 jours post-TC (Rostami et al., 2014). De plus, bien que le BDNF soit principalement neuronal, ces augmentations ont lieu dans les cellules gliales (Madathil et al., 2017).

Dans les TC à crâne fermé en revanche, les niveaux de BDNF ont tendance à diminuer. Suite à un impact contrôlé sur crâne fermé, les niveaux hippocampiques de BDNF sont réduits relativement aux animaux sham à 3 jours (Ignowski et al., 2018). Dans les modèles de lâcher de poids, cette diminution est encore observée dans l'hippocampe après 2 semaines (Mychasiuk et al., 2015), et jusqu'à 27 jours dans le cerveau total (Jindal et al., 2017). D'autres auteurs ont aussi trouvé une diminution des transcrits I, IV, et XI dans l'amygdale à 48h se maintenant jusqu'à 30 jours (Sagarkar et al., 2017), ainsi qu'une

augmentation de la méthylation des promoteurs correspondants. Ces résultats sont évidemment particulièrement intéressants dans le contexte des mémoires de peur.

La contradiction apparente entre ces études viendrait donc des différences dans l'atteinte des tissus. En effet, le modèle de TC par lâcher de poids ne nécessite pas de craniotomie, qui en soit limite l'augmentation de la pression intracrânienne et donc la sévérité des atteintes post-TC (Friess et al., 2015). Le TC balistique en revanche nécessite l'ouverture du crâne, limitant l'augmentation subséquente de la pression intracrânienne.

Ces différences pourraient être résolues grâce à des études réalisées dans le modèle de la percussion de fluide. Celui-ci cause une lésion locale sévère, mais la craniotomie limite la pression exercée sur des sites plus distants. Suite à une percussion de fluide au niveau du cortex occipital, les niveaux de BDNF sont diminués en ipsilatéral, mais augmentés en controlatéral à 7 jours, relativement aux animaux sham. À 14 jours, le BDNF était augmenté des deux côtés du cerveau, suggérant qu'après que l'essentiel des dommages ait été généré, le cortex lésé parvenait à passer à la phase de neuroréparation. Dans l'hippocampe en revanche, plus distant de la blessure, le BDNF était augmenté des deux côtés à 7 jours, et seulement en ipsilatéral à 14 jours (Griesbach et al., 2002). D'autres auteurs ont obtenu des résultats similaires : les transcrits *Bdnf* sont augmentés dans l'hippocampe entre 1 heure et 72 heures post-percussion de fluide relativement aux sham (Grundy et al., 2000; Hicks et al., 1997), mais ils sont diminués au niveau du cortex lésé et tendent à augmenter dans des cortex plus distants (Hicks et al., 1997).

Dans le modèle de l'impact cortical contrôlé léger on retrouve cette dépendance de la sévérité dans la réponse BDNF post-TC. Chez l'adulte, après un TC léger, le BDNF est augmenté dans la zone lésée et dans des régions plus distantes (Oyesiku et al., 1999). Dans un modèle développemental d'impact cortical contrôlé sévère en revanche, le BDNF et ses transcrits sont diminués dans l'hippocampe jusqu'à 14 jours post-lésion, chez les animaux sham et TC, relativement aux naïfs (Schober et al., 2012a), et ceci est associé à de la mort neuronale dans l'hippocampe à 4 jour post-TC (Sönmez et al., 2015).

On voit donc bien que le BDNF a tendance à augmenter à la suite du TC dans un effort de neuroréparation, mais qu'une atteinte plus importante ou plus longue pourrait induire un effet paradoxal, diminuant le BDNF.

- Dans la périphérie

En parallèle à ces altérations centrales, on observe des diminutions du BDNF périphérique. Par exemple, le BDNF est diminué dans le sang 1 semaine post-TC sévère, et corrèle négativement avec la qualité de vie et la mortalité à un an (Failla et al., 2016; Korley et al., 2016), même s'il existe des évidences contraires (Simon et al., 2016). Par ailleurs, le BDNF a tendance à être augmenté dans le fluide cérébrospinal après un TC sévère (Failla et al., 2016). Le BDNF sérique et le BDNF du fluide cérébrospinal sont corrélés négativement, suggérant une séquestration du BDNF dans le cerveau dans un effort de neuroréparation (Failla et al., 2016). De plus, les niveaux périphériques de BDNF dans les semaines suivant l'accident diminuent de façon croissante avec la sévérité du TC (Kalish & Phillips, 2010).

Ainsi, le BDNF pourrait être un bon marqueur du TC et de la vulnérabilité psychiatrique qui en résulte. Par exemple, en ce qui concerne les TC légers, le polymorphisme val66met du *Bdnf* est associé à un volume d'hippocampe réduit, un résultat qui pourrait sous-tendre la vulnérabilité psychiatrique post-TCL (Hayes et al., 2018). En effet, une diminution du volume de l'hippocampe serait impliquée dans la physiopathologie de l'ESPT (Hayes et al., 2017b; Rubin et al., 2016; Shucard et al., 2012).

4.2 Effet des interventions sur le BDNF

Les effets d'interventions directes ou indirectes sur le BDNF dans le TC sont généralement positifs. Prenons le cas de l'exercice physique : dans un modèle de percussion de fluide induisant des déficits cognitifs et des diminutions du BDNF dans l'hippocampe 4 semaines post-TC, on observe un effet protecteur de l'exercice physique, quand ce dernier est débuté quelques jours après le TC. L'amélioration du profil cognitif induite par l'exercice physique se fait conjointement à une augmentation des niveaux de BDNF dans l'hippocampe (Chou et al., 2018). Dans l'ensemble, les données suggèrent un rôle bénéfique de la signalisation BDNF-TrKB après un TC. L'administration systémique d'un agoniste TrKB a des effets bénéfiques sur les performances cognitives et la plasticité synaptique, et ceci peut être bloqué par l'infusion d'un antagoniste TrKB dans l'hippocampe (Agrawal et al., 2015). La stimulation (Zhao et al., 2016), et la

potentialisation de TrKB (Marshall et al., 2017) suite à un impact cortical contrôlé, ou l'administration de nanoparticules contenant du BDNF ont tous des effets de type protecteurs dans un modèle de TC par lâcher de poids (Khalin et al., 2016). De plus, d'autres stratégies neuroprotectrices semblent elles aussi passer par le BDNF : dans un modèle de TC par lâcher de poids, la diminution de BDNF normalement observée dans l'hippocampe après 3 semaines peut être évitée grâce à l'administration d'aminoguanidine, un inhibiteur de l'oxyde nitrique synthase. Ceci induit une diminution du stress oxydant, qui permet de libérer la voie AMPc/CREB. Les niveaux de BDNF sont ainsi augmentés, diminuant les déficits de mémoire et d'apprentissage normalement observés (Wang et al., 2018a). Le BDNF est aussi impliqué dans la récupération neurologique induite par des cellules souches neuronales de cordon ombilical ou de moelle osseuse (Feng et al., 2017; Qi et al., 2018; Xiong et al., 2017).

Le BDNF serait impliqué dans la neuroréparation post-TC même dans les médecines alternatives. Il a été montré que la stimulation transcrânienne par ultrasons ou laser, des régimes alimentaires spéciaux, et même l'acupuncture exerceraient leurs effets bénéfiques sur le score moteur et mnésique d'animaux TC par le biais d'une surrégulation du BDNF et de la synaptogénèse (Li et al., 2017; Su et al., 2017; Wu et al., 2014; Xuan et al., 2015).

5. Le système "insulin-like growth factor"

5.1 Généralités

Le système IGF est un système hormonal comprenant des ligands, des récepteurs, et des protéines de transport (dites « binding proteins » ; Werner & LeRoith, 2014). Ce système est très important lors du développement, mais est aussi impliqué dans le maintien de fonctions physiologiques chez l'adulte. Son importance dans la pathogenèse de nombre de troubles psychiatriques suscite de plus en plus d'intérêt, notamment grâce à son potentiel en tant que voie d'intervention thérapeutique (Bach, 2004).

Ce système comprend 3 ligands : l'insuline, l'IGF1 et l'IGF2. Ils sont exprimés dans des tissus différents et n'opèrent pas les mêmes fonctions. L'insuline est la plus connue de ces hormones. Elle exerce principalement une action dans la régulation du

métabolisme en agissant sur des tissus liés à la prise alimentaire comme le tissu adipeux, le foie, et les muscles. Néanmoins elle peut aussi exercer une action sur le cerveau, où elle joue un rôle notamment dans la survie cellulaire en réponse à des stress comme l'hypoxie ou l'hypoglycémie (Werner & LeRoith, 2014).

Les IGF (incluant l'IGF1 et l'IGF2) sont membres de la superfamille des « insulin-like peptides » et comportent des séquences similaires à celles des chaînes α et β de la pro-insuline. C'est aussi le cas de leurs récepteurs, les IGFR, qui partagent une forte homologie de séquence et de fonction avec le récepteur à l'insuline, bien que leurs profils d'expression soient très différents (Werner & LeRoith, 2014). Le récepteur à l'insuline, l'IGF1R et l'IGF2R sont des homodimères, mais des hétérodimères du récepteur à l'insuline et de l'IGF1R peuvent aussi se former (Figure 15). Ligands et récepteurs peuvent interagir de façon croisée, même si l'affinité d'un ligand est beaucoup plus forte pour son propre récepteur. Comme le récepteur à l'insuline, l'IGF1R est un récepteur à tyrosine kinase qui, après avoir phosphorylé la protéine « insulin-like receptor substrate » 1, induit des voies de signalisation similaires comme la voie PI3K/protéine kinase B et MAPK/ERK (« mitogen-activated protein kinases » et « extracellular signal-regulated kinases »), qui sont impliquées dans des processus mitogéniques (Siddle, 2011 ; Figure 15). L'IGF2R quant à lui est un récepteur mannose-6-phosphate qui, selon les auteurs, serait soit un système d'élimination de l'IGF2, l'adressant aux lysosomes, soit un récepteur capable d'activer la voie de la protéine kinase C, impliquée dans différentes formes de plasticité (Figure 15). Il est ainsi souvent estimé que la majorité des effets d'IGF2 passent par le biais des IGF1R, et qu'IGF2R a surtout pour rôle de réguler les quantités d'IGF2, dont l'excès serait carcinogène (Fernandez & Torres-Alemán, 2012).

Les voies de signalisation induites par l'IGF vont recruter mTOR, la glycogène synthase kinase 3 (GSK3), et forkhead box O (FOXO), conduisant à la traduction de protéines, l'autophagie, l'apoptose, mais aussi la transcription de gènes, la prolifération, et la plasticité synaptique (Benarroch, 2012 ; Figure 15). Il est souvent difficile de distinguer les effets impliquant l'IGF1 de ceux mettant en jeu l'IGF2 puisque les études de délétion de gènes montrent que la délétion de l'un peut être compensée par l'autre (Ye et al., 2002). Néanmoins, la délétion de l'IGF1R peut être létale et affecte sérieusement le développement du système nerveux central (Sullivan et al., 2008).

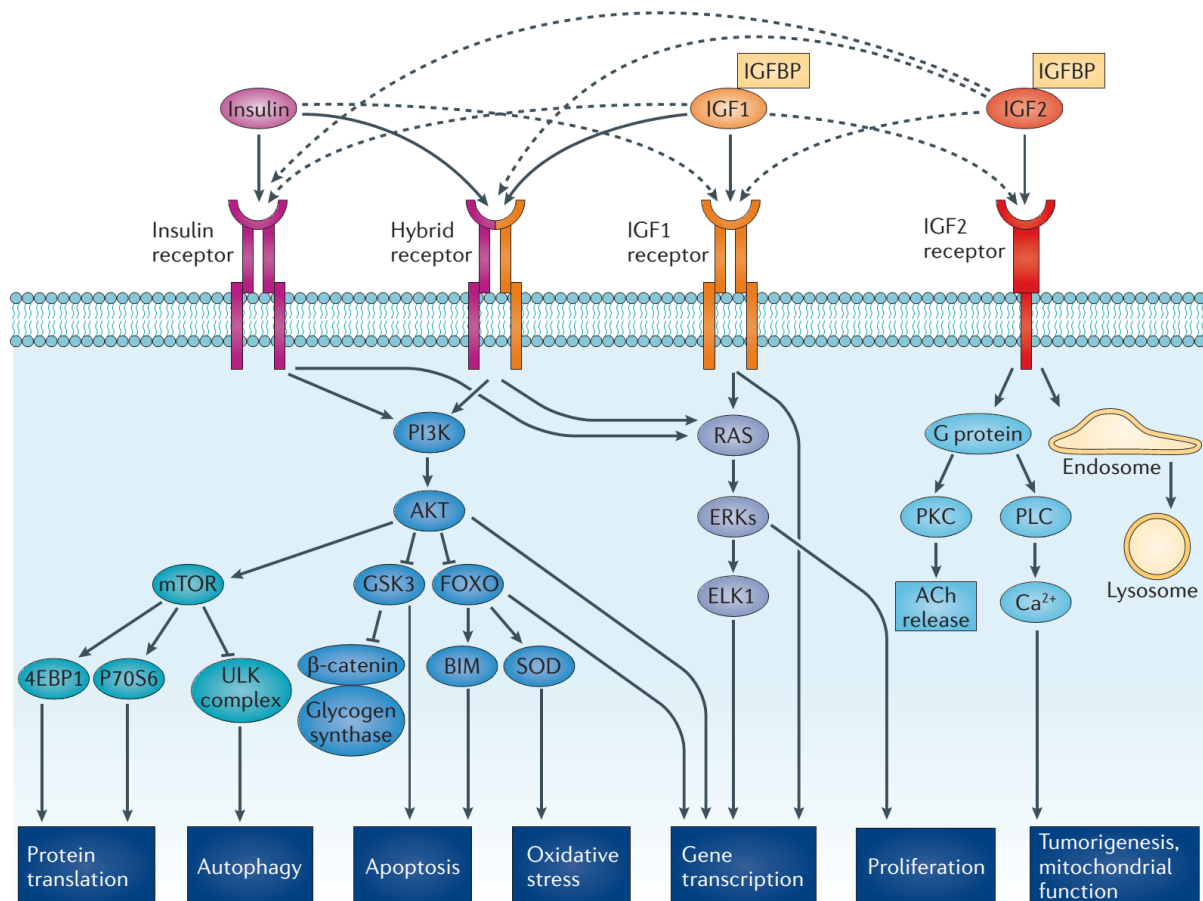


Figure 15. Les différents ligands et récepteurs du système IGF, et leurs voies de signalisation. La fixation de l'insuline à son récepteur a tendance à engager la cellule vers l'autophagie et l'apoptose. La fixation d'IGF1 à son récepteur favorise la transcription de gènes impliqués dans la croissance neuronale et la prolifération. La fixation d'IGF2 à son récepteur serait soit carcinogène soit une voie d'élimination de la protéine. Néanmoins, IGF2 peut se fixer à IGF1R. *D'après Fernandez & Torres-Alemán (2012).*

5.2 Les protéines de transport de l'IGF

Une autre part importante du système IGF est celle jouée par les « IGF-binding proteins » (IGFBP). Elles servent au transport des protéines IGF dans le sang et il en existe 6 types chez les mammifères (IGFBP 1-6), chaque type comportant un ou plusieurs sous types d'IGFBP. Néanmoins, il doit être noté que jusqu'à récemment, des molécules de la famille des protéines associées à la matrice extracellulaire étaient connues comme IGFBP. Le nombre exact d'IGFBP et leur nomenclature peuvent donc être différentes selon la date de publication. Les IGFBP subissent des régulations comparables aux IGF, notamment dans le contexte de la neuroréparation suite à des lésions (Fernandez & Torres-Alemán, 2012), ou dans la survie neuronale liée à l'apprentissage des comportements de peur (Agis-Balboa & Fischer, 2014). Elles peuvent se fixer aux IGF avec une affinité équivalente

et même meilleure que l'IGF1R. De ce fait, 99% des IGF dans l'environnement extracellulaire sont associés à une IGFBP, et on suppose qu'une partie de leur rôle est d'empêcher la fixation des IGF au récepteur à l'insuline puisque les quantités plasmatiques d'IGF seraient suffisantes pour causer de l'hypoglycémie en l'absence des IGFBP. Les IGFBP ont une structure suffisamment proche des IGF pour pouvoir interagir avec le récepteur à l'insuline. Dans le sérum, les IGF sont généralement liés à l'IGFBP3, mais aussi parfois à l'IGFBP5. IGFBP3 et 5 sont produites par le foie et répondent aux mêmes contrôles hormonaux qu'IGF1 (Allard & Duan, 2018). Dans le fluide cébrospinal en revanche, IGFBP2 serait la principale protéine responsable du transport des IGF. On remarque d'ailleurs une augmentation de ses niveaux après un TC (Zappaterra & Lehtinen, 2012). Les IGFBP peuvent servir à séquestrer les IGF pouvant agir sur les IGFR, ou à les rendre disponibles lorsqu'elles sont dégradées par des protéases. Finalement, les IGFBP exercent elles-mêmes des actions métaboliques dont la description est en dehors du champ de cette thèse, bien que ces phénomènes puissent être considérés comme faisant partie du système IGF étendu. La bonne interaction entre IGF et IGFBP permet la préservation des tissus neuronaux et le maintien de l'homéostasie (Allard & Duan, 2018).

6. L'IGF1

6.1 Généralités

L'IGF1 est une petite protéine de 70 acides aminés (7,6kDa), qui peut être sécrétée pour agir de façon autocrine, paracrine, ou endocrine. Concernant sa fonction endocrine, l'emploi d'animaux mutés pour l'Igf1 hépatique a permis de montrer qu'environ 75% des quantités circulantes d'IGF1 sont produites par le foie (Adamo et al., 1993 ; Figure 16). L'IGF1 hépatique est sous le contrôle de l'hormone de croissance (« growth hormone » ou GH), et l'axe GH/IGF1 est aussi connu sous le nom d'axe somatotrope. Cet axe a été découvert et décrit en 1981 et constitue un exemple classique de boucle de rétrocontrôle négatif (Figure 16). La GH, elle-même sous le contrôle de la « growth hormone-releasing hormone » et de la ghréline, va se fixer aux récepteurs GH, principalement sur le foie, et stimuler la production d'IGF1. Une fois entré en circulation, ce dernier va agir sur l'hypothalamus pour inhiber la production de GH (Puche & Castilla-Cortázar, 2012).

L'IGF1 circulant est impliqué dans le développement de la quasi-totalité des tissus, et même si une grande partie de celui-ci est produite par le foie, presque tous les tissus ont leur propre production, pour des fonctions autocrine et/ou paracrine (Figure 16 ; Puche & Castilla-Cortázar, 2012). L'axe GH/IGF1 a attiré beaucoup d'attention dans la recherche concernant les maladies liées à l'âge, ou nombre d'expériences animales de manipulation génétique ont montré que l'atténuation de cette voie de signalisation permettait d'augmenter considérablement la durée de vie (+30%) des animaux mutés. Ces résultats ont également été retrouvés chez l'homme où il a été observé que les centenaires portent fréquemment des mutations de l'IGF1R atténuant cette signalisation (Gubbi et al., 2018).

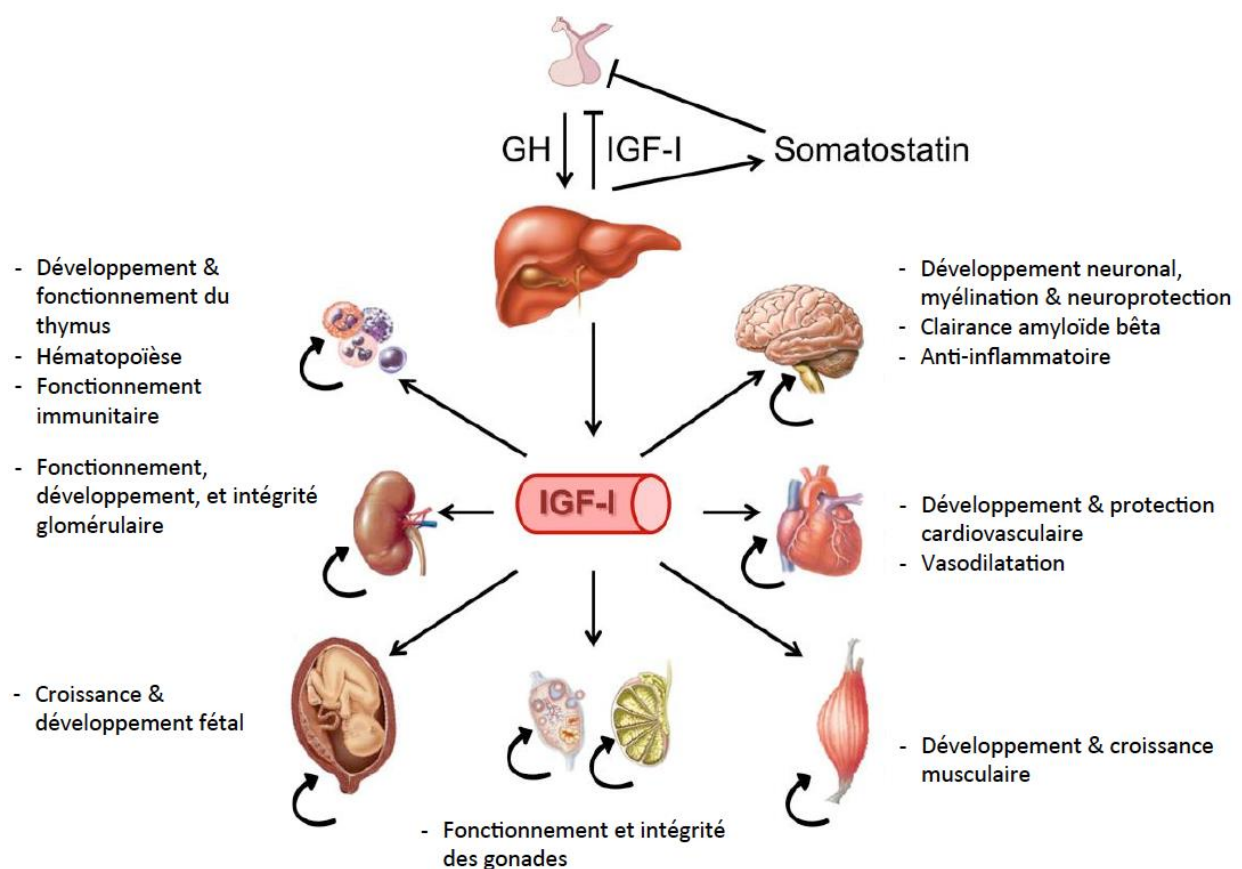


Figure 16. Cibles physiologiques de l'IGF1. IGF1 est produit par le foie sous le contrôle de l'hormone de croissance. Il participe à la croissance et au maintien de l'essentiel des tissus de l'organisme, avec un rôle particulièrement important dans le développement. *Modifié d'après Puche & Castilla-Cortázar (2012).*

6.2 Structure de l'Igf1

Le gène *Igf1* a une structure et une régulation relativement complexes. Il est composé de 6 exons dont l'épissage génère différents peptides post-traduction. Ces

peptides sont divisés en deux classes : la classe 1 débute par l'exon 1, et la classe 2 par l'exon 2, chaque exon ayant ses propres sites d'initiation de la transcription (Figure 17). Les exons 1 et 2 font partie du prépropeptide, alors que les exons 3 et 4 constituent le peptide mature, résultat final de tous les transcrits d'Igf1. Les exons 5 et 6 constituent le propeptide E, nommé Ea lorsque seul l'exon 6 est présent et Eb lorsque 5 et 6 sont présents (Figure 17). Les transcrits de type Igf1A sont en majorité, bien que le TC provoquerait une plus forte augmentation des transcrits Igf1B que des transcrits Igf1A au niveau du site de lésion (Schober et al., 2012b).

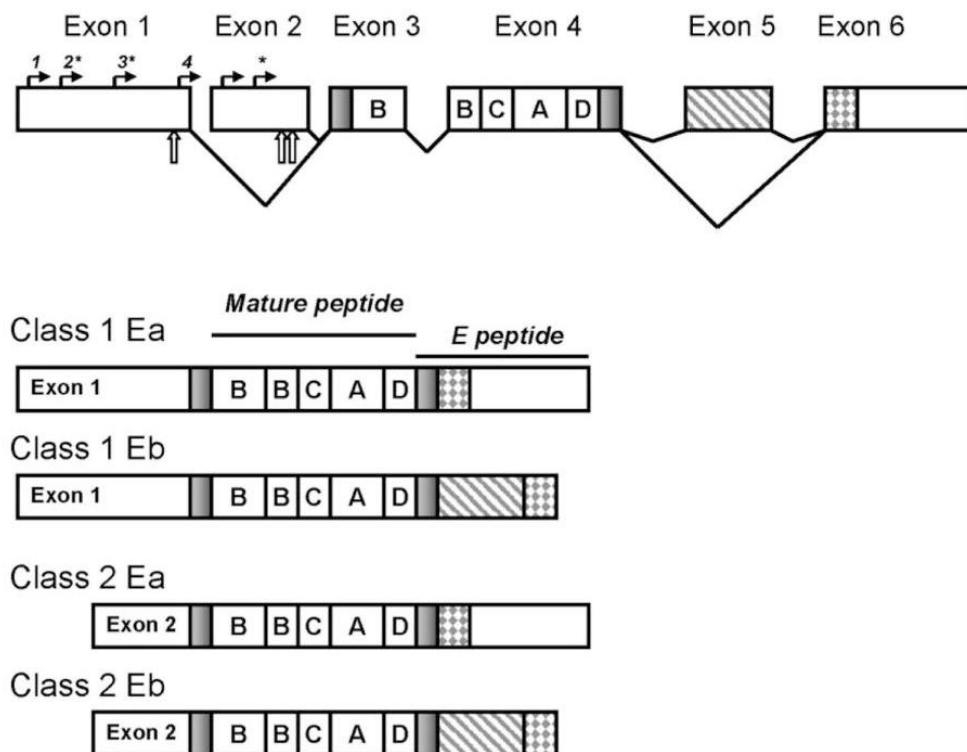


Figure 17. Structure des transcrits de l'Igf1. La transcription peut être initiée par l'exon 1 ou 2 (transcrits de classe 1 ou 2) et va toujours inclure les exons 3, 4, et 6. L'inclusion de l'exon 5 donnera les transcrits de type B, contenant le peptide Eb. Son exclusion donne lieu aux transcrits de type A. Le peptide mature est contenu dans les exons 3 et 4, les autres servant à l'adressage cellulaire. *D'après Oberbauer (2013).*

6.3 Fonctions de l'IGF1 dans le cerveau

Concernant le cerveau, l'IGF1 périphérique utilise le même mécanisme pour accéder au fluide cérébrospinal au niveau des plexus choroïdes, ou passer la BHE : la transcytose facilitée par IGF1R, et une protéine de transport appelée mégaline (ou « low

density lipoprotein related protein »). De plus, certaines évidences suggèrent l'existence d'un couplage neurotrophique permettant l'absorption de l'IGF1 sérique, en réponse à l'augmentation activité-dépendante du débit sanguin local (Benarroch, 2012). Il existe également une production cérébrale d'IGF dont l'action est autocrine ou paracrine, les sites de production d'IGF1 et d'IGF1R étant généralement colocalisés. Chez l'adulte, on retrouve l'IGF1R dans l'hippocampe, le cortex, le tronc cérébral, le cervelet, et l'hypothalamus (Fernandez & Torres-Alemán, 2012). La production d'IGF1 cérébrale est très importante durant le développement et les individus présentant une perte de fonction générale de la signalisation liée à IGF1 ont généralement des microcéphalies. La production cérébrale serait elle aussi sous le contrôle de la GH puisque l'hypophysectomie diminue les niveaux d'IGF1 et que ceux-ci peuvent être rétablis par l'administration intracérébroventriculaire (ICV) de GH (Hynes et al., 1987).

L'IGF1 cérébral est impliqué dans la plasticité neuronale : des concentrations croissantes d'IGF1 augmentent la fréquence des potentiels post-synaptiques excitateurs (Xing et al., 2007), et on observe *in vivo* une sécrétion activité-dépendante, une exocytose Ca²⁺-induite, d'IGF1 dans le bulbe olfactif (Cao et al., 2011). L'IGF1 stimule également la croissance dendritique et l'utilisation du glucose cérébral, des processus impliqués dans le vieillissement, le stress, la mémoire, et l'apprentissage (Niblock et al., 2000). Ces effets bénéfiques seraient au moins en partie expliqués par l'IGF1 périphérique : de nombreuses études ont fait le lien entre IGF1 périphérique et le déclin cognitif chez l'homme, et il a été montré chez le rat que l'administration d'IGF1 permet de limiter ces effets (Aleman & Torres-Alemán, 2009). Ce rôle dans la plasticité en fait un facteur neurotrophique intéressant dans le contexte de l'EPST.

6.4 Cognition, émotion et état de stress post-traumatique

L'IGF1 cérébral serait impliqué dans la cognition puisque son administration ICV améliore la mémoire spatiale, et ceci est couplé à une augmentation de la neurogenèse dans l'hippocampe (Lichtenwalner et al., 2001). À l'inverse, une délétion conditionnelle de l'IGF1 astrocytaire conduit à un défaut de la mémoire de travail (Logan et al., 2018). En ce qui concerne la production endocrine, certaines données suggèrent qu'elle aussi participe aux fonctions cognitives : une délétion d'Igf1 dans le foie conduit à des

réductions de l'apprentissage spatial et de la potentialisation à long terme, qui peuvent être contrées par l'administration systémique d'IGF1, en dépit d'une production d'IGF1 centrale normale (Trejo et al., 2007).

Plus en lien avec l'ESPT, il a été observé qu'un traitement chronique systémique à l'IGF1 induit des effets antidépresseurs chez la souris (Duman et al., 2009). À l'inverse, ces mêmes auteurs ont montré que les effets antidépresseurs induits par l'exercice physique pouvaient être supprimés par l'administration d'anticorps anti-IGF1. Dans le TC chez l'homme, la baisse d'IGF1 serait corrélée aux symptômes dépressifs (Sung et al., 2016). Par ailleurs, les souris mutantes ayant des niveaux d'IGF1 périphériques réduits présentent des déficits de neurogenèse et de mémoire spatiale, ainsi que des symptômes d'anxiété et des comportements dépressifs qui peuvent être améliorés par l'administration systémique d'IGF1 (Trejo et al., 2008). Ce rôle a également été montré dans un modèle particulier d'ESPT chez la souris par exposition à un prédateur, suivie d'une extinction par l'exposition répétée aux stimuli correspondants. La première partie du protocole expérimental induisait des comportements d'anxiété chez les animaux, qui étaient associés à une baisse d'IGF1 dans le CPF et l'hippocampe. Chez les animaux exposés à l'extinction, dans la deuxième partie, le profil anxieux était largement amélioré et ceci était associé à une normalisation des niveaux d'IGF1 dans l'hippocampe, sans effet dans le PFC (Ogundele et al., 2017). En dépit des modifications d'IGF1 mesurées en lien avec le conditionnement et l'extinction de la peur, des expériences d'administration d'IGF1 dans l'hippocampe ou l'amygdale n'ont pas montré d'effet dans la mémorisation de la peur contextuelle ou indicée (Stern et al., 2014a). En revanche, dans le modèle du « stress léger chronique et imprévu » de l'ESPT, consistant à exposer l'animal à des stress physiques régulièrement sur une longue période, les administrations systémiques d'IGF1 ou d'IGFBP2 améliorent les symptômes de type ESPT : ils favorisent l'extinction de la peur contextuelle, améliorent les symptômes de type dépressif, et augmentent la densité des épines dendritiques dans le CPF. De façon intéressante, les effets d'IGFBP2 sont plus importants que ceux d'IGF1 et n'impliquent pas par l'IGF1R (Burgdorf et al., 2017).

Ainsi si l'IGF1 ne semble pas essentiel aux comportements de peur, il est impliqué dans les phénomènes de stress et pourrait ainsi être une cible innovante dans le contexte de la vulnérabilité à l'ESPT suite au TC.

6.5 L'IGF1 dans le traumatisme crânien

Nous avons déjà vu que l'IGF1 affecte la prolifération des neurones hippocampiques (Lichtenwalner et al., 2001), mais il est aussi impliqué dans d'autres phénomènes cellulaires importants dans le contexte du TC. Par exemple, l'exercice physique induit une neuroprotection sur différents types d'agressions cérébrales qui peut être supprimée par l'administration périphérique d'anticorps anti-IGF1 (Carro et al., 2001). En particulier, il favorise la différenciation en oligodendrocytes des cellules progénitrices de l'hippocampe, ainsi que l'angiogenèse (Aberg et al., 2006). La délétion de l'IGF1 cérébral réduit la capacité de myélination (Ye et al., 2002). Après une lésion dans le système nerveux périphérique, on observe une accumulation d'IGF1 au niveau du site de lésion, ainsi qu'une augmentation des IGF1R dans les cellules de Schwann (Sullivan et al., 2008). L'IGF1 est également impliqué dans la neuroprotection, atténuant notamment l'apoptose des neurones hippocampiques dans un modèle d'ischémie chez le rat (Tagami et al., 1997).

6.5.1 Réponse spontanée de l'axe GH/IGF1

De par le rôle de l'axe GH/IGF1 dans la neuroprotection et la neurogenèse, la recherche explore de plus en plus cette cible dans le TC, d'autant plus que l'hypopituitarisme est une conséquence du TC qui a été largement documentée (Giuliano et al., 2017; Ioachimescu et al., 2015; Undurti et al., 2018; Wilkinson et al., 2012). L'hypopituitarisme concerne également l'axe gonadotrope (Izzo et al., 2016), ce qui est d'importance pour les enfants atteints par un TC, et dont la puberté pourrait se retrouver affectée par l'hypopituitarisme (Dassa et al., 2019). *A contrario*, il doit être noté que certaines études ont trouvé une augmentation d'IGF1 périphérique se maintenant jusqu'à 14 semaines après une fracture traumatique de l'os ou après un TC (Wildburger et al., 2001).

Dans l'ensemble, chez l'homme, cet hypopituitarisme peut se traduire par des diminutions directes d'IGF1 (Sung et al., 2016), mais pas toujours, et il se mesure plutôt *via* les taux de GH (Lithgow et al., 2018). Si les niveaux d'IGF1 post-TC sévère ne peuvent pas être utilisés pour prédire la mortalité (Hohl et al., 2014), ils prédisent la récupération

de la substance blanche et de la mémoire (Feeney et al., 2017). En revanche, dans le cas de l'ischémie cérébrale, l'IGF1 sérique permet de prédire le devenir à long terme des patients (Okazaki et al., 2014). De façon intéressante, il est estimé que la cause principale d'une baisse d'IGF1 post-TC serait un état de stress prolongé (Marina et al., 2015).

Chez l'animal en revanche, une diminution d'IGF1 périphérique est généralement observée, mais il y a des exceptions (Greco et al., 2013). D'autres ont observé une diminution de la GH sans effet sur l'IGF1 (Kasturi & Stein, 2009), et d'autres encore, dans un modèle de TC par lâcher de poids chez le rat immature, une diminution d'IGF1 dans le sérum jusqu'à 3 semaines post-TC corrélée à une perte des neurones hippocampiques, et des déficits de la mémoire spatiale (Ozdemir et al., 2012). Cette diminution périphérique est associée à une augmentation locale dans le tissu qui serait mise en place afin de contrer la neurodégénérescence induite par la blessure : chez l'adulte, une blessure balistique augmente les niveaux d'IGF1 à proximité de la lésion pendant 7 jours, avec un pic à 3 jours, la production étant de nature gliale et neuronale jusqu'au pic, puis principalement gliale par la suite (Madathil et al., 2017). Dans un modèle de TC chez le rat immature, une augmentation des transcrits d'Igf1 au niveau de la lésion a lieu dès le premier jour post-TC, et se maintient jusqu'à environ deux semaines relativement à des témoins opérés (Schober et al., 2010), avec divers profils observés selon la classe de transcrits Igf1 étudiée. Logiquement, les auteurs ont observé en parallèle une augmentation de l'acétylation des histones au niveau des promoteurs p1 et p2. Plus récemment, des auteurs ont mis en évidence que l'augmentation d'IGF1 au niveau du site de lésion était moins forte chez les souris présentant des niveaux périphériques plus diminués, et ont suggéré que l'IGF1 périphérique entrainé dans le cerveau pour participer à la neuroréparation (Santi et al., 2018a).

L'importance de cette réponse de l'axe GH/IGF1 dans les mécanismes de neuroréparation a aussi été soulignée par différentes expériences de manipulation des niveaux d'IGF1.

6.5.2 Effet d'interventions sur l'IGF1

L'IGF1 a généralement un rôle bénéfique sur la croissance neuronale et la neuroréparation, en particulier dans le contexte du TC.

Dans un modèle de souris mutantes surexprimant IGF1, on observe une augmentation des neurones hippocampiques immatures (un marqueur de la neuroréparation) et une meilleure différenciation neuronale 10 jours post-TC, ainsi qu'un profil morphologique comparable à celui des souris sham (Carlson et al., 2014). Ces mêmes auteurs ont par la suite généré un modèle de surexpression d'IGF1 spécifique aux astrocytes réactifs, et ont observé des effets bénéfiques similaires en termes de neurogenèse ainsi qu'une amélioration du score neurologique et cognitif (Madathil et al., 2013). Des résultats semblables peuvent être obtenus avec une infusion ICV d'IGF1 qui produit aussi une amélioration des capacités motrices et cognitives (Carlson & Saatman, 2018). Une administration systémique post-TC semble également avoir un effet bénéfique sur la mémoire spatiale (Saatman et al., 1997), et ceci est associé à l'activation d'IGF1R et de ses voies de signalisation dans l'hippocampe. Il a aussi été trouvé que l'administration systémique de progestérone, qui augmente la densité neuronale post-TC, produit également une augmentation des niveaux sériques d'IGF1 corrélée à une diminution des mesures d'anxiété (Baykara et al., 2013).

Néanmoins la littérature contient des contradictions quant aux possibilités d'intervenir sur le système IGF1 : d'autres auteurs n'ont pas trouvé d'effet bénéfique d'une administration systémique d'IGF1 sur le profil neuronal dans l'hippocampe (Sama et al., 2018). Ceci rejoint des résultats obtenus chez l'homme qui suggèrent que si un traitement chronique par de la GH permet bien d'augmenter les niveaux périphériques d'IGF1, ceci n'est pas associé à des améliorations du score neuropsychiatrique (Dubiel et al., 2018). Ces contradictions pourraient être résolues par l'existence d'une fenêtre thérapeutique très courte pour l'IGF1 ou d'autres facteurs de croissance, qui auraient un effet bénéfique sur la mort neuronale seulement si administrés pendant les premières heures post-trauma (Guan et al., 2003; Sharma et al., 2010).

En conclusion, la signalisation IGF1 est très importante dans les phases de récupération du TC. Si l'IGF1 n'est pas centrale dans les comportements de peur, son rôle dans la neuroréparation pourrait être indirectement impliqué dans la survenue de la vulnérabilité psychiatrique post-TC, faisant de lui un marqueur biologique potentiellement intéressant.

7. L'IGF-2

7.1 Généralités

L'IGF2 est un peptide de 67 acides aminés (7,5 kDa) comportant, comme IGF1, 50% d'homologie de séquence avec l'insuline. Il a la particularité d'être un gène soumis à empreinte, c'est-à-dire que seul l'allèle venant du père est exprimé (Cianfarani, 2012). La majorité des recherches menées à son sujet sont en lien avec ses effets cancérigènes, et il a été estimé que ce mécanisme d'empreinte a pour rôle de diminuer les risques liés à une surproduction d'IGF2 (Livingstone, 2013). Lui aussi serait produit par le foie bien qu'il soit retrouvé dans la majorité des tissus pendant le développement, où sa sécrétion est généralement autocrine ou paracrine (Livingstone, 2013). Chez l'adulte, il n'est produit que par le foie, les cellules épithéliales des méninges et les plexus choroïdes (Bergman et al., 2013). Le IGF2R quant à lui est surtout exprimé dans le cerveau, en particulier dans les méninges et les plexus choroïdes, mais aussi dans le cortex, le néocortex, et l'hypothalamus (Fernandez & Torres-Alemán, 2012). Néanmoins, IGF2 serait en quantités 3 fois supérieures à IGF1 dans la circulation sanguine (Humbel, 1990), et il serait également plus massivement exprimé dans le cerveau qu'IGF1 (Pardo et al., 2018). La production par le foie serait elle aussi sous le contrôle de la GH, mais de façon moindre qu'IGF1 : une production normale de GH stimule IGF2 de façon maximale, et l'on ne voit l'influence de celle-ci que dans le cas de déficiences en GH, générant des diminutions d'IGF2 (Zapf et al., 1981). Ceci peut avoir son importance dans le contexte des déficits en GH et de l'hypopituitarisme post-TC.

7.2 Structure de l'Igf2

Le fonctionnement du gène *Igf2* est bien moins connu que celui d'*Igf1*. Le gène d'*Igf2* contient 10 exons chez l'homme et 6 chez la souris, dont seuls les derniers sont codants dans les deux cas. Il y aurait 9 transcrits chez la souris d'après la base de données génétique « Ensembl », la transcription pouvant être initiée de 3 régions promotrices situées sur les 3 premiers exons (p1, p2 et p3, respectivement). Ceci donne lieu à 3 types de transcrits dont l'expression spatiale et temporelle varie au cours du développement.

Chez l'adulte, seuls les transcrits issus du p1 sont retrouvés dans le foie, les cellules des plexus choroïdes et celles des méninges (Bergman et al., 2013), et ce serait parce que p1 est bi-allélique (non soumis à empreinte) que les quantités d'IGF2 sanguines sont aussi élevées chez l'adulte (Livingstone, 2013). L'IGF2 est aussi synthétisé sous forme de pré-proprotéine, contenant un peptide signal en N-terminal servant à l'adressage intracellulaire. Le proIGF2 est ensuite clivé en C-terminal, et deux clivages de plus sont nécessaires pour arriver à la protéine mature. Néanmoins, on retrouve le proIGF2 et l'IGF2 (104 et 87 acides aminés) dans le sérum humain, et il a été proposé qu'ils possèdent tous les deux une activité biologique (Qiu et al., 2007). Quoi qu'il en soit, les anticorps utilisés en immunohistochimie ne permettent pas de distinguer ces différents peptides et dans l'optique d'utiliser IGF2 comme un reflet de la réorganisation trophique cérébrale, ces distinctions sont d'un intérêt limité.

7.3 Fonctions de l'IGF2

IGF2 est généralement impliqué dans la croissance durant la phase de développement, dans la plasticité neuronale et les apprentissages chez l'adulte. Chez les souris mutantes *Igf2* $-/-$, on observe un nanisme avec une croissance diminuée de 40%, la surexpression d'IGF2 produisant quant à elle des adolescents 2 fois plus gros que la normale (Cianfarani, 2012). Dans le cerveau, IGF2 est impliqué dans la neurogenèse chez l'adulte, en particulier au niveau des cellules souches neuronales du gyrus dentelé, et ce, par un mécanisme AKT-dépendant (Bracko et al., 2012). IGF2 est également impliqué dans la formation et la maturation des synapses dans le cerveau adulte (Schmeisser et al., 2012). De façon intéressante, les auteurs suggèrent que ceci passerait par la signalisation MEK/ERK, et de façon IGF2R-dépendante, suggérant bien que l'IGF2R n'est en fait pas seulement une voie d'élimination d'IGF2. De plus, la production d'IGF2 est régulée par CREB, qui est activé par la potentialisation synaptique NMDA-dépendante, ce qui en fait un des gènes de la réponse tardive de la plasticité synaptique (Alberini & Chen, 2012). Ainsi, l'administration systémique d'IGF2 améliore la mémoire spatiale, la reconnaissance d'objets et la mémoire sociale. Ces effets positifs étant obtenus sans affecter la flexibilité cognitive, IGF2 pourrait donc avoir un potentiel thérapeutique important dans l'ESPT (Stern et al., 2014b).

7.3.1 Lien avec l'état de stress post-traumatique

- Dans le conditionnement de la peur

Bien que le rôle d'IGF2 dans l'ESPT semble plus important que celui d'IGF1, les données restent rares. Il a été montré que l'exposition prénatale à l'alcool induit un défaut d'acquisition de la peur contextuelle, qui serait liée à une hyperglycémie chronique chez la mère. Dans ce modèle, les transcrits Igf2 sont diminués dans l'hippocampe des nouveau-nés, et l'administration postnatale d'antidiabétiques permet de rétablir leurs niveaux ainsi que l'acquisition de la peur contextuelle (Tunc-Ozcan et al., 2018).

D'autres manipulations affectant l'acquisition de la mémoire de peur contextuelle diminuent les niveaux d'IGF2 dans l'hippocampe (Yin et al., 2016) . À l'inverse, la surexpression d'IGF2 dans l'aire prélimbique favorise la rétention à long terme de la mémoire de peur contextuelle. L'administration d'IGFBP5 a des effets inverses sur celle-ci, probablement à cause de la séquestration d'IGF2 vis-à-vis des récepteurs. Ces effets d'IGF2 semblent passer par l'IGF1R, les auteurs ayant par la suite montré que la délétion d'Igf1r dans le cortex et l'hippocampe diminue la rétention à court terme (1 jour) et à long terme (28 jours ; Shahmoradi et al., 2015). D'autres auteurs ont confirmé cet effet d'IGF2 sur la mémoire de peur contextuelle à long terme, sans effet sur la peur induite, avec une administration systémique. Ils ont également observé une amélioration de la rétention à court terme (1 jour), cette fois pour ces deux types de conditionnement de la peur (Stern et al., 2014b). Étonnement, l'administration intra-amygdalienne d'IGF2 n'affecte pas l'acquisition de la mémoire de peur (Stern et al., 2014a). En ce qui concerne l'apprentissage de la mémoire d'évitement (constituée par l'association d'un choc électrique à un lieu), on observe l'augmentation des transcrits IGF2 dans l'hippocampe 20 heures après la séance. De plus cette mémoire peut être renforcée par l'administration d'IGF2 (mais pas d'IGF1) dans l'hippocampe durant la période de consolidation, et ceci est associé à la production de protéines impliquées dans la plasticité synaptique de l'hippocampe (Chen et al., 2011; Stern et al., 2014a). Une fois de plus l'administration d'IGF2 dans l'amygdale était sans effet. L'administration d'anticorps anti-IGF2R (mais pas anti-IGF1R) permettait de supprimer cet effet, suggérant un rôle pour IGF2R dans la consolidation de la mémoire de peur (Chen et al., 2011).

- Dans l'extinction de la peur

L'extinction de la peur, elle, induirait une augmentation des transcrits IGF2, tout en diminuant ceux d'Igfbp7, dans l'hippocampe (Agis-Balboa et al., 2011). Les auteurs se sont aussi intéressés à ces paramètres en lien avec la cinétique de l'extinction au fil de séances d'extinction répétées. De façon intéressante, les transcrits IGF2 augmentent lors de l'apprentissage de l'extinction (séance 1), mais pas une fois que l'extinction est acquise (séance 5). Un résultat inverse a été observé pour l'IGFBP7. Grâce à l'administration intra-hippocampique d'IGF2, d'IGFBP7 ou d'anticorps dirigés contre ces protéines, les auteurs ont pu confirmer l'effet pro-extinction d'IGF2 et anti-extinction d'IGFBP7. De plus, ils ont mis en évidence le rôle d'IGF2 dans la neurogenèse, en particulier la survie des neurones immatures de l'hippocampe (Agis-Balboa et al., 2011). Ces rôles opposés d'IGF2 et d'IGFBP7 sont cohérents avec l'effet séquestreur des IGFBP décrit précédemment (chapitre 3 section 5.2).

Alors qu'IGF1 semble n'être impliqué que de façon marginale dans les comportements de peur, IGF2 quant à lui, est impliqué à la fois dans le conditionnement et l'extinction de la peur, et pourrait donc être un outil d'intervention efficace.

7.3.2 Lien avec le traumatisme crânien

De nombreuses études montrent l'importance d'IGF2 dans la survie et la prolifération des neurones, en particulier dans l'hippocampe et les phénomènes d'apprentissage (Iwamoto & Ouchi, 2014), mais peu ont mis en évidence son importance dans la neuroréparation/neuroprotection. Alors que dans le système nerveux central IGF2 (comme l'IGF1 et l'insuline) est protecteur vis-à-vis de la toxicité induite par un stress hypoglycémique (Cheng & Mattson, 1992), dans les modèles *in vitro* ou *ex vivo*, il n'a pas été montré d'effets protecteurs d'IGF2 (Dikkes et al., 2007; Lee et al., 2017).

Dans un modèle de contusion cérébrale, aucune modification des niveaux d'IGF2 n'a été trouvée à proximité de la lésion, alors qu'IGF1 était augmenté (Sandberg Nordqvist et al., 1996). Dans une étude d'ischémie cérébrale, un effet négatif d'IGF2 a même été observé, et alors que l'administration ICV d'IGF1 permettait de réduire la mort neuronale au niveau de la lésion, la co-administration d'IGF2 antagonisait cet effet. Les auteurs ont suggéré que la compétition d'IGF1 et d'IGF2 pour les IGFBP était à l'origine

de cet antagonisme (Guan et al., 1996). *A contrario*, dans un modèle de lésion de nerfs faciaux, une augmentation des transcrits IGF2 est observée après deux jours (Grosheva et al., 2016). Il en est de même lors d'une lésion au niveau des nerfs périphériques, où on peut observer une augmentation des transcrits IGF2, particulièrement au niveau des jonctions neuromusculaires (Tam & Gordon, 2003). Dans une autre étude d'ischémie cérébrale, il a été montré que les bénéfices de l'exposition à de l'oxygène hyperbare sur la mort neuronale s'accompagnaient d'une augmentation des transcrits IGF2 (Hirata et al., 2007). Tout ceci pourrait suggérer un rôle secondaire pour l'IGF2 dans la neuroréparation. Il ne constituerait pas un effecteur principal sur lequel on pourrait intervenir, mais serait plutôt un modulateur de la neuroréparation.

En effet, une étude détaillée d'IGF2 dans un modèle de lésion cérébrale a pu mettre en évidence une régulation fine de celui-ci. IGF2 augmente fortement dans le fluide cébrospinal et atteint un pic 7 jours après la lésion, la production se faisant de façon endocrine, à distance du site, dans les plexus choroïdes. La colocalisation d'IGF2 au niveau des neurones, des astrocytes, des macrophages et des microglies à proximité des tissus lésés est favorisée par IGFBP2. Par la suite ses niveaux diminuent dans le fluide cébrospinal pour atteindre des niveaux normaux au bout de deux semaines, mais son expression reste forte dans les astrocytes au niveau de la lésion, et il est séquestré à cet endroit grâce à l'intervention d'IGFBP5 qui favorise une réponse de type autocrine/paracrine (Walter et al., 1999). Ces résultats suggèrent un rôle important de l'IGF2 cérébral dans la réparation post-traumatique. Plus récemment, une forte augmentation d'IGF2 a été trouvée dans le sérum de patients 3 jours après un traumatisme crânien, suggérant sa potentielle utilité en tant que marqueur (He et al., 2018).

En conclusion, le rôle d'IGF2 dans la neuroréparation post-traumatique n'est pas clair, mais son importance dans les comportements de peur n'est plus à démontrer. Le système IGF constitue ainsi un objet d'étude doublement intéressant dans le contexte de la recherche de marqueurs de la vulnérabilité post-TC à l'ESPT : d'une part, il comporte un volet plutôt périphérique (IGF1) et un volet plutôt central (IGF2), et de l'autre, il est soit plutôt impliqué dans la neuroréparation (IGF1) soit plutôt impliqué dans les comportements de peur (IGF2).

Objectifs de l'étude

Les données dont nous venons de discuter montrent que le TC est un facteur de vulnérabilité pour nombre de troubles psychiatriques, en particulier l'ESPT. Ces deux troubles, le TC et l'ESPT, présentent des altérations neuroanatomiques similaires et dépendent de systèmes neurotrophiques comme le BDNF et l'IGF. Chez la souris, un TCL expérimental peut induire des altérations comportementales, neuroanatomiques, et neurotrophiques comparables à celles observées chez l'humain. Néanmoins, peu d'études se sont intéressées aux effets à long-terme du TC sur ces paramètres, et les marqueurs de la vulnérabilité psychiatrique suite au TC manquent encore.

Dans ce contexte, nous avons souhaité déterminer les effets d'un TCL expérimental chez la souris C57BL/6J dans un modèle de l'ESPT. Les paramètres que nous avons évalués étaient les comportements de peur, d'anxiété et la mémoire spatiale, ainsi que les altérations neuroanatomiques et de substance blanche dans les circuits de la peur. Dans le but de trouver des marqueurs de la vulnérabilité psychiatrique induite par le TC, nous nous sommes intéressés à l'expression du Bdnf dans les circuits de la peur (Article 1).

Les résultats concernant l'expression du Bdnf central étant peu prometteurs en termes de marqueur biologique, nous avons décidé ensuite de nous intéresser au système IGF. Nous avons évalué son évolution dans le cerveau et la périphérie à court et long terme après le TCL. Dans le cadre de la vulnérabilité psychiatrique, nous avons aussi évalué les effets du conditionnement de la peur sur le système IGF ainsi que son interaction avec le TCL (Article 2).

Matériels et méthodes détaillés

1. Traumatisme crânien par impact cortical contrôlé

La procédure d'impact cortical contrôlé est réalisée sur des souris mâles C57BL6/J de 25 à 30g âgées de deux mois. L'induction de l'anesthésie se fait dans une boîte où passe un flux d'air comprenant 3% d'isoflurane et dure entre 1-2 minutes. La profondeur de l'anesthésie est ensuite contrôlée en pinçant la queue de l'animal, puis la souris est placée dans un cadre stéréotaxique, son museau étant dans un masque permettant de maintenir l'anesthésie ; la maintenance se fait à 1,5% d'isoflurane. La souris est fixée dans le cadre stéréotaxique avec des barres crâniennes cylindriques plutôt que les barres classiques pointues qui entrent dans les oreilles : elles s'apposent de part et d'autre de la mâchoire de la souris. Ces barres évitent tout risque de percer les tympons de la souris. Cela améliore le bien-être des animaux et assure que le conditionnement de la peur, qui nécessite des capacités auditives normales, se fera de manière optimale. La tête de la souris est ensuite désinfectée avec de la bétadine et une incision de la peau est pratiquée au-dessus du cortex pariétal gauche. La peau est dégagée du crâne et un foret dentaire permet de réaliser une crâniotomie de 4 mm de diamètre, en prenant soin de ne pas endommager la dure-mère. Puisque le foret dentaire réchauffe le crâne, un peu de saline est appliquée avant et après la crâniotomie pour le refroidir. La position antéro-postérieure et médiale de la crâniotomie est évaluée par rapport aux sutures du crâne pour placer l'impacteur au bon endroit. Les coordonnées de la surface de la dure mère sont obtenues avec l'aide d'un senseur (fixé directement sur l'impacteur) qui calibre automatiquement la position. Le senseur est retiré et l'impacteur (TBI 0310 Impactor, Precision System Instruments, États-Unis) délivre l'impact à la surface du cerveau à la vitesse de 3,5 m/s, descendant à une profondeur de 1 mm pendant une durée de 50 ms. Ces paramètres d'impact cortical contrôlé font partie des plus légers de la littérature en termes de sévérité du TC (Washington et al., 2012) et provoquent donc des déficits neurologiques mineurs (Taib et al., 2017). Un disque de cire chirurgicale (cire de Horsley, Ethicon, France) est ensuite placé au-dessus de la crâniotomie pour refermer la blessure. Des points de suture sont réalisés avec du fil (Ethilon, Ethicon, France) sur la peau pour refermer la plaie. L'opération se termine par l'administration i.p. de 250µL de saline pour

assurer une bonne hydratation de la souris, puis celle-ci est placée durant une heure dans une cage de réveil située dans une couveuse à 28°C, afin d'éviter une potentielle hypothermie post-chirurgicale. Finalement, l'animal est replacé dans sa cage d'origine dans l'attente des procédures suivantes. La chirurgie complète dure entre 12 et 15 minutes, et ce temps est maintenu constant y compris pour les témoins opérés qui ne subissent pas l'impact.

2. Conditionnement et extinction de la peur

Le conditionnement de la peur est soit réalisé seul (à J0, Figure 18 partie gauche), afin de déterminer ses effets propres, soit trois semaines après la chirurgie pour étudier son interaction avec le TC. Les animaux sont sortis de leurs cages d'accueil et rapidement placés dans la cage de conditionnement (MedAssociate, St-Albans, Etats-Unis), le contexte étant défini par la présence de lumière (19 x 22cm, 13 cm de hauteur, 50 lux de luminosité) et d'une odeur de vanille (1% d'extrait de vanille dans de l'éthanol à 75%). Le sol de la cage est électrifiable, et celle-ci se trouve dans un cubicule isolant des bruits extérieurs afin que seul le son conditionné (le CS ; 2,5 kHz, 85 dB) ne puisse être entendu par l'animal. Après une période de 3 minutes en ligne de base, qui permet de déterminer le niveau d'immobilité spontanée de la souris, le CS est présenté pendant 30 secondes, suivi immédiatement d'un choc électrique plantaire de deux secondes (le US ; 0,5 mA). Un « scrambler » permet de déplacer le choc aléatoirement sur l'ensemble de la grille afin que la souris ne le reçoive pas à un endroit fixe sur la peau pendant la totalité des deux secondes. Ceci permet à l'animal d'exprimer un comportement de fuite naturel et d'éviter toute blessure physique. Cette association CS-US est répétée 6 fois avec des périodes intermédiaires sans stimuli de 2 minutes. Généralement, on observe une augmentation de l'immobilité totale de l'animal (traduisant la réponse de peur appelée « freezing ») aux alentours du deuxième ou troisième CS, quand l'animal commence à consolider l'association CS-US. À la fin de la procédure, l'animal est rapidement replacé dans sa cage habituelle. Les cages sont nettoyées avec la solution de vanille/éthanol en préparation pour la cohorte suivante. La séance est filmée par une caméra placée au-dessus de la cage, permettant à un observateur de quantifier le freezing par « sampling ». Ceci est fait avec l'aide d'un métronome, permettant à l'expérimentateur de noter, à un moment très

précis, si l'animal est en freezing ou non, toutes les deux secondes, et donc d'établir le pourcentage de freezing pendant les périodes de 30 s du CS. Un évènement de freezing est noté si l'animal est absolument immobile, à l'exception de ses mouvements respiratoires.

La procédure d'extinction (J1, Figure 18, milieu) du CS est réalisée dans un autre environnement. En effet, l'étape de conditionnement va induire chez l'animal des associations entre le US (le choc) et le CS (le son), mais aussi entre le US et le contexte de la cage. Étant donné que nous nous intéressons ici à la peur indicée, et non pas contextuelle, qui est sous-tendue par des circuits neuroanatomiques un peu différents (l'hippocampe est impliqué dans la peur contextuelle, mais pas indicée), l'extinction du CS doit se faire dans un contexte différent. La procédure est donc réalisée dans une cage de plexiglas sans odeur (15 x 21 cm, 13 cm de hauteur), dans un environnement sombre. Après une période de 3 minutes sans stimulus, permettant d'obtenir le niveau basal de freezing de l'animal, celui-ci est exposé 40 fois au même son (2.5 kHz ; 30 s), chaque son étant séparé de 5 secondes de silence. L'animal exprime des niveaux de freezing élevés, comparables à ceux du dernier CS lors du conditionnement, pendant les deux premières minutes (4 premiers CS), puis ceux-ci chutent rapidement pour atteindre un minimum aux alentours de 10-20% après le dixième CS. Les niveaux de freezing ne se rapprochent néanmoins pas de 0%, d'abord parce que cette seule séance ne suffit pas à atteindre l'extinction complète, mais aussi parce que l'animal a déjà exploré son environnement lors de la ligne de base. L'animal a donc tendance, après un long laps de temps, à passer une petite partie de son temps en immobilité tranquille (pouvant être confondu avec la réaction de freezing). Les animaux sont immédiatement replacés dans leur cage habituelle après la procédure, et les cages d'extinction sont nettoyées avant de faire passer la cohorte suivante. La quantification du freezing se fait ici automatiquement grâce à une caméra infrarouge, sur un fond dégagé et illuminé par une plateforme infrarouge, et un logiciel de videotracking (Option Porsolt de Viewpoint, Lyon, France). Tout moment d'immobilité égal ou supérieur à 0,8 s est considéré comme du freezing, puis l'ensemble de ces moments sont additionnés dans le programme Excel afin d'obtenir le temps de freezing sur la période évaluée. Cette quantification automatique est similaire, au moins à 95%, avec la quantification par « sampling » manuelle.

Le deuxième jour d'extinction (J2, Figure 18, milieu) se déroule de la même façon que le premier. Lors des premiers CS, l'animal exprime déjà moins de freezing que lors

des premiers CS du jour précédent. Ceci indique le début de l'acquisition de l'extinction. Cette différence entre les deux premières minutes de J1 et de J2 peut être utilisée pour obtenir une mesure de la mémoire d'extinction de la peur. En soustrayant le niveau de freezing de J2 à J1, on obtient la réduction du temps de freezing qui reflète l'extinction. Plus cette valeur est grande, meilleure est l'acquisition de l'extinction.

Finalement, on procède à une journée de test de la rétention de l'extinction (J45, Figure 18, partie droite). La procédure d'extinction est suivie comme précédemment, mais cette fois-ci l'animal n'est exposé qu'à 4 CS. À nouveau, ces deux minutes peuvent être soustraites aux 2 premières minutes du J1 pour obtenir une mesure de la rétention de la mémoire d'extinction à long terme.

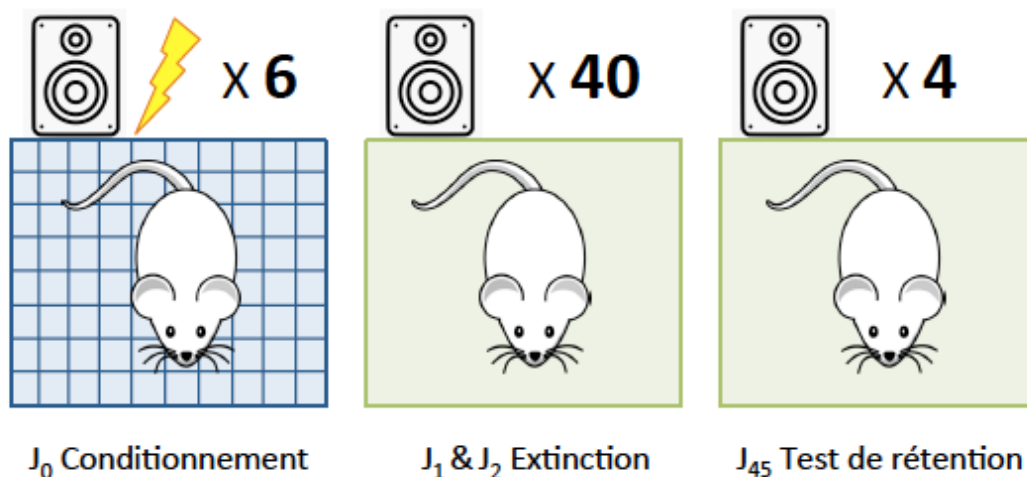


Figure 18. Les différentes étapes du conditionnement de la peur. Le premier jour, la souris est conditionnée dans un premier contexte par l'association répétée d'un son et d'un choc (6 fois). Les deux jours suivants, cette association est éteinte par l'exposition répétée au son seul (40 fois) dans un contexte complètement différent. Six semaines plus tard, la mémoire d'extinction est évaluée par 4 expositions au son initialement conditionné.

3. Score neurologique

Différents critères de type neurologique, évalués avec une valeur sur une grille d'évaluation, permettent de déterminer la présence d'un déficit neurologique chez les souris ayant subi une lésion cérébrale, comme décrit dans les études précédentes de notre équipe (Taib et al., 2017). Le score neurologique a été mesuré en aveugle, sans la connaissance du traitement chirurgical reçu par la souris. Plusieurs paramètres ont été évalués : l'absence de mouvements en cercle vers le côté (dont la mobilité pourrait être

réduite par le TC), la résistance à une poussée latérale (des deux côtés), et la sensibilité épidermique au niveau des oreilles. D'autres paramètres ont été évalués lorsque la souris était suspendue par la queue : l'absence de la flexion du corps, des membres inférieurs, et des membres postérieurs, la souris devant être en tension. Chaque élément était évalué sur deux points pour un score total pouvant aller jusqu'à 20, le score maximal indiquant l'absence de déficits neurologiques.

4. Mémoire spatiale et flexibilité cognitive (test de Barnes)

Le test de Barnes a pour but d'évaluer les capacités de mémoire spatiales des animaux. Il est réalisé sur une plateforme blanche circulaire (80 cm de diamètre) surélevée (50 cm de hauteur) dans une pièce fortement éclairée (400 lux). La plateforme contient 18 trous (Figure 19) et il existe une cache sous l'un de ces trous. La nature anxiogène de cet environnement incite la souris à aller se réfugier dans la cache. Au fil des séances, la souris apprend à se repérer dans l'espace pour trouver la cache à l'aide d'indices visuels situés sur les murs de la pièce (formes géométriques de couleur). Par la suite, un test de changement de consigne peut être réalisé pour évaluer la flexibilité cognitive de l'animal : la cache est située sous un nouveau trou afin d'évaluer le temps nécessaire à la souris pour comprendre qu'il faut chercher ailleurs.

Apprentissage de la consigne : la souris est placée au centre du dispositif, et 3 minutes lui sont laissées pour explorer la plateforme. Le nombre d'erreurs, c'est-à-dire le nombre de trous visités avant d'atteindre l'objectif, est quantifié manuellement par l'observateur. Grâce à un système de videotracking (Viewpoint, Lyon, France), la distance parcourue est aussi évaluée. Lorsque la souris atteint la cache, elle y est laissée 10 secondes avant d'être récupérée. Si la souris ne descend pas dans la cache, comme c'est le cas lors de la première séance, elle y est doucement dirigée par l'expérimentateur. L'apprentissage est réalisé 3 fois par jour, avec une période de deux heures au moins entre chaque essai, pendant 4 jours. Les résultats obtenus pour les 3 séances quotidiennes sont combinés et la moyenne sur la journée est utilisée comme résultat final. Le quatrième jour, immédiatement après le dernier essai, un test de rétention est réalisé : la cache est retirée et le comportement de la souris est observé pendant 1 minute afin de déterminer le temps et la distance que celle-ci passe dans le sextant cible (S1,

Figure 19), c'est-à-dire la tranche de la plateforme contenant le trou cible et les deux trous adjacents. Ce test permet d'évaluer la capacité de discrimination de la souris (en absence d'apprentissage elle devrait passer 1/6^{ème} de son temps dans un sextant) et de la comparer entre les différents groupes.

Changement de consigne: pour le changement de consigne, la cache est simplement placée sous un autre trou, puis le test est réalisé comme précédemment. Le changement de consigne est fait la semaine suivant l'apprentissage initial. Le troisième jour, le test de rétention est réalisé comme précédemment. Cette fois-ci le test de rétention s'intéresse au temps passé dans le sextant contenant actuellement la cible (S2) ainsi que le S1 (Figure 19). Ceci permet d'une part de contrôler la bonne acquisition du S2, mais aussi, d'autre part, l'extinction du comportement d'approche de S1, à savoir que le S1 ne devrait pas être visité plus de 1/6^{ième} du temps.

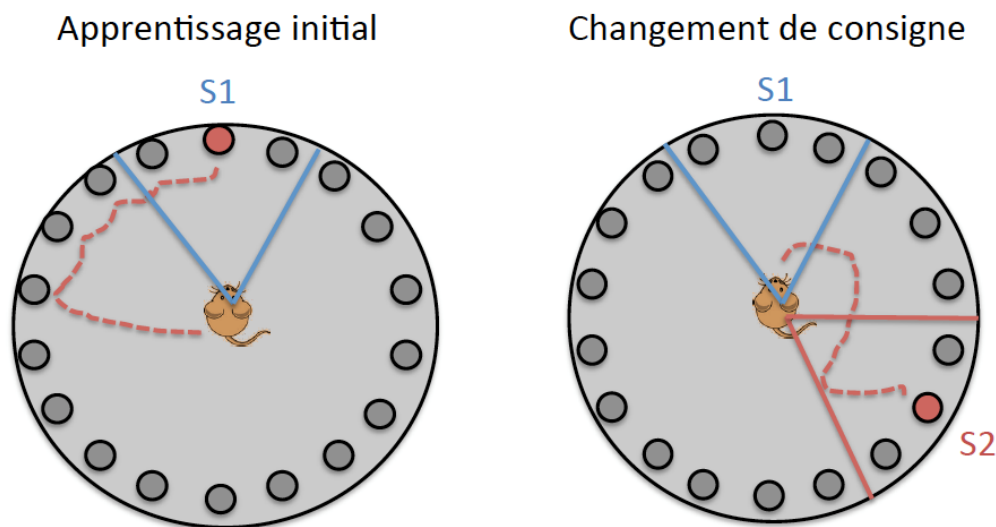


Figure 19. Schématisation du test de Barnes. Lors de l'apprentissage initial, la souris est placée au centre du labyrinthe et doit atteindre la cache située sous le trou en rouge. Trois essais lui sont donnés par jour, pendant 4 jours. Lors du changement de consigne, la cache est retirée et placée sous un autre trou. Trois essais lui sont donnés pendant 3 jours. Après chacune de ces étapes, un test de rétention est réalisé : la souris est placée au centre de la plateforme et le temps et la distance qu'elle passe dans le sextant cible (S1 lors de l'apprentissage, S2 lors du changement de consigne) sont quantifiés.

5. Profil d'anxiété et comportements de risque

Le profil d'anxiété des animaux a été évalué par les tests de « l'open field » et du labyrinthe en croix surélevée (ou « plus-maze »), qui sont deux des tests les plus classiquement utilisés à cet effet. Ces dispositifs contiennent des parties plus ou moins anxiogènes, et permettent d'extrapoler le profil d'anxiété : le choix de la souris d'explorer les bras ouverts anxiogènes traduira une sensibilité moindre à la prise de risque, et celui de rester dans les bras fermés, plus rassurants, indiquera un état d'anxiété. Dans « l'open field », l'exploration du carré central donne des indications similaires en termes d'anxiété et de prise de risque.

Labyrinthe en croix surélevé : ce labyrinthe (Figure 20A) est constitué de 4 bras (37x6 cm) séparés par une plateforme centrale, à 50 cm de hauteur. Deux de ces bras sont ouverts sur le vide et l'éclairage de la pièce, ce qui les rend anxiogènes. Les deux autres sont protégés par des murs de 17cm de hauteur les rendant obscurs et plus rassurants. Le temps et la distance passés dans les bras ouverts ou fermés sont quantifiés, ainsi que le nombre d'entrées dans les bras ouverts. Les animaux ayant peu tendance à aller dans les bras ouverts, l'appareil considère une entrée dans un bras ouvert lorsque la moitié antérieure du corps de l'animal y est engagée. La durée du test est de 5 minutes.

Open field : l'open field est une boîte (50 x 50cm) fortement éclairée (400 lux) en plastique blanc, dont le centre (25 x 25 cm) est considéré comme étant anxiogène (Figure 20B). Celui-ci étant fortement éclairé et ne contenant pas de refuge, la souris a naturellement tendance à l'éviter. L'animal est initialement placé au centre de l'open field, et sur une période de 20 minutes, le temps passé au centre et la distance parcourue (l'ambulation) sont évalués.

Pour ces deux tests, les quantifications ont été réalisées automatiquement grâce au logiciel Viewpoint (Option Plus-maze et Open-Field, Lyon, France).

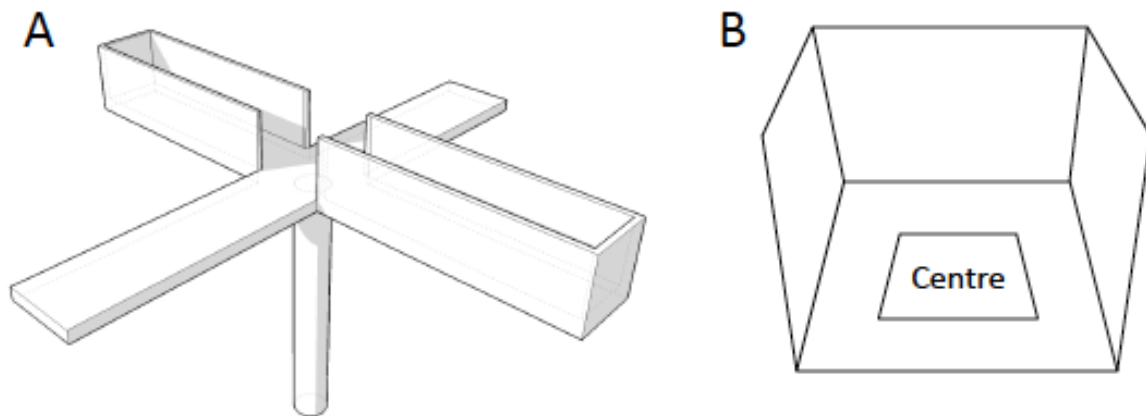


Figure 20. Représentation schématique des tests employés pour évaluer l'état d'anxiété des animaux. **A)** le labyrinthe en croix surélevée est constitué de 2 bras ouverts sur le vide qui sont anxiogènes pour l'animal, et 2 bras fermés considérés comme rassurants. Le temps et le nombre d'entrées dans les bras ouverts sont mesurés. **B)** L'open field est une cage cubique éclairée dont le centre est anxiogène pour la souris. Le temps et la distance qu'elle parcourt au centre sont évalués pour déterminer son profil.

6. Immunohistochimie et analyse d'image

Méthode

L'immunohistochimie a été réalisée sur des sections coronales de 50 μ M pour le marquage MBP, et de 35 μ M pour le marquage IGF2. Les sections ont été obtenues dans un cryostat (Jung CM3000, Leica) dont la température était aux alentours de -20°C pour les sections plus fines, et -15°C pour les sections plus épaisses. Après récupération sur des lames gélatinées, les sections ont été séchées entre 10 et 20 minutes à température ambiante puis stockées à -20°C jusqu'à l'immunohistochimie.

Nous avons procédé avec les immunohistochimies de la façon suivante : une étape de fixation des tissus pour maintenir leur morphologie, une étape de blocage consistant à saturer le tissu avec des protéines pour limiter la fixation non-spécifique des anticorps, une étape d'incubation avec l'anticorps primaire pour marquer la protéine d'intérêt, une étape d'incubation avec l'anticorps secondaire, lui même couplé à une molécule fluorescente, pour révéler et amplifier la présence de la protéine d'intérêt. Un marquage au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI), un intercalant de l'ADN fluorescent, a aussi été réalisé afin de visualiser les noyaux et couches cellulaires définissant les régions du cerveau. Les paramètres (agent de fixation, agent de blocage, temps, concentrations des réactifs) de ces différentes étapes ont été sélectionnés sur la base d'expérimentations pour obtenir des résultats optimaux.

Pour le marquage MBP, les lames ont été post-fixées dans le paraformaldehyde 4% pendant 5 minutes à température ambiante. Les lames ont ensuite été rincées dans un tampon de phosphate (« phosphate buffer solution » en anglais, PBS 0.1 M; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH = 7,4) trois fois pendant 10 minutes sous agitation, puis incubées dans une chambre humide pendant 2 heures à température ambiante dans un environ 1 ml de solution de blocage : 1% de « bovine serum albumin » et 0,25% de Triton X-100 (un détergent qui perméabilise les membranes et permet l'intégration des grosses protéines dans les tissus) préparé dans du PBS. L'excès de solution de blocage a été absorbé avec du papier, puis les lames ont immédiatement été incubées avec environ 400 µl de solution d'anticorps primaire dans une chambre humide pendant deux heures à température ambiante : 1/2000 d'anticorps anti-MBP issu du lapin (AB980, Millipore), 0,25% de BSA, et 0,25% de Triton X-100 dans du PBS. Les lames ont ensuite été rincées 3 x 10 minutes sous agitation dans du PBS avec 1% de Tween20 afin d'éliminer les anticorps non fixés. Finalement, 600 µl de solution d'anticorps secondaires ont été appliqués sur les lames dans une chambre humide pendant 2 heures à température ambiante : 1/1000 d'anticorps anti-lapin de chèvre (Alexa Fluor 680), 0,25% de BSA, et 0,25% de Triton X-100 dans du PBS. Les lames ont ensuite été rincées dans de l'eau distillée 3 x 10 minutes et séchées. Finalement, elles ont été scannées (longueur d'onde d'excitation 680 nm, longueur d'onde d'émission 694 nm) dans le système d'imagerie Odyssey (Li-cor).

Des coupes alternatives ont été utilisées pour marquer les noyaux afin de procéder aux études neuroanatomiques de volume et de densité cellulaire. Les lames fixées au PFA ont été incubées dans un mélange PBS-DAPI (0,001 mg/mL) pendant 2 minutes. Elles ont ensuite été rincées 3 x 2 minutes dans du PBS avant d'être montées dans une solution de Mowiol (Sigma Aldrich) dissout dans du tampon TRIS (0,13M, pH 8,5) et mélangé à du glycérol. Les lames ont finalement été photographiées avec un scanner Hamamatsu (NanoZoomerseries Ver.2.5) permettant une très bonne résolution des noyaux marqués avec le DAPI et donc un calcul précis des volumes et de la densité cellulaire.

Pour le marquage IGF2, la fixation a été faite dans un mélange équivolumique d'éthanol et d'acétone pendant 15 minutes à température ambiante. Le blocage a été réalisé pendant 1 heure et demie avec 5% de sérum de chèvre dans une solution de PBS contenant 0,25% de Triton X-100 . La solution d'anticorps primaire (400 µl) a été placée sur les lames dans une chambre humide toute la nuit à 4°C : 1/200 d'anticorps anti-IGF2

de lapin (ab63984, Abcam) et 0,25% de Triton X-100 dans du PBS. Puis une incubation est effectuée pendant 2h, à température ambiante, avec une solution d'anticorps secondaire : 1/1000 d'anticorps anti-lapin de chèvre, 1% de sérum de chèvre, et 0,25% de Triton X-100 dans du PBS. Finalement, les mêmes lames ont été incubées dans une solution de DAPI pendant 2 minutes puis rincées et montées dans du Mowiol. Les photos ont été prises avec un microscope à fluorescence (Zeiss) avec l'objectif 40x.

Analyse des données

La densité du marquage (MBP ou IGF2) a été évaluée grâce au logiciel ImageJ (NIH, États-Unis), sur la base de régions d'intérêt définies par un observateur formé à la neuroanatomie. La densité du marquage était évaluée pour chaque section contenant la région d'intérêt, puis la moyenne était calculée afin d'obtenir une valeur finale pour l'animal.

Les volumes des régions ont été calculés en multipliant l'aire des régions d'intérêt par l'épaisseur de la coupe, puis en additionnant le résultat obtenu pour les différentes coupes. Les régions étaient précisément définies grâce au marquage DAPI (Figure 21A) et par comparaison avec un atlas du cerveau de souris. Pour calculer la densité cellulaire, la région d'intérêt était définie par la même méthode, puis une macro créée pour ImageJ a été générée. Brièvement, la macro permettait de convertir le marquage des noyaux en nuances de gris (Figure 21B). Comme le marquage gris n'était pas homogène et que sa clarté augmentait en s'éloignant du centre du noyau, un seuil a été défini pour convertir les nuances de gris en noir (Figure 21C). Ceci permettait de convertir les noyaux en un objet noir bien défini (Figure 21D). Les cellules trop proches étaient ensuite séparées les unes des autres en utilisant la commande « watershed » d'ImageJ (Figure 21E) puis le comptage automatique des cellules était ensuite réalisé avec la commande « analyse particules » d'ImageJ.

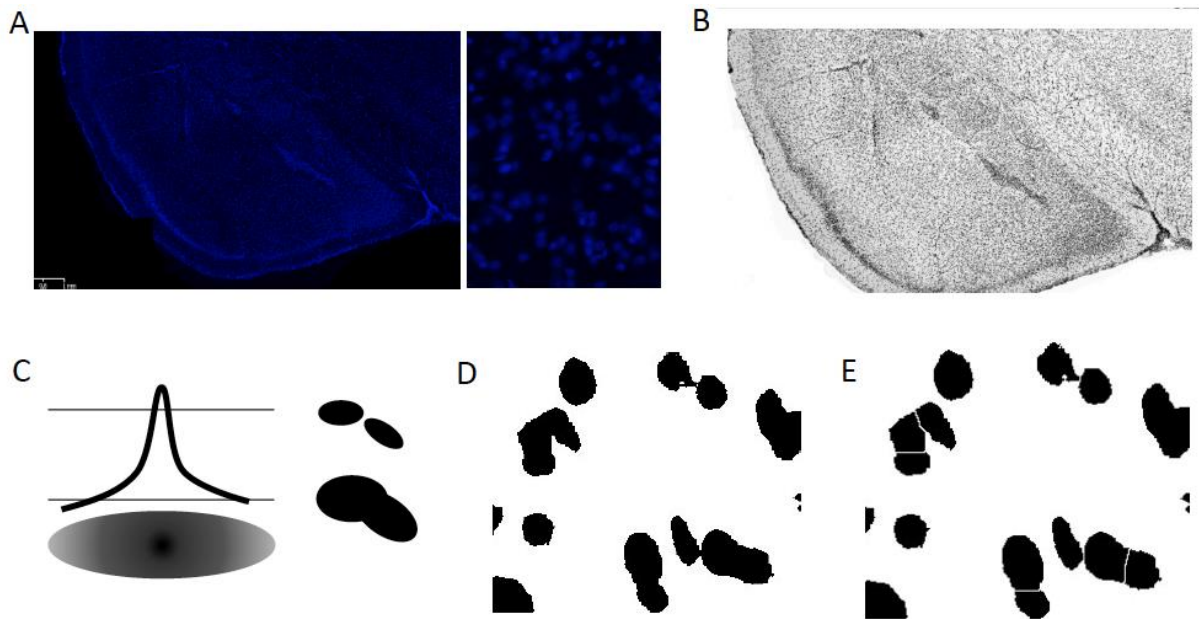


Figure 21. Étapes suivies sur ImageJ pour quantifier le nombre de cellules dans différentes régions d'intérêt. **A)** Image initiale en coloration DAPI à faible et haute résolution. **B)** Image après conversion en nuances de gris. **C)** Le marquage est moins fort au fur et à mesure que l'on s'éloigne du centre du noyau. Ainsi, un seuil élevé réduira la taille des noyaux, les séparant, mais supprimant les moins opaques, et un seuil faible conduira à la superposition des noyaux proches. **D)** Image obtenue après définition du seuil à partir duquel une nuance de gris est convertie en noir. **E)** Résultat de la commande « watershed » permettant de séparer les noyaux.

Concernant les fibres positives pour IGF2, dont la présence était inattendue initialement, nous avons dû convertir un résultat plutôt qualitatif, puisque la réorganisation d'IGF2 donnait un marquage impossible à mesurer avec ImageJ directement *via* la densité du marquage. Pour une section donnée, les fibres n'étaient pas toujours présentes. Grâce à cette variation et le résultat d'au moins 5 sections par animal, couvrant le même volume d'épithélium du ventricule latéral, nous avons pu établir un pourcentage de sections présentant des fibres IGF2. La moyenne de ce pourcentage était ensuite effectuée pour chaque groupe.

7. Analyses de la transcription et de la méthylation de l'ADN

Extraction des ARN

L'extraction des ARN a été faite selon la méthode du Trizol-chloroforme. Un volume de TriReagent (500 μ L/10mg de tissus ; Fischer, France) a été ajouté aux tissus pour lyser et homogénéiser ses divers constituants. Les tissus ont ensuite été broyés à

l'aide d'un piston en plastique (Deutscher, France) adapté au tube, dont l'action mécanique est induite par un broyeur électrique (Deutscher, France). Après 5 minutes d'incubation, du chloroforme a été ajouté (100µL/10mg de tissus) et le mélange vigoureusement mélangé, agité, puis laissé reposer 10 minutes. Les constituants de la cellule restent dans le TriReagent alors que les acides nucléiques migrent dans le chloroforme. L'échantillon a ensuite été centrifugé à 12 000g pendant 15 minutes puis le surnageant récupéré dans un autre tube. De l'isopropanol y a été ajouté pour faire précipiter les ARN (250µL/10mg de tissus). Après 10 minutes de précipitation, l'échantillon a été centrifugé 8 minutes à 12 000g, le surnageant éliminé, et le culot rincé deux fois à l'éthanol 75% puis solubilisé dans de l'eau libre de nucléases. Les échantillons ont ensuite été dosés avec un spectrophotomètre (Nanodrop One) afin d'évaluer leur propreté vis-à-vis des contaminants (réactifs utilisés pour l'extraction, protéines, ADN) et la concentration de l'ARN.

Conversion des ARN en ADN complémentaires par la « reverse transcriptase »

La transcription des ARNm en ADN complémentaires (ADNc ; utilisés par la suite pour la PCR) a été faite à l'aide du « High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit » (ThermoFisher, France) selon les instructions fournies par le fabricant. La réaction se fait à partir de 500 ng d'ARN extrait. Y ont été ajoutés des nucléotides triphosphates pour permettre la synthèse de l'ADNc, l'enzyme Multiscribe qui réalise la transcription inverse, et des amorces aléatoires permettant à l'enzyme de démarrer la transcription à partir des différents ARN contenus dans l'échantillon. L'enzyme a d'abord été activée par 10 minutes d'incubation à 25°C, puis la réaction de transcription s'est déroulée pendant deux heures à 37°C. Finalement, l'enzyme a été désactivée par une incubation à 85°C de 5 minutes. L'échantillon résultant est prêt à l'emploi pour la PCR.

PCR quantitative

Le réactif employé pour la procédure de PCR est le SYBR Fast ABI Prism (Clinisciences, France). Ce réactif contient une ADN polymérase et des nucléotides pour amplifier l'ADN. Pour 5 µL d'ADNc, 10 µL de SYBR et 3,8 µL d'eau pure sont ajoutés. Finalement, 1,2 µL d'un mélange équimolaire d'amorces sens et anti-sens (5 µM pour les deux amorces) est ajouté au mélange pour un volume final de 20 µL. La réaction de PCR est initiée par 3 minutes d'incubation à 95°C pour dénaturer l'ADN et activer la

polymérase, puis 40 cycles selon les paramètres suivants : 15 secondes à 95°C (dénaturation), 30 secondes à 60°C (fixation des amorces à l'ADNc), 30 secondes à 72°C (élongation de l'ADN à partir des amorces).

Les amorces sens et anti-sens permettent l'amplification des deux brins d'ADN complémentaires par l'ADN polymérase pour une réaction en chaîne exponentielle d'un facteur 2. Ces amorces ont préalablement été sélectionnées pour une efficacité optimale et une spécificité de l'ARN d'intérêt. L'efficacité est déterminée en amplifiant différentes dilutions d'un échantillon d'ADNc. On vérifie ainsi que le nombre de cycles nécessaires pour amplifier une concentration donnée augmente de 1 pour chaque division de la concentration par deux indiquant que la PCR multiplie bien la quantité d'ADN par deux à chaque cycle. La spécificité est vérifiée en faisant migrer le produit de la PCR dans un gel d'agarose séparant les ADN en fonction de leur taille. Cela permet de vérifier que la taille du produit correspond bien à celle attendue, et qu'il n'existe pas d'autres produits de PCR. Les amorces que nous avons employées pour les différentes analyses de PCR ont été sélectionnées dans des bases de données lorsque c'était possible ou sinon conçues directement pour nos besoins, à l'aide du logiciel gratuit de design d'amorces du NCBI (NIH, États-Unis).

L'ensemble des qPCR a été fait avec le système 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Celui-ci évalue en continu la fluorescence émise par l'échantillon : la synthèse des doubles brins d'ADN par la polymérase permet l'incorporation du SYBR dans la double hélice d'ADN, rendant celle-ci fluorescente. Lorsque les niveaux de cette fluorescence dépassent un seuil prédéfini, le système retient le nombre de cycles nécessaires au dépassement du seuil (Ct). Les résultats obtenus pour le gène d'intérêt sont ensuite rapportés à ceux obtenus pour celui de la D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) qui a servi ici de gène de référence. Le gène de référence permet d'exprimer la quantité d'ADNc d'intérêt en fonction de celle d'un gène dont l'expression n'est pas affectée par le traitement étudié. Cette méthode, mise au point par Schmittingen et Livak (2008) permet d'avoir une référence interne à l'échantillon et donc des résultats plus précis. Le résultat final est calculé selon leur méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$: Le Ct du gène de référence est retranché à de celui du gène d'intérêt (ΔCt). La moyenne des ΔCt du groupe contrôle est calculée, puis retranchée au ΔCt de chaque échantillon ($\Delta\Delta Ct$). Ainsi, chaque échantillon est exprimé en fonction de la moyenne du groupe contrôle. Étant donné que chaque cycle de PCR multiplie par deux les quantités d'ADN, on calcule

le $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de chaque échantillon pour obtenir le niveau d'expression du gène d'intérêt dans un échantillon donné relativement au groupe contrôle. Ainsi, si le groupe traité dépasse le seuil en moyenne un cycle plus tôt que le groupe contrôle, la quantité d'ARNm cible qu'il exprime est deux fois plus élevée.

Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée avec le « Nucleospin Tissue Kit » (Macharey Nagel, France). Cette méthode est similaire à celle de l'extraction d'ARN dans son principe général, mais les réactifs précis employés ne sont pas communiqués par le fournisseur. Pour cette méthode, les tissus sont broyés dans un mélange contenant de la protéinase K. La pré-lyse des tissus est ensuite réalisée pendant 3 heures à 56°C, puis la lyse complète pendant 10 minutes à 70°C grâce à l'ajout d'un solvant. L'échantillon est ensuite précipité à l'éthanol absolu puis chargé sur une colonne d'extraction. La colonne contient une membrane en silice qui va retenir l'ADN pendant les deux phases de lavages, visant à éliminer les réactifs utilisés précédemment. Finalement, le tampon d'élution dans lequel l'ADN va se solubiliser est ajouté, et une centrifugation permet de récupérer un éluat contenant l'ADN génomique ultra pur. Ici encore, le Nanodrop One a été utilisé pour contrôler la pureté de l'ADN ainsi que sa concentration.

Immunoprécipitation de l'ADN méthylé

L'immunoprécipitation de l'ADN méthylé a été réalisée avec le « Methylated DNA Immunoprecipitation Kit » (Diagenode) en suivant les instructions fournies par le fournisseur (Figure 22). Du fait de la très grande taille des brins d'ADN, celui-ci doit être sectionné en plus petites portions pour que l'immunoprécipitation puisse se dérouler correctement. Nous avons utilisé le sonicateur Bioruptor Plus (Diagenode) afin de couper l'ADN en brins d'environ 400 paires de bases. Les paramètres utilisés pour atteindre ce résultat ont été obtenus à la suite de tests et étaient les suivants : 30 secondes de sonication à faible puissance toutes les 30 secondes pendant 10 cycles, pour un total de 10 minutes. Une fois l'ADN soniqué obtenu, 1 000 µg de celui-ci ont été mélangés dans des tampons fournis par le constructeur. Pour ce kit également, le détail des réactifs n'est pas fourni, mais il comporte des tampons dont la constitution a été choisie afin d'optimiser les conditions de fixation des anticorps à l'ADN méthylé. Ce mélange a d'abord été incubé à 95°C pendant 3 minutes, puis rapidement refroidi sur la glace afin

de dénaturer l'ADN et le rendre plus accessible aux anticorps. Ici le mélange était séparé en deux : 10% du volume étaient conservés à 4°C pour servir d'ADN total de référence, les 90% restant étant utilisés pour l'immunoprécipitation. Des anticorps dirigés contre l'ADN méthylé ont été ajoutés à ce mélange ainsi que des billes magnétiques. Ces billes magnétiques sont couplées à une protéine G leur permettant d'interagir avec l'anticorps. Le tout constitue un volume final de 100 µL qui a été incubé durant la nuit à 4°C sous agitation. Une fois l'incubation terminée, le complexe bille-anticorps-ADN méthylé a été précipité à l'aide d'un portoir magnétique et le surnageant éliminé. Un tampon de rinçage a alors été ajouté puis l'ensemble a été incubé 4 minutes sous agitation avant de précipiter à nouveau le complexe bille-anticorps-ADN méthylé. Cette étape de rinçage a été réalisée deux fois de plus avec le même tampon, puis une troisième fois avec un tampon différent. Le complexe a de nouveau été précipité afin d'éliminer le surnageant. À ce stade, l'échantillon de référence et l'échantillon immunoprécipité suivent à nouveau la même procédure. Ils ont été incubés en présence d'un tampon de digestion contenant de la protéinase K, le but étant de libérer l'ADN immunoprécipité des anticorps. L'incubation a été faite 15 minutes à 55°C, puis 15 minutes à 100°C afin d'inactiver la protéinase K. Finalement, les échantillons ont été centrifugés à 14 000g pendant 5 minutes à une température de 4°C, puis le surnageant a été récupéré dans un nouveau tube. L'échantillon résultant est prêt à être utilisé en qPCR.

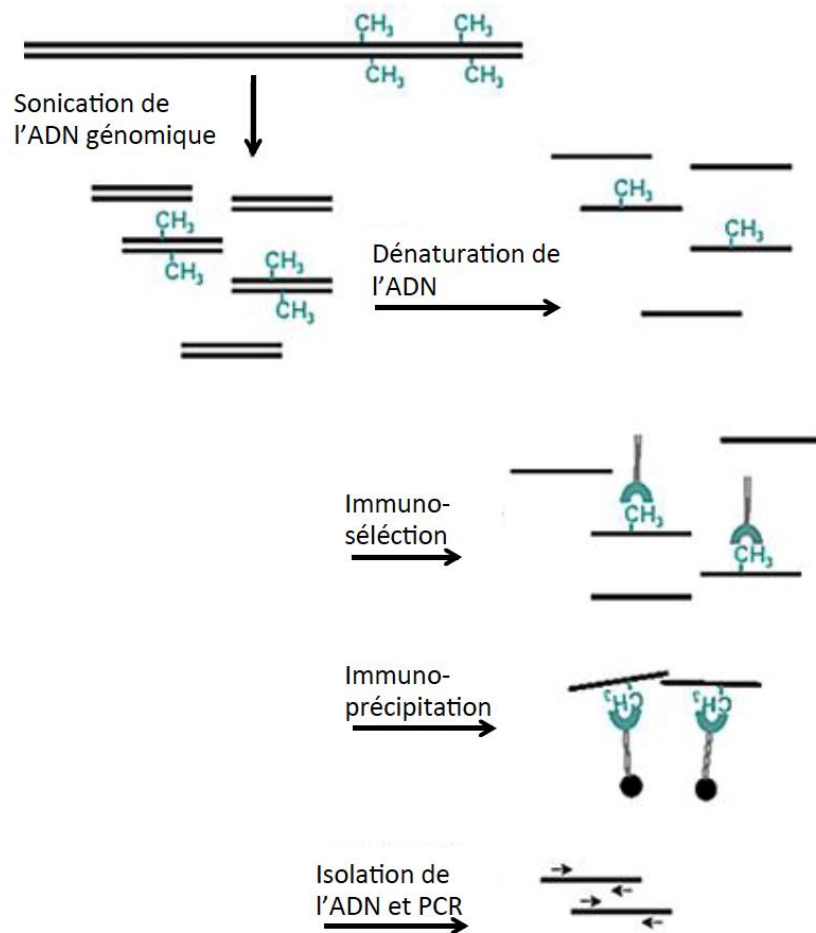


Figure 22. Schéma représentant les différentes étapes permettant d'obtenir l'ADN méthylé à partir de l'ADN génomique. L'ADN est d'abord soniqué pour le couper en fragments manipulables. Il est ensuite dénaturé par chauffage, puis incubé en présence d'anticorps spécifiques de l'ADN méthylé, ce qui permet de l'immunoprécipiter. Après isolation de l'ADN méthylé, celui-ci peut être quantifié par qPCR.

PCR quantitative

Les qPCR pour les échantillons immunoprécipités ont été réalisées de la même façon que pour ceux issus d'ARNm. Les amorces utilisées ont été sélectionnées pour recouvrir les régions promotrices d'intérêt. Dans le cas de l'Igf1, plusieurs amorces ont été utilisées afin de recouvrir différentes portions de la région promotrice puisque nous n'étions pas certains de la zone pouvant être différenciellement méthylée. Ces amorces recouvraient 3 loci plus ou moins en amont du site d'initiation de la transcription, trouvé grâce à la base de données Ensembl : locus 1 de -264 à +11, locus 2 de -442 à -343, et locus 3 de -363 à -127.

Pour obtenir le niveau de méthylation de l'échantillon, le calcul suivant était fourni par le constructeur du kit : % d'ADN méthylé = $2^{[(Ct(\text{échantillon de référence}) - 3.32) -$

Ct(échantillon immunoprécipité)]x 100%. Les statistiques ont été réalisées sur les résultats de ce calcul. Nous avons pu vérifier que ce calcul ne donne un niveau de méthylation que relatif, c'est pourquoi les résultats finaux ont été exprimés en fonction du groupe contrôle.

8. Expression des résultats et analyses statistiques

Les graphiques et analyses statistiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, Etats-Unis). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard à la moyenne et les statistiques réalisées sont décrites dans la légende de chaque figure.

Les résultats comportementaux (conditionnement de la peur, test de Barnes) ont été analysés par une Anova à un facteur pour mesures répétées suivie du test de Bonferroni, à l'exception des index d'extinction, de l'ambulation au centre de l' « open field », et des entrées dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé qui ont été analysés par une Anova à deux facteurs suivie du test de Newman-Keuls.

Les résultats concernant la MBP, le BDNF, et l'IGF (expression de gènes, protéines, méthylation des promoteurs) ont été analysés par une Anova à un facteur suivie du test de Newman-Keuls, à l'exception de ceux concernant la méthylation d'Igf1 qui évaluaient plusieurs loci et ont donc été analysés par une Anova à deux facteurs suivie du test de Bonferroni.

Les données non-paramétriques, c'est à dire les scores neurologiques et le pourcentage de fibres IGF2-positives, ont été analysées par un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Mann-Witney ou suivi d'un test de comparaison multiples de Dunn's, respectivement.

Résultats expérimentaux

Article 1

Spontaneous resurgence of conditioned fear weeks after successful extinction in brain injured mice

Rémi Corne, Claire Leconte, Mélusine Ouradou, Valeria Fassina, Yang Zhu, Edwige Déou,
Valérie Besson, Michel Plotkine, Catherine Marchand-Leroux et Raymond Mongeau

Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry, 2018, Aug 23, doi:
10.1016/j.pnpbp.2018.07.023

Effet du traumatisme crânien sur les comportements, la neuroanatomie des circuits de la peur et l'expression du Bdnf

Le TC, même léger, est un facteur de risque pour les troubles psychiatriques, en particulier l'ESPT. Il engendre des altérations de la substance blanche et du BDNF, qui sont impliquées dans les comportements de peur et pourraient marquer la vulnérabilité psychiatrique post-TC. Ainsi, nous avons étudié les altérations comportementales, neuroanatomiques, et de BDNF survenant après un TCL par impact cortical contrôlé.

À 3 semaines post-TC, les souris acquéraient le conditionnement de la peur indicé de façon similaire aux animaux naïfs ou sham, avec une consolidation moindre puisqu'elles exprimaient légèrement moins de freezing en réponse au CS 24 h plus tard. L'acquisition de l'extinction de la peur était similaire dans tous les groupes. En revanche, la mémoire d'extinction, testée 6 semaines plus tard, était diminuée chez les souris TC qui avaient une résurgence de la peur conditionnée, avec un déficit intermédiaire pour les animaux sham. Les souris TC avaient des comportements à risque dans le labyrinthe en croix surélevé et « l'open field » et un déficit d'apprentissage et de flexibilité cognitive dans le test de Barnes.

Au niveau neuroanatomique, le volume du CC et d'une portion dorsale du cortex ipsilatéral étaient diminués chez les animaux TC, ainsi que l'asymétrie de l'amygdale normalement observée chez la souris (l'amygdale gauche étant plus grosse que la droite). Des diminutions de substance blanche, évaluées par immunohistochimie de la MBP, ont été retrouvées chez les souris TC dans le corps calleux et le cortex retrosplénial à proximité de l'impact, et plus loin dans l'hippocampe, le thalamus et l'amygdale.

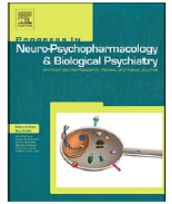
L'expression du Bdnf à 3 semaines après le TC, et après le conditionnement et l'extinction de la peur, était diminuée dans le cortex pariétal ipsilatéral (exons I, IV et IX). Plus intéressant encore, ces exons étaient diminués dans le cortex préfrontal.

Le déficit à long terme de la mémoire d'extinction après un TCL est rapporté ici pour la première fois avec des altérations comportementales et neuroanatomiques similaires à celles retrouvées chez les patients TC et ESPT. Les diminutions de l'expression du Bdnf pourraient être impliquées dans la survenue du déficit à long terme de la mémoire d'extinction.



Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pnp

Spontaneous resurgence of conditioned fear weeks after successful extinction in brain injured mice

R. Corne, C. Leconte, M. Ouradou, V. Fassina, Y. Zhu, E. Déou, V. Besson, M. Plotkine, C. Marchand-Leroux, R. Mongeau*

EA4475 – Pharmacologie de la Circulation Cérébrale, Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Paris, France



ARTICLE INFO

Keywords:

Brain derived neurotrophic factor
Fear conditioning
Myelin basic protein
Post-traumatic stress disorder
Risk-taking behaviors
Barnes maze

ABSTRACT

Mild traumatic brain injury (TBI) is a major risk factor for post-traumatic stress disorder (PTSD), and both disorders share common symptoms and neurobiological defects. Relapse after successful treatment, known as long-term fear resurgence, is common in PTSD patients and a major therapeutic hurdle. We induced a mild focal TBI by controlled cortical impact (CCI) in male C57BL/6 J mice and used fear conditioning to assess PTSD-like behaviors and concomitant alterations in the fear circuitry. We found for the first time that mild TBI, and to a lesser extent sham (craniotomy), mice displayed a spontaneous resurgence of conditioned fear when tested for fear extinction memory recall, despite having effectively acquired and extinguished conditioned fear 6 weeks earlier in the same context. Other characteristic symptoms of PTSD are risk-taking behaviors and cognitive deficits. CCI mice displayed risk-taking behaviors, behavioral inflexibility and reductions in processing speed compared to naïve mice. In conjunction with these changes there were alterations in amygdala morphology 3 months post-trauma, and decreased myelin basic protein density at the primary lesion site and in distant secondary sites such as the hippocampus, thalamus, and amygdala, compared to sham mice. Furthermore, activity-dependent brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts were decreased in the prefrontal cortex, a key region for fear extinction consolidation, following fear extinction training in both TBI and, to a lesser extent, sham mice. This study shows for the first time that a mild brain injury can generate a spontaneous resurgence of conditioned fear associated with defective BDNF signalling in the prefrontal cortex, PTSD-like behaviors, and have enduring effects on the brain.

1. Introduction

Traumatic brain injury (TBI)-induced predisposition to psychiatric disorders has come into the spotlight in recent years. TBI affects around 2.5 million people yearly in Europe (<https://www.center-tbi.eu/>, 2018) and is a vulnerability factor for a host of psychiatric disorders, post-traumatic stress disorder (PTSD) being one of the most prevalent (Bryant, 2011). Indeed, US veterans with TBI are 3 times more likely to develop PTSD (Bryant, 2011). As some drugs used to treat one condition may worsen the other (Howlett and Stein, 2016), translational preclinical models of TBI/PTSD comorbidity are necessary to find common treatments that may help both disorders.

Among the core symptoms of PTSD are traumatic flashbacks and reduced ability to extinguish fear memories (Blechert et al., 2007;

Milad et al., 2009). This is reflected in a subset of patients that display a relapse of traumatic memories, despite successful treatment with behavioral therapies such as the exposure therapy (Wurtz et al., 2016). Finally, although PTSD patients are anxious, they display life endangering risk-taking behaviors (James et al., 2014).

Similar mechanisms may underlie PTSD fear symptom relapse and TBI-induced vulnerability. Return of fear may be explained by enduring alterations in the neural circuitry of fear, perhaps as a consequence of chronic low-grade inflammation in areas such as the hippocampus, amygdala, medial prefrontal cortex (mPFC), thalamus and connecting white matter (WM) like the corpus callosum (CC) (Gong et al., 2014; Liberzon and Sripada, 2008). Recently, a hippocampal to prefrontal cortex inhibitory circuit was shown to be involved in relapse of extinguished fear (Marek et al., 2018). In focal TBI, primary lesions may

Abbreviations: PTSD, Post-traumatic stress disorder; BDNF, Brain derived neurotrophic factor; TBI, Traumatic brain injury; CCI, Controlled cortical impact; WM, White matter; MBP, Myelin basic protein; PCR, Polymerase chain reaction; CC, Corpus callosum; mPFC, Medial prefrontal cortex; CS, Conditioned stimulus

* Corresponding author at: EA4475 – Pharmacologie de la circulation cérébrale, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 4, avenue de l'Observatoire, 75 006 Paris, France.

E-mail address: raymond.mongeau@parisdescartes.fr (R. Mongeau).

<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.07.023>

Received 23 April 2018; Received in revised form 28 June 2018; Accepted 29 July 2018

Available online 07 August 2018

0278-5846/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

not directly alter these structures, but injuries initiate deleterious cascades of biochemical events that, in days and months, conduce to inflammation and axonal degeneration at distant secondary sites (Hayes et al., 2016; Prasad and Bondy, 2015). These may underlie TBI-induced PTSD vulnerability, as reduced WM integrity and atrophies in limbic areas have been observed in both PTSD and TBI (Depue et al., 2014; Fani et al., 2012; Kaplan et al., 2010). To mitigate damage and promote repair following TBI, neurotrophic factors, in particular the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), increase to promote myelination (Xiao et al., 2010) and brain limbic structures maintenance and plasticity (Cowansage et al., 2010). Defective BDNF signalling may therefore determine long-term outcomes following TBI (Prasad and Bondy, 2015) and is associated with poor behavioral performances in animals (Heldt et al., 2007). A chronic decrease of plasma BDNF has been observed in PTSD patients (Kaplan et al., 2010) and animal studies suggest restoration of BDNF signalling as a potential therapeutic approach (Prasad and Bondy, 2015). Therefore, preclinical models encompassing such aspects in conjunction with translational behaviors are necessary to discover treatments for the TBI/PTSD comorbidity.

Our primary goal was to study behavioral deficits in mice, occurring late after a mild focal injury, since TBI-induced psychiatric symptoms appear with disease chronicity. We assessed changes in behaviors such as anxiety and conditioned fear, since fear extinction deficit is a key symptom of PTSD (Bleichert et al., 2007). In this model, we explored alterations that may reflect defective brain reorganization of the fear circuitry.

Individuals experiencing a psychological trauma can form an association between the traumatic event and concurrent neutral stimuli (visual or auditory cues), analogous to an aversive Pavlovian conditioning in which a cue becomes a conditioned stimulus (CS). Re-exposure to the CS alone, without further harmful events, elicits a strong fear response. Repeated CS exposure causes a progressive reduction in the response, termed fear extinction, the ultimate goal of the exposure therapy. It has long been known that extinction does not erase fear memories, but generates new fear extinction memories. The latter are labile compared to the strong CS-US association and spontaneous re-emergence of fear has been reported following successful extinction learning in PTSD patients (Milad et al., 2009).

It is hypothesized that changes in myelin and trophic factors undermine the retention of this labile extinction memory and explain the late occurrence of PTSD-like behaviors after a mild focal TBI.

2. Materials & methods

2.1. Animals

The animals were cared for and the experiments conducted in accordance with the ARRIVE guidelines, with protocols validated by the Animal Ethics Committee of Paris Descartes University, the French regulations and the European Union Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EEC) on the protection of animals for experimental use (APAFiS#9554) and in conformity with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S National Institutes of Health (publication 85-23, revised 1996). Male C57BL/6J mice were supplied by Janvier Labs (Le Genet St Isle, France) and housed under temperature and light controlled conditions with ad libitum access to food and water for one week before being randomly assigned to the following groups: naïve, sham craniotomy, TBI.

2.2. Controlled cortical impact

Mice weighing 28–30 g anesthetized with isoflurane (induction 3%, maintenance 1.5%) were placed in a stereotaxic frame. A homeothermic blanket maintained their body temperature. A 4 mm craniotomy was performed at the level of the left parietal lobe slightly rostral to lambda taking great care not damaging the dura mater.

Impact was delivered by a 3 mm diameter impactor using a pneumatically controlled device (TBI 0310 Impactor, Precision System Instruments) with the following parameters: 3.5 m/s velocity, 1.0 mm depth and 50 ms dwell time. These CCI parameters are mild by literature standards (Washington et al., 2012) and do not produce major neurological deficits days or months after CCI (Taib et al., 2017). The skull cap was replaced with bone wax and the skin sutured. The sham (craniotomy) mice underwent the same surgery with the exception of the impact. Animals recovered from anaesthesia in an incubator at 28 °C to prevent post-surgery hypothermia, and subsequently returned to their previous housing conditions.

2.3. Fear conditioning and fear extinction

Fear conditioning was done 3 weeks after surgery. On day-0, each mouse was put in a lit cage (19 × 22 cm, height 13 cm, 50 lx) with a grid floor connected to an electric foot-shocks generator and a loud-speaker producing a tone (2.5 kHz, 85 dB) in a sound-attenuating cubicle. Stimuli were controlled from a computer system (MedAssociate, St-Albans, VT, USA). Cages were previously cleaned with a scented solution (vanilla 1% in alcohol 75%) to define the conditioning context. During the conditioning phase, animals were exposed 6 times to the sound (30 s) followed by a mild footshock (2 s; 0.5 mA; 2 min inter-trials intervals; ITI). Fear response, behaviorally expressed as “freezing”, was sampled every two seconds by an observer blind to treatment.

On day-1 and day-2, mice were repeatedly exposed to the CS alone in a novel context (Plexiglas cage; 15 × 21 cm, height 13 cm), in the dark. Both sessions consisted of 40 CS exposures (30 s, 5 s ITI) to generate conditioned fear extinction. On day-45, mice were tested with 4 CS to evaluate long-term extinction memory retention. Freezing was recorded by an infrared platform and a video tracking software (Viewpoint, Lyon, France). To calculate the fear extinction index, freezing during the first 4 CSs (i.e. the first two minutes) of the extinction sessions was used as it reflects the retention of the learned fear behavior up to that point: on day-1, the first 2 min reflect day-0 fear conditioning retention; on day-2 they reflect day-1 fear extinction retention; on day-45 they reflect the fear extinction acquired on both extinction sessions, and the long term consolidation of this memory. Therefore, to constitute a fear extinction index the freezing in the beginning of a given session was subtracted to that of the previous session (e.g., retention of D1 extinction training = %freezing D1 – %freezing D2).

2.4. Neurological scores

Sensory-motor skills were assessed 9 weeks post-surgery to determine whether neurobehavioral deficits could explain eventual changes in other behavioral tests. The behavioral score (on 20 points) evaluates: postural asymmetry, resistance to a lateral push, circling behavior, ear skin sensibility, as already described (Taib et al., 2017). The lower the score, the greater the neurological deficit.

2.5. Risk-taking behaviors

The anxiety profile was assessed using the open-field (OF) and elevated plus-maze (EPM) tests. The lit OF (50 × 50 cm) consists of a white plastic box where the center is known to be anxiogenic. Ambulation and time spent in the center (25 × 25 cm) reflects risk-taking behavior (duration = 20 min). The EPM consists of 4 arms (37 × 6 cm) elevated 50 cm above the floor with 2 opposite arms shielded by 14 cm walls. Behavioral deficits in the EPM and the OF, classically used to assess anxiety, can be interpreted as alterations in neural defense systems, either making the animal more avoidant, or more prone to risk-taking. Increased entries and time spent in open arms indicate a risk taking behavioral profile (duration = 5 min).

Behavioral analyzes were performed automatically (Viewpoint, Lyon, France).

2.6. Spatial memory and cognitive flexibility

The Barnes maze test was performed as previously described (Taib et al., 2017) to assess general cognitive impairments and kinetics of spatial learning. Mice were placed in the center of a circular platform in a lit room (80 cm diameter, height 50 cm, 480 lx), with 18 holes around the periphery. Underneath one hole, a hiding box was inserted and its location changed for reversal learning. Learning and reversal learning were each performed during 4 and 3 days, respectively, with 3 sessions per day. Number of errors, distances and latencies before finding the escape box were measured with a videotracking software (Viewpoint, Lyon, France). A retention test performed without the escape box, was done immediately after the last learning session to assess time spent in the 1/6th portion of the maze (a sextant) where target was located.

2.7. Immunohistochemistry and image analysis

Three months post-surgery, anesthetized mice (pentobarbital 110 mg/kg; 10 ml/kg, i.p.), were perfused through the left ventricle (0.9% NaCl for 5 min at 100 mmHg), and brains were frozen in -35°C isopentane and stored at -80°C . Brains were then cut in 50 μm coronal slices at -15°C in a cryostat. MBP, a majority protein in myelin, was used as a marker to assess WM and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) fluorescent staining to measure cell density and brain areas volumes. MBP immunohistochemistry was done with an infrared conjugated secondary antibody, as previously described (Ajao et al., 2012), as this technique provides an excellent signal-to-noise ratio.

After letting the slides dry for 1 h, they were post-fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 5 min, rinsed with a phosphate buffer (PBS 0.1 M; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH = 7.4), incubated 90 min at room temperature in PBS with 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.25% Triton, and then incubated 2 h at room temperature in primary antibody solution. The primary antibody (rabbit anti-MBP; reference AB980, Millipore) was diluted 1/2000 in a PBS solution with 0.25% BSA and 0.25% Triton. The slides were then rinsed with a PBS-Tween 0.1% solution before being incubated for 2 h at room temperature in the secondary antibody solution. The secondary antibody (goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 680) was diluted 1/1000 in PBS with 0.25% BSA and 0.25% Triton. The slides were washed, rinsed in distilled water, dried and then scanned with a Licor Odyssey imaging system, to obtain images of MBP staining (excitation 680 nm; emission 694 nm). MBP optical density (OD) was assessed with Image J after selection of the region of interest. Weighted arithmetic means of ODs were estimated according to the area of individual brain structures on each section. Alternate slides were fixed, washed with PBS, incubated in PBS with DAPI (0.001 mg/ml) for 2 min, and rinsed in PBS before being mounted in a Mowiol medium (Sigma Aldrich in a Tris solution, 0.13 M, pH = 8.5).

Coronal sections spanning the various areas of interest were photographed with a Hamamatsu scanner (NanoZoomerseries Ver.2.5) to assess volume and cell density with the Image J software. Cell density in the various amygdala nuclei, the mPFC or CA4/hilus of the dentate gyrus region was quantified using 5 sections at regular intervals so as to span the totality of the region. The cell density was calculated for each section and then averaged to obtain the mean cell density per animal. Sections were exported in 8-bit grey scale Tiff images. The watershed command was used to separate partly overlapping cells, and the cells were then quantified using the “analyze particles” command.

2.8. Quantitative RT-PCR

BDNF mRNA was quantified after a two-day fear conditioning/extinction protocol, 3 weeks post-surgery, using real time quantitative

PCR. Immediately after the end of the fear extinction session, mice were sacrificed by elongation and their brains frozen in isopentane and stored at -80°C until punch dissection.

Punches of discrete regions were selected from coronal brain sections (250 μm) using a stainless-steel tube fashioned for this use (length 2.5 mm, width 2 mm). The ipsi- and contra-lateral parietal cortices were sampled directly beneath the lesion area (Bregma -0.5 to -3.5 mm), while the other regions were punched as illustrated in Fig. 5A. Total RNA was extracted using the Trizol Reagent (Fisher, France) following the manufacturer's instructions, diluted in nuclease free water, and quantified with a Nanodrop One spectrophotometer for RNA concentration and purity control. Retrotranscription into cDNA was performed with 500ng of RNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher, France) according to the manufacturer's instructions. Quantitative real-time PCR was performed with KAPA SYBR Fast ABI Prism (Clinisciences, France) and run in a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) with the following cycling protocol: 95°C – 3 min (1 cycle); 95°C – 15 s, 60°C – 30s, 72°C – 30s (40 cycles). The primer sequences are detailed in Supplemental Table 1. The fold changes in mRNA levels were calculated for each exon after normalization to GAPDH using the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method (Schmittgen and Livak, 2008) and then used for statistical analysis. Results are expressed in percentage of the naïve control group.

2.9. Statistics

Statistical analyzes and graphs were done with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Fear learning and Barnes test kinetics were analyzed by two-way ANOVA for repeated measurements followed by Bonferroni test, neurological scores by a Kruskal-Wallis followed by the Mann-Whitney test, and other behavioral studies, including fear extinction indexes, were analyzed by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test. Histological and transcriptional results were analyzed with a one-way ANOVA followed by Newman-Keuls Test.

3. Results

3.1. Behavioral studies

3.1.1. Effect of traumatic brain injury in the fear-conditioning paradigm

Three weeks-post surgery, all mice had equally acquired conditioned freezing at the end of the sixth CS-US association (Fig. 1A). The next day, at the seventh CS (i.e. first 30s stimulus of extinction period, before any extinction learning took place), delivered in a new context, TBI mice expressed significantly less freezing than either naïve or sham mice (Fig. 1B). The amount of freezing expressed by naïve mice during the first 14 min of extinction, on day-1 and day-2, is illustrated in Fig. 1C. There was a significant effect of Time [$F(6, 108) = 22.0$, $P < 0.0001$], Day [$F(1, 18) = 3.3$, $P < 0.001$] and a significant interaction [$F(6, 108) = 6.3$, $P < 0.0001$]. All mice displayed near complete fear extinction by the 10-min mark, and there was a significant reduction of freezing between day-1 and day-2 at 2, 4 and 6 min. Sham and TBI mice also displayed significant fear extinction (supp. Fig. 1). An extinction index was calculated to evaluate extinction memory at day-2 vs. day-1 during the first 2 min of tone presentation. At day-2 extinction was the same between all groups (Fig. 1D). However, after 6 weeks without any manipulation the fear extinction recall was markedly decreased in TBI mice compared to either naïve or sham mice, with sham (craniotomy) also displaying a reduction in extinction retention compared to naïve mice (Fig. 1E). The conditioned fear response during the first 2 min of day-2 compared to that of day-45 indicated, as expected, a reduction of freezing in the naïve group, but no change in the sham group, and an increase in freezing in TBI mice (Supp. Fig. 2). Therefore, long after extinction, a spontaneous resurgence of conditioned fear occurred in brain-injured mice.

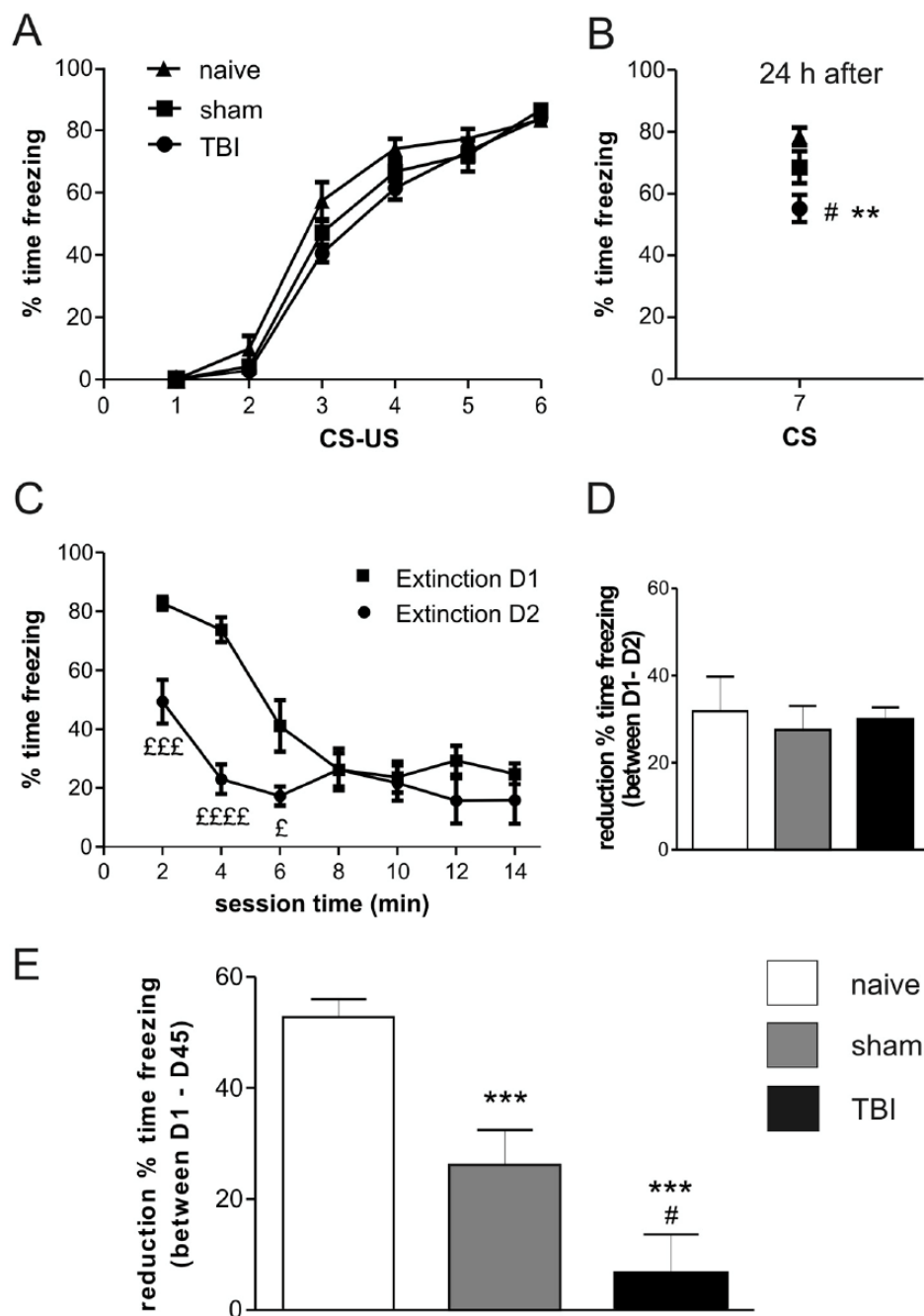


Fig. 1. Fear conditioning, fear extinction acquisition and long term fear extinction memory recall after brain injury. (A) Acquisition of conditioned fear 3 weeks post-surgery. (B) Decrement in the expression of conditioned fear in brain-injured mice in response to a single auditory cue in a novel context. (C) Acquisition of fear extinction in naïve mice. Comparison of the fear extinction index (freezing at day-1 minus day-2 during the first 2 min), on the short-term (D), and on the long-term (E), extinction index = freezing at day-1 minus day-45 during the first 2 min). Data are mean ± SEM, n = 10–15. In (B) and (E), data were analyzed with a One-way ANOVA, followed by a Newman-Keuls test (**, ***P < 0.01, P < 0.001 compared to naïve mice, # P < 0.05 compared to sham mice). In (C), data were analyzed with a Two-way ANOVA for repeated measurements, followed by a Bonferroni's pair-wise comparison £, ££, £££, P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001.

3.1.2. Effects of long-term traumatic brain injury on sensory-motor capacities, exploratory behaviors and spatial memory

It was important to investigate whether the fear extinction deficit occurred in a context of neurobehavioral deficits and/or changes in anxiety levels, 9 weeks post-surgery.

Sensory and motor reactivity was assessed, but there was no significant change in the neurological scores (Fig. 2A). However, TBI mice placed in an open field displayed greater ambulation in the central square (Fig. 2B) and spent more time in the central square compared to naïve mice (Supp. Fig. 3A). Furthermore, number of entries into the open arm was greater for TBI mice compared to naïve mice (Fig. 2C). Sham (craniotomy) mice tended to show an intermediary exploration profile in both OF and EPM. Time spent in the open arms was significantly increased for both sham and TBI mice compared to naïve mice (Supp. Fig. 3B).

Spatial memory and behavioral flexibility were assessed in the Barnes test from the 10th week after surgery. On day-1, mice were

habituated to the escape box. In line with their greater tendency to explore a novel environment, sham and TBI mice reached target before naïve mice on the first learning trial (Supp. Fig. 3C). All animals optimally learned the location of the escape box (day-5, Fig. 3A). Speed during ambulation on the platform was similar (naïve = 15.0 ± 0.7; sham = 14.8 ± 0.9; TBI = 13.9 ± 0.6 cm/s) and they all spent > 60% of time in the target sextant at the end of training (data not shown). However, there were significant effects of Surgery [F(2, 29) = 6.0, P < 0.01], of Time [F(3, 87) = 28.5, P < 0.0001] and a significant interaction between factors F(2, 87) = 6.0, P < 0.01. On the third training day, the number of errors made was greater for TBI mice indicating a slower learning rate compared to naïve mice (Fig. 3A). Naïve mice preferred a spatial strategy to reach target compared to TBI mice that rather used a serial strategy, while sham mice used a mix of both strategies (Supp. Fig. 4B).

Analysis of reversal learning indicated significant effects of Surgery [F(2, 29) = 5.7, P < 0.05], of Time [F(2, 58) = 67.6, P < 0.0001]

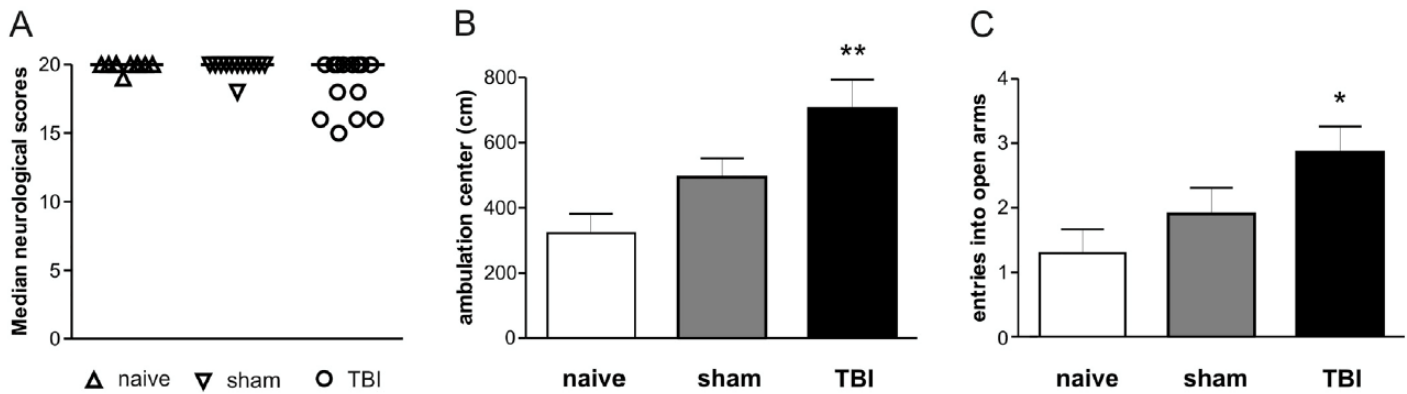


Fig. 2. Long-term alterations of sensory-motor and exploratory behaviors after brain injury. (A) Neurobehavioral scores were not different between groups, 10 weeks post-surgery. During the same period, there was an increase in risk taking behaviors in TBI compared to naïve mice, expressed as (B) an increase in distance travelled in the central square of an open field, and as (C) an increased number of entries into the open arms of the elevated plus maze. Neurobehavioral scores are medians compared using a Kruskal-Wallis followed by the Mann-Whitney test, n.s. ($n = 10-15$). Exploratory activity data are mean \pm SEM, analyzed with a One-way ANOVA, followed by the Newman-Keuls test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. White = naïve; grey = sham; black = TBI.

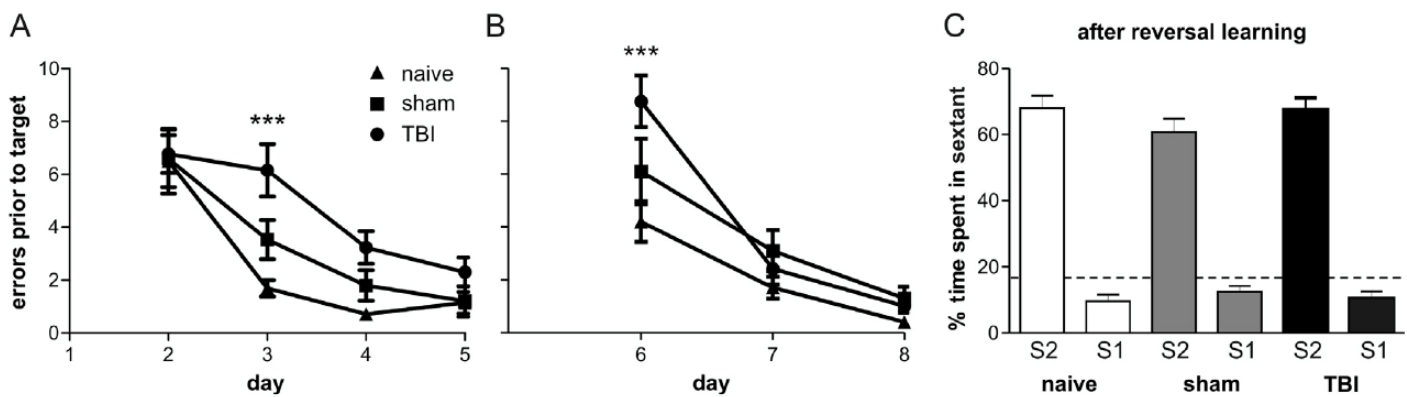


Fig. 3. Long-term spatial learning and cognitive flexibility after brain injury. (A) Learning in the Barnes test 11 weeks after surgery, and (B) reversal learning 1 week later. (C) Time spent in the target sextant (S1 was conditioned during the first target acquisition and S2 during the reversal learning). The number of errors before reaching the target are mean \pm SEM. Data were analyzed with a Two-way ANOVA for repeated measurements, followed by the Bonferroni test. *** $P < 0.001$. White = naïve; grey = sham; black = TBI.

and a significant interaction between factors [$F(4, 58) = 4.53$; $P < 0.01$]. TBI mice made more errors on the first day than naïve mice (Fig. 3B). However, after the third day all mice reached the target with few errors (Fig. 3B). During the retention test at the end of the reversal-learning period (Fig. 3C), all mice spent over 60% of the time in the target sextant (S2), while none spent $> 16.67\%$ (theoretical random time) in the previously conditioned sextant (S1).

3.2. Neurobiological studies

3.2.1. Effects of traumatic brain injury on brain morphology and myelin density

Cell density and volumes of various brain areas were measured, according to brain atlas (Paxinos and Franklin, 2001), in the penumbra of the primary lesion site and at more distant secondary sites, 3 months post-surgery.

As expected from the missing tissue below the craniotomy, the volume of the whole dorsal cortex (above the pyriform cortex) decreased in TBI mice, relative to sham and naïve mice (Fig. 4A). In contrast, there was only a thinning of the cortex below the craniotomy in sham mice (-26% of layers 1–4, naïve = 399 ± 16 , sham = $297 \pm 24 \mu\text{m}$, $n = 7$, $P < 0.01$, Student t -test, but not of layers 5–6, nor of contralateral layers 1–4; data not shown). In TBI mice there was a primary lesion on the left parietal lobe extending rostro-caudally from Bregma

-0.50 to -3.50 mm, from the midline to 3.0 mm laterally and ventrally down to 4.9 mm from the surface of the cortex. Brain areas most altered by the primary lesion were the somatosensory cortex, the agranular portion of the retrosplenial cortex, the visual cortex, the motor cortex and the association cortex. The ipsilateral hippocampus was not lesioned, but often deformed below the cortical lesion. Also, no alteration was found in frontal cortex volume (Supp. Table 2). CC volume was decreased (Fig. 4A), but contrary to a more severe model (Siopi et al., 2011), the volume of the ventricles below the primary lesion area was unaltered (Supp. Table 2).

MBP density was examined in the contralateral CC and the retrosplenial cortex, at the penumbra of the primary lesion not directly ruptured or deformed by the CCI. There was a significant decrease in the density of MBP in the CC of TBI relative to naïve mice, while there was a significant decrease in MBP density relative to sham mice in the retrosplenial cortex (Fig. 4B).

Volume and cell density in brain areas more distant from the primary lesion site were evaluated (Table 1, Fig. 4C). As previously reported in C57Bl/6J mice (Spring et al., 2010), some regions are more voluminous on the left side of the brain than on the right. Surprisingly, this asymmetry was not altered in the hippocampus but decreased in the amygdala of both TBI and sham operated mice (Fig. 4C) although no overall change was observed in the volumes of the dorsal hippocampus or the amygdala (Supp. Table 2). However, no change in cell

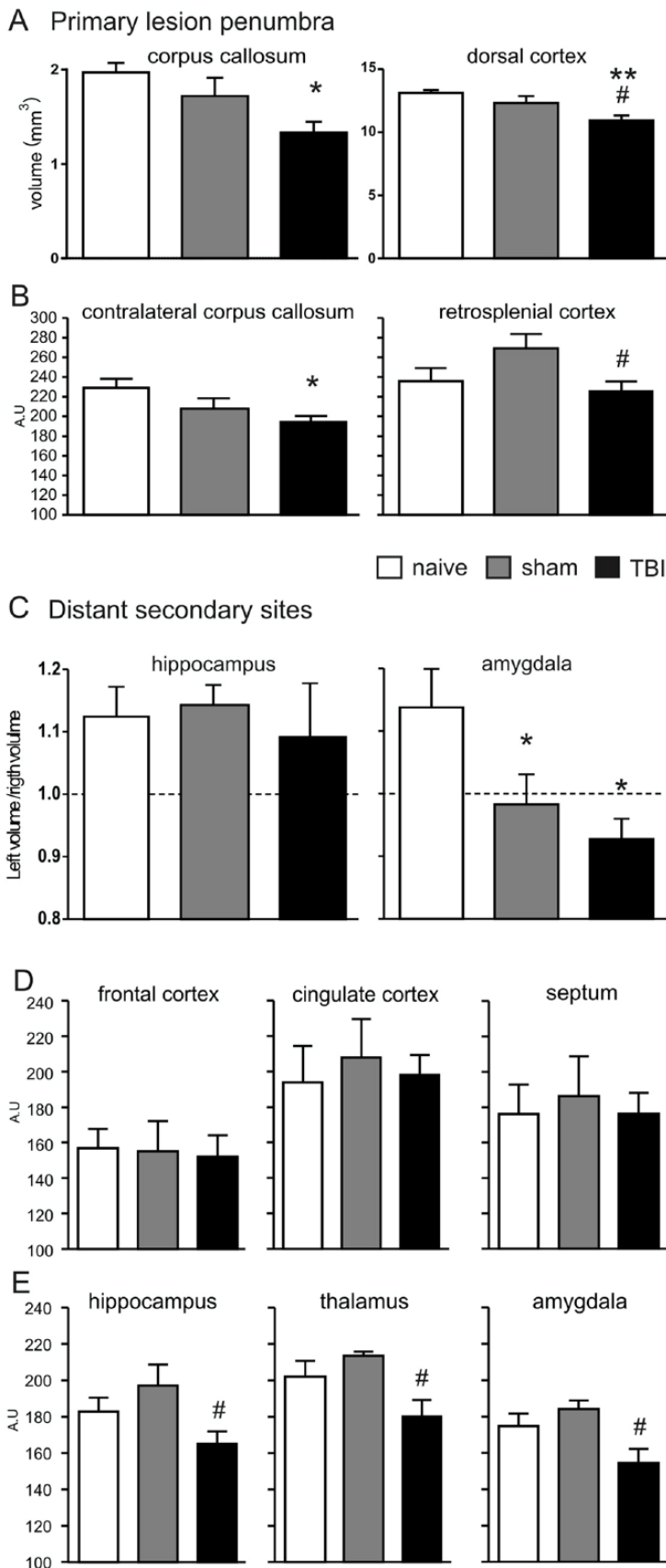


Fig. 4. Changes in brain areas volumes and white matter integrity 3 months post-surgery. (A) Volume of the corpus callosum above the lateral amygdala capsule and dorsal cortex above the pyriform cortex. (B) Quantification of MBP density in the contralateral corpus callosum and retrosplenial cortex. (C) Evaluation of the ipsilateral/contralateral volumes of the hippocampus and the amygdala. MBP density in distal areas (D) rostral and (E) ventral to the primary lesion site. Data are mean \pm SEM, n = 10–15 and were analyzed with a One-way ANOVA, followed by a Newman-Keuls test (*, **P < 0.01, P < 0.001 compared to naïve mice, #P < 0.05 compared to sham mice).

density was found in amygdalar nuclei, nor were there any ipsilateral/contralateral changes in these nuclei (data not shown). Furthermore, no density changes were found in the hilus of the dentate gyrus or the medial frontal cortex (Table 1).

MBP density measured at distant secondary sites (septum, frontal and cingulate cortices) important for the regulation of fear, but anterior to the primary lesion site, did not reveal any change (Fig. 4D). In contrast, areas of the hippocampus, thalamus and amygdala, ventral to

Table 1
Mild TBI induces long-term PTSD-like deficits.

	Naive	Sham	TBI
BLA	5238 ± 132	5219 ± 101	5160 ± 57
BMA	6118 ± 193	6079 ± 170	6043 ± 115
CeA	6397 ± 45	6161 ± 111	6225 ± 55
I	9099 ± 225	8955 ± 92	9043 ± 81
CA4/Hilus	4306 ± 104	4399 ± 62	4492 ± 112
mPFC	6928 ± 169	6922 ± 298	6955 ± 219

Cell density in various brain areas 3 months post-surgery. LA/BLA: lateral and basolateral amygdala; BMA: basomedial amygdala; CeA: central amygdala; I: intercalate nucleus of the amygdala; mPFC: medial prefrontal cortex. Data are mean ± SEM. (n = 6–10).

the primary lesion site, displayed decreased MBP density in TBI mice compared to sham mice, but not compared to naive mice.

3.2.2. Effect of TBI on BDNF mRNA transcription following fear extinction

Because long-term memory persistence is associated with increased BDNF transcription during consolidation (Bredy et al., 2007; Ou et al., 2010; Takei et al., 2011), Bdnf mRNA content was assessed for exons I, IV and IX (total Bdnf mRNA) after extinction acquisition, 3 weeks post-surgery. Fig. 5 shows the effect of CCI and craniotomy on Bdnf mRNA levels in relevant brain areas, with TBI and sham qPCR data represented in percentage relative to the naive group.

At the level of the parietal lobe, only the ipsilateral side was significantly affected by the experimental treatments (Fig. 5B). In this region, TBI provoked a 50% reduction in the transcription of exons I, IV and IX relative to naive group, and significantly decreased exon IV relative to sham. In the contralateral parietal lobe, there was a trend towards a decrease in the levels of all Bdnf exons in the TBI group. Similarly, at distant secondary sites (Fig. 5C), a similar trend was observed in amygdala and hippocampus. In the mPFC, sample variability was lower and a significant reduction in the mRNA levels of BDNF exons I and IV was observed in the TBI group (−18% and −33%, respectively) relative to naive mice. In the sham group, only the levels of exon I were reduced (near −20%) relative to naive mice. Exons I and IV account for a small percentage of total Bdnf mRNA, which was not altered by TBI.

4. Discussion

The main goal of this study was to investigate behavioral deficits relevant to PTSD, a psychiatric disorder predisposed, on the long term, by mild TBI. Additional goals were to find neurobiological correlates in brain grey and white matter areas reflecting defective brain re-organization following an injury combined with fear learning.

We confirmed that craniotomy is a brain physiological stress by itself (Lagraoui et al., 2012), as it produced some measurable effects (decreased Bdnf mRNA in mPFC, reduced long-term fear extinction, altered amygdala morphology). TBI aggravated these effects and produced additional ones (further decreased Bdnf mRNA in the ipsilateral

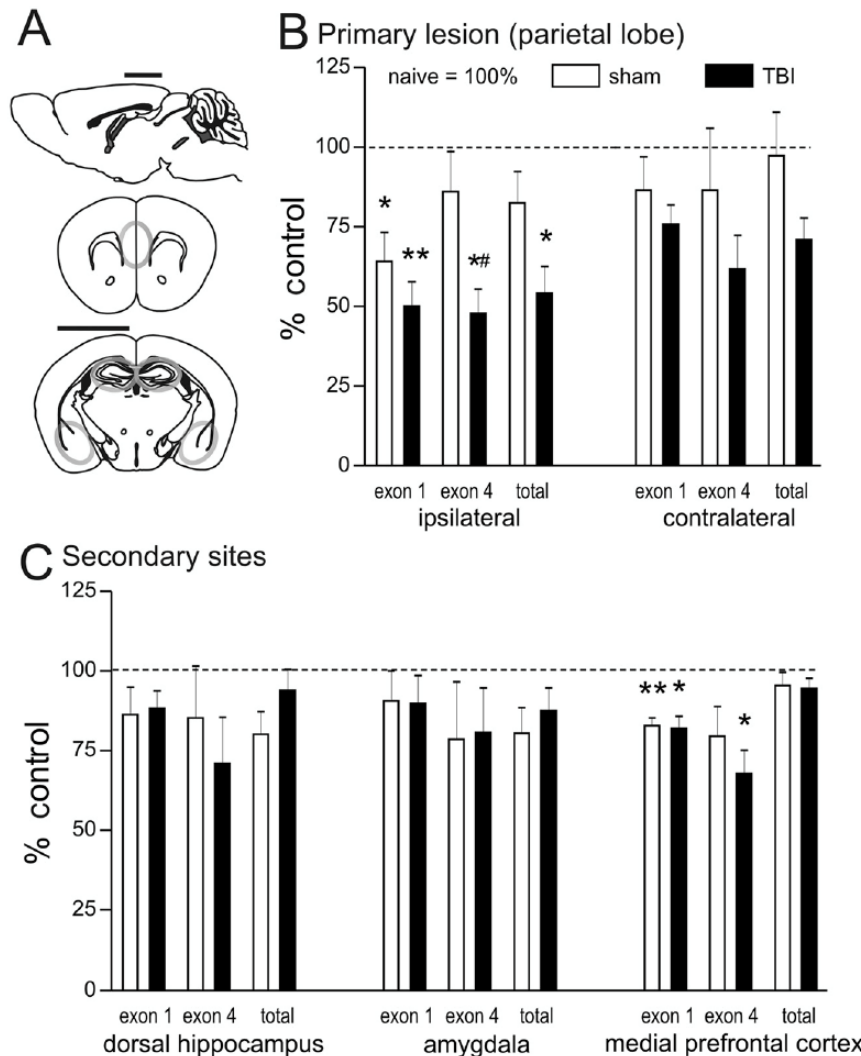


Fig. 5. BDNF mRNA exons I, IV and IX levels after fear extinction learning 3 weeks post-surgery. (A) Representation of the impact site (black line) and brain tissue sampling (grey circles). The parietal lobe was sampled directly beneath the impact (top; Bregma −0.5 to −3.5 mm). Punches of the mPFC included the infralimbic and prelimbic cortices (middle; Bregma −2 to −1.5 mm). Most amygdaloid nuclei were included (bottom; Bregma −0.55 to −2.2 mm) and only the dorsal hippocampus beneath the impact was sampled (bottom; Bregma −1 to −2.3 mm). Changes in BDNF mRNA levels (B) at the parietal lobe and (C) at distant secondary lesion sites. Mice were sacrificed immediately after the extinction session. Data expressed as percentage of naive, are mean ± SEM, n = 6–8 and were analyzed with a One-way ANOVA, followed by a Newman-Keuls test (*, **P < 0.01, P < 0.001 compared to naive mice, #P < 0.05 compared to sham mice).

parietal lobe, abolished fear extinction retention long after training, generated risk-taking behaviors, and decreased white matter in several brain areas below the impact site).

Psychological stress disorders may impair long-term brain repair. Areas like the mPFC and hippocampus are vulnerable to stressors, and large variations in glucocorticoids may have deleterious effects by generating inflammation and altering trophic factors (Gourley et al., 2009; Rohleder et al., 2010). BDNF participates in the homeostasis of neuroinflammation, and its production by activated microglia can exert both neuroprotective and pro-inflammatory effects (Lai et al., 2018). PTSD is associated with alterations of brain morphology, reductions of cortical thickness and white matter density (Eckart et al., 2011; Fani et al., 2012; Shucard et al., 2012). Similarly to PTSD, TBI is associated with biochemical defects leading to disrupted BDNF signalling and grey and white matter alterations (Bryant, 2011; Kaplan et al., 2010; Lindemer et al., 2013; Prasad and Bondy, 2015), which may explain TBI-induced psycho-trauma vulnerability (Bryant, 2011).

Little controversy exists on whether such biological disturbances exist in PTSD and TBI, but it remains unclear how these changes take place. Most trauma studies indicate decreased white matter and brain atrophies in the neural circuitry of fear, but others report the opposite (Daniels et al., 2013). Furthermore, although BDNF increases soon after an injury, as a brain repair attempt, its levels may decrease as time goes by, and as neuroinflammatory diseases become chronic. Consistently, PTSD patients display reduced plasma BDNF (Hauck et al., 2010; Kaplan et al., 2010). There is a need for preclinical models of TBI/PTSD co-morbidity to resolve biological factors determining long-term behavioral changes, and in particular fear extinction deficits and spontaneous or TBI-generated relapses of PTSD (Berthier et al., 1998; Boschen et al., 2009).

At the neuroanatomical level, cortical areas, particularly the mPFC, exert their inhibitory influences on emotion by acting on various subcortical areas that displayed decreased myelin density 3 months post-surgery. Parietal TBI induces a complex pattern of fiber degeneration in subcortical areas (Hall et al., 2008). The decreased MBP density observed in areas distant from the primary lesion site such as the thalamus and the amygdala are of great interest. Indeed, these changes may account for behavioral changes observed in TBI mice, compared to sham (craniotomy) mice, and provide further evidence of secondary lesions after mild focal TBI.

MBP loss near the lesion site is a frequently used marker of demyelination, correlating with diffusion tensor imaging data in humans and experimental TBI models (Cengiz et al., 2011; Herrera et al., 2017; Pu et al., 2013). Although some studies did not observe changes in MBP after experimental TBI (Ellis et al., 2014; Hylin et al., 2013; Kamper et al., 2013; Spain et al., 2010), the decreased volume and MBP density in the CC, at the primary lesion penumbra, was expected from our previous study (Taib et al., 2017). The processes of TBI-induced myelin loss in white matter tracts in which fibers are compacted, and those occurring in the grey matter structures where fibers are sparse, are qualitatively different. An impact on grey matter areas leads to axons becoming disconnected from damaged neurons, and the subsequent loss of myelin (Armstrong et al., 2016). In the lesion penumbra, the retrosplenial cortex displayed decreased MBP density in TBI mice relative to sham mice. Surprisingly, the latter tended to have a higher MBP density compared to naïve mice. In certain conditions, notably during development, brain injury may lead to increased rather than decreased brain myelin (Ajao et al., 2012).

The MBP density and volume changes observed at the primary lesion site penumbra (CC and retrosplenial cortex) are of limited interest with respect to the neuroanatomy of PTSD, however TBI-induced PTSD vulnerability is not only understood in terms of primary lesions. Inflammation may diffuse from primary lesion sites to distant brain areas, and some TBI studies using the CCI model provided clear signs of inflammation at secondary sites (Hazra et al., 2014; Merkel et al.,

2017). In the present study, a focal parietal lesion, distant from the main fear circuitry, produced PTSD-like behavioral features and changes in distant secondary sites. We found a morphological change of the amygdala [loss of left/right asymmetry (Spring et al., 2010)] in both TBI and sham (craniotomy) mice [but no changes of cell density, even in neurogenesis sensitive areas of the dentate gyrus (Wang et al., 2016)]. Nevertheless, the loss of myelin in the amygdala, the hippocampus, and the thalamus may by themselves have numerous behavioral consequences.

TBI may alter inhibitory white matter circuits that normally prevent risk-taking behaviors in dangerous environments. Although PTSD patients are more anxious, they are also prone to risk-taking behaviors (Svetlicky and Lubin, 2010). It was therefore interesting to find out that TBI mice had increased exploratory behaviors in the EPM and in the center of an OF, suggesting increased risk-taking behaviors in an anxiogenic environment, a finding consistent with previous CCI studies (Ekmark-Lewén et al., 2010; Washington et al., 2012). An alternative but not exclusive view suggests an increase in fear-motivated active coping in dangerous environments following TBI. A Previous study (Mozhui et al., 2010) has shown that repeated stress leads in some mice strains to a “paradoxical” increased exploration of the open arms in the EPM, rather than the classic “passive” anxiety-like suppression of approach behavior. Furthermore, there may be a shift from behavioral inhibition to active coping behaviors as a function of TBI severity (Schwarzbold et al., 2010). It would be interesting to assess risk-taking behaviors in a more specific test excluding the anxiety factor, like the Iowa gambling task recently adapted for mice (de Visser et al., 2011).

Processing speed deficit is a defining feature of TBI patients affected by white matter loss (Mathias and Wheaton, 2007). In the Barnes maze, prior to learning, TBI mice reached the target before naïve mice, which most likely reflects their more active coping strategy in an anxiogenic environment. However, TBI mice are not hyperactive, as ambulation speed measured during the sextant test did not reveal any difference. Although they ultimately learned target location in the Barnes maze, TBI mice took relatively more time to reach asymptotic behavioral performance and tended to use a serial rather than spatial strategy, in accordance with other studies (Fox et al., 1998). Nevertheless, it remains possible that because of their increased risk-taking, TBI mice had at some point a reduced motivation to escape the open area. During the reversal-learning phase, consistently with a previous report on CCI in Swiss mice (Taib et al., 2017), TBI mice also lacked cognitive flexibility, an executive process enabling one to modify pre-established strategies in light of a changing environment. Reduced myelin density in the hippocampus and interconnected structures including the thalamus and retrosplenial cortex could explain the slower learning and inflexibility (Busse and Schwarting, 2016; Linley et al., 2016; Pearson et al., 2011). Interestingly, cognitive inflexibility is another symptom shared by TBI and PTSD patients (Bondi et al., 2014; George et al., 2015; Keith et al., 2015; Whiting et al., 2017).

Among changes occurring at the cognitive level, those associated with fear are most characteristic of PTSD. Since TBI predisposes to PTSD, one may expect conditioned fear to increase in this model. Some preclinical TBI studies did find an increase in cued fear, but this occurred with a high shock regimen two days after a fluid percussion injury (Reger et al., 2012). The decrease of conditioned fear found here in mice that had CCI is rather consistent with the bulk of literature on experimental TBI (Palmer et al., 2016; Titus et al., 2016) and likely reflects a deleterious effect of TBI on amygdala-dependent memory (Abrous et al., 1999). Although counterintuitive, this observation remains relevant to the cognitive deficits of PTSD as some patients have difficulties learning fear CS–US contingencies (Blechert et al., 2007). It is also noteworthy that fluid percussion and closed-head injuries can produce more severe consequences on memory since they generate greater increases in intracranial pressure, while craniotomy has a decompressive effect reducing white matter injury (Clausen and Hillered,

2005; Friess et al., 2015). In keeping with this view, the present TBI model is mild, as it did not produce neurological deficits and small effects on auditory cued fear acquisition.

In contrast to a fluid percussion study reporting a delay of contextual fear extinction (Zhao et al., 2017), but consistently with other mild TBI studies (Genovese et al., 2013; Sierra-Mercado et al., 2015; Titus et al., 2016), CCI altered neither acquisition nor short-term retention of fear extinction. Remarkably, we observed conditioned fear resurgence in TBI mice 6 weeks post-extinction. This observation is reported here for the first time, and has a peculiar clinical significance. Indeed, PTSD or other anxiety patients can acquire fear extinction during therapy, but one of the main problems is fear relapse (Milad et al., 2009; Wurtz et al., 2016).

The fear resurgence observed in TBI mice is the most interesting feature of this model. One factor for this late relapse may be altered mPFC BDNF signalling during extinction. In this area, there was reduced transcription of the activity-dependent *Bdnf* mRNA exons I and IV following fear extinction, but not of total *Bdnf* mRNA (reflecting all transcripts, activity-dependent or otherwise). The infralimbic portion of the mPFC is crucial for the acquisition of fear extinction, and infusing BDNF into that area facilitates extinction (Rosas-Vidal et al., 2014). Fear extinction increases histone H4 acetylation around *Bdnf* exon IV promoter and *Bdnf* exons I and IV mRNA in the mPFC (Bredy et al., 2007), while mice that are resistant to fear extinction exhibit increased DNA methylation at *Bdnf* exon IV and concomitant decrease in mPFC *Bdnf* mRNA expression (Baker-Andresen et al., 2013). The present results on *Bdnf* exons I and IV in association with the fear extinction deficit after TBI are therefore consistent with the literature.

A mere craniotomy, representing a milder form of physiological stress to the brain, also reduced long-term retention of fear extinction, albeit less than TBI, and reduced *Bdnf* exon I (but not IV) mRNA in the mPFC after fear extinction. Both craniotomy and TBI have been shown to decrease *Bdnf* mRNA in the rat hippocampus 2 weeks post-surgery (Schober et al., 2012). Studies increasingly show that craniotomy and even scalp incision are not neutral (Cole et al., 2011; Ezaki et al., 2016). Craniotomy has been reported to induce inflammation, alter the neurovascular unit (Lagraoui et al., 2012; Olesen, 1987), affect dendritic spine turnover (Xu et al., 2007), and change behavior (Mayeux et al., 2015). Despite being used therapeutically to relieve TBI-induced rise in intracranial pressure, craniotomy also increases peripheral inflammation markers in humans (Klimek et al., 2009). It is also noteworthy that inflammation generated by a peripheral injury may be associated with a predisposition to PTSD (Wang et al., 2015).

5. Conclusion

We found here that mild TBI, and to a lesser extent craniotomy, produce long-term fear extinction deficits. TBI also induced risk taking behaviors, and reduced processing speed and cognitive flexibility. Three months after TBI, there were morphological changes and myelin loss in the CC, the cortex adjacent to the primary lesion site, and in several areas involved in conditioned fear. *Bdnf* transcription in the mPFC was reduced by TBI, but also craniotomy. Further studies with this murine model are necessary to determine whether re-equilibrating BDNF signalling few weeks after brain injury can restore the behavioral and neurobiological deficits.

Indeed, alterations of cortico-thalamo-amygdalar myelinated pathways may be linked with the decrease in *Bdnf* mRNA in cortical areas critical for fear extinction consolidation. Diffusion tensor imaging studies revealed similar alterations in PTSD patients (Sanjuan et al., 2013) while TBI patients display decreased BDNF levels late after injury (Schober et al., 2012). As BDNF induces white matter neuroprotection by promoting myelination via a direct action on oligodendrocytes (Husson et al., 2005; Xiao et al., 2010), the late onset of PTSD symptoms and reduction of processing speed after brain injury (Johnson and Lovell, 2011) might be prevented by treatments that increase cortical

trophic factors. Systemic BDNF TrkB agonist (Andero et al., 2011) or neural stem cell cortical transplantation promoting TBI functional recovery via BDNF (Johnson and Lovell, 2011), may provide treatment for symptom relapses in the TBI/PTSD comorbidity.

Contributors

All authors have contributed to the manuscript and approved its final version.

Role of funding source

This study was partly funded by Fondation des Gueules Cassees (www.gueules-cassees.asso.fr/). The funders did not participate in study design, data collection and analysis, publishing decisions, or manuscript preparation.

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

We thank the team of the animal platform (CRP-UMS3612 CNRS-US25 INSERM-IRD, Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Paris, France) for animal care, the Brain and Spine Institut for histological imaging facilities, and Laurence Lanfumey (INSERM UMR894 Centre of Psychiatry and Neurosciences, St Anne Hospital, Paris, France) for the RT-qPCR facilities.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.07.023>.

References

- Abrous, D.N., Rodriguez, J., le Moal, M., Moser, P.C., Barnéoud, P., 1999. Effects of mild traumatic brain injury on immunoreactivity for the inducible transcription factors c-Fos, c-Jun, JunB, and Krox-24 in cerebral regions associated with conditioned fear responding. *Brain Res.* 826, 181–192.
- Ajao, D.O., Pop, V., Kamper, J.E., Adami, A., Rudobeck, E., Huang, L., Vlkolinsky, R., Hartman, R.E., 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. <https://doi.org/10.1089/neu.2011.1883>.
- Andero, R., Heldt, S.A., Ye, K., Liu, X., Armario, A., Ressler, K.J., 2011. Effect of 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, on emotional learning. *Am. J. Psychiatry* 168, 163–172. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.10030326>.
- Armstrong, R.C., Mierzwa, A.J., Sullivan, G.M., Sanchez, M.A., 2016. Myelin and oligodendrocyte lineage cells in white matter pathology and plasticity after traumatic brain injury. *Neuropharmacology* 110, 654–659. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.04.029>.
- Baker-Andresen, D., Flavell, C.R., Li, X., Bredy, T.W., 2013. Activation of BDNF signaling prevents the return of fear in female mice. *Learn. Mem.* 20, 237–240. <https://doi.org/10.1101/lm.029520.112>.
- Berthier, M.L., Kulisevsky, J., Fernández Benitez, J.A., Gironell, A., 1998. Reactivation of posttraumatic stress disorder after minor head injury. *Depress Anxiety* 8, 43–47. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6394\(1998\)8:1<43::AID-DA9>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6394(1998)8:1<43::AID-DA9>3.0.CO;2-6).
- Blechert, J., Michael, T., Vriends, N., Margraf, J., Wilhelm, F.H., 2007. Fear conditioning in posttraumatic stress disorder: evidence for delayed extinction of autonomic, experiential, and behavioural responses. *Behav. Res. Ther.* 45, 2019–2033. <https://doi.org/10.1016/j.brat.2007.02.012>.
- Bondi, C.O., Cheng, J.P., Tennant, H.M., Monaco, C.M., Kline, A.E., 2014. Old dog, new tricks: the attentional set-shifting test as a novel cognitive behavioral task after controlled cortical impact injury. *J. Neurotrauma* 31, 926–937. <https://doi.org/10.1089/neu.2013.3295>.
- Boschen, M.J., Neumann, D.L., Waters, A.M., 2009. Relapse of successfully treated anxiety and fear: theoretical issues and recommendations for clinical practice. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* 43, 89–100.
- Bredy, T.W., Wu, H., Crego, C., Zellhoefer, J., Sun, Y.E., Barad, M., 2007. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learn. Mem.* 14, 268–276. <https://doi.org/10.1101/lm.500907>.

- Bryant, R., 2011. Post-traumatic stress disorder vs traumatic brain injury. *Dialogues Clin. Neurosci.* 13, 251.
- Busse, S., Schwarting, R.K.W., 2016. Decoupling actions from consequences: dorsal hippocampal lesions facilitate instrumental performance, but impair behavioral flexibility in rats. *Front. Behav. Neurosci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00118>.
- Cengiz, P., Uluc, K., Kendigelen, P., Akture, E., Hutchinson, E., Song, C., Zhang, L., Lee, J., Budoff, G.E., Meyerand, E., Sun, D., Ferrazzano, P., 2011. Chronic neurological deficits in mice after perinatal hypoxia and ischemia correlate with hemispheric tissue loss and white matter injury detected by MRI. *Dev. Neurosci.* 33, 270–279. <https://doi.org/10.1159/000328430>.
- CENTER-TBI Project, 2018. Cent.-TBI Website. <https://www.center-tbi.eu> (accessed 1.6.18).
- Clausen, F., Hillered, L., 2005. Intracranial pressure changes during fluid percussion, controlled cortical impact and weight drop injury in rats. *Acta Neurochir.* 147, 775–780. <https://doi.org/10.1007/s00701-005-0550-2>.
- Cole, J.T., Yamell, A., Kean, W.S., Gold, E., Lewis, B., Ren, M., McMullen, D.C., Jacobowitz, D.M., Pollard, H.B., O'Neill, J.T., Grunberg, N.E., Dalgard, C.L., Frank, J.A., Watson, W.D., 2011. Craniotomy: true sham for traumatic brain injury, or a sham of a sham? *J. Neurotrauma* 28, 359–369. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1427>.
- Cowansage, K.K., LeDoux, J.E., Monfils, M.H., 2010. Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Curr. Mol. Pharmacol.* 3, 12–29.
- Daniels, J.K., Lamke, J.-P., Gaebler, M., Walter, H., Scheel, M., 2013. White matter integrity and its relationship to PTSD and childhood trauma—a systematic review and meta-analysis. *Depress Anxiety* 30, 207–216. <https://doi.org/10.1002/da.22044>.
- de Visser, L., Homberg, J.R., Mitsogiannis, M., Zeeb, F.D., Rivalan, M., Fitoussi, A., Gallardo, V., van den Bos, R., Winstanley, C.A., Dellu-Hagedorn, F., 2011. Rodent versions of the Iowa Gambling Task: opportunities and challenges for the understanding of decision-making. *Front. Neurosci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00109>.
- Depue, B.E., Olson-Madden, J.H., Smolker, H.R., Rajamani, M., Brenner, L.A., Banich, M.T., 2014. Reduced amygdala volume is associated with deficits in inhibitory control: a voxel- and surface-based morphometric analysis of comorbid PTSD/mild TBI. *BioMed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2014/691505>.
- Eckart, C., Stoppel, C., Kaufmann, J., Tempelmann, C., Hinrichs, H., Elbert, T., Heinze, H.-J., Kolassa, I.-T., 2011. Structural alterations in lateral prefrontal, parietal and posterior midline regions of men with chronic posttraumatic stress disorder. *J. Psychiatry Neurosci.* 36, 176–186. <https://doi.org/10.1503/jpn.100010>.
- Ekmark-Lewén, S., Lewén, A., Meyerson, B.J., Hillered, L., 2010. The multivariate concentric square field test reveals behavioral profiles of risk taking, exploration, and cognitive impairment in mice subjected to traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 27, 1643–1655. <https://doi.org/10.1089/neu.2009.0953>.
- Ellis, T.W., Ziebell, J.M., David Adelson, P., Lifshitz, J., 2014. Commentary on Kamper et al., juvenile traumatic brain injury evolves into a chronic brain disorder: the challenges in longitudinal studies of juvenile traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 261, 434–439. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.06.008>.
- Ezaki, J., Shimada, R., Shibuya, M., Kibayashi, K., 2016. Hippocampal neuronal degeneration in the traumatic brain injury mouse: non-trivial effect of scalp incision. *Neurol. Res.* 38, 994–1002. <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1228746>.
- Fani, N., King, T.Z., Jovanovic, T., Glover, E.M., Bradley, B., Choi, K., Ely, T., Gutman, D.A., Ressler, K.J., 2012. White matter integrity in highly traumatized adults with and without post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 37, 2740.
- Fox, G.B., Fan, L., Levasseur, R.A., Faden, A.L., 1998. Effect of traumatic brain injury on mouse spatial and nonspatial learning in the Barnes circular maze. *J. Neurotrauma* 15, 1037–1046.
- Friess, S.H., Lapidus, J.B., Brody, D.L., 2015. Decompressive craniectomy reduces white matter injury after controlled cortical impact in mice. *J. Neurotrauma* 32, 791–800. <https://doi.org/10.1089/neu.2014.3564>.
- Genovese, R.F., Simmons, L.P., Ahlers, S.T., Maudlin-Jeronimo, E., Dave, J.R., Boutte, A.M., 2013. Effects of mild TBI from repeated blast overpressure on the expression and extinction of conditioned fear in rats. *Neuroscience* 254, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.021>.
- George, S.A., Rodriguez-Santiago, M., Riley, J., Abelson, J.L., Floresco, S.B., Liberzon, I., 2015. Alterations in cognitive flexibility in a rat model of post-traumatic stress disorder. *Behav. Brain Res.* 286, 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.051>.
- Gong, Q., Li, L., Tognin, S., Wu, Q., Pettersson-Yeo, W., Lui, S., Huang, X., Marquand, A.F., Mechelli, A., 2014. Using structural neuroanatomy to identify trauma survivors with and without post-traumatic stress disorder at the individual level. *Psychol. Med.* 44, 195–203. <https://doi.org/10.1017/S0033291713000561>.
- Gourley, S.L., Kedves, A.T., Olausson, P., Taylor, J.R., 2009. A history of corticosterone exposure regulates fear extinction and cortical NR2B, GluR2/3, and BDNF. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 34, 707–716. <https://doi.org/10.1038/npp.2008.123>.
- Hall, E.D., Bryant, Y.D., Cho, W., Sullivan, P.G., 2008. Evolution of post-traumatic neurodegeneration after controlled cortical impact traumatic brain injury in mice and rats as assessed by the De Olmos silver and fluorogold staining methods. *J. Neurotrauma* 25, 235–247. <https://doi.org/10.1089/neu.2007.0383>.
- Hauck, S., Kapczinski, F., Roessler, R., de Moura Silveira, É., Magalhães, P.V., Kruehl, L.R.P., Schestatsky, S.S., Ceitlin, L.H.F., 2010. Serum brain-derived neurotrophic factor in patients with trauma psychopathology. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34, 459–462. <https://doi.org/10.1016/j.pnpb.2010.01.010>.
- Hayes, J.P., Bigler, E.D., Verfaellie, M., 2016. Traumatic brain injury as a disorder of brain connectivity. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 22, 120–137. <https://doi.org/10.1017/S1355617715000740>.
- Hazra, A., Macolino, C., Elliott, M.B., Chin, J., 2014. Delayed thalamic astrocytosis and disrupted sleep-wake patterns in a preclinical model of traumatic brain injury. *J. Neurosci. Res.* 92, 1434–1445. <https://doi.org/10.1002/jnr.23430>.
- Heldt, S.A., Stanek, L., Chhatwal, J.P., Ressler, K.J., 2007. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol. Psychiatry* 12, 656–670.
- Herrera, J.J., Bockhorst, K., Kondraganti, S., Stertz, L., Quevedo, J., Narayana, P.A., 2017. Acute white matter tract damage after frontal mild traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 34, 291–299. <https://doi.org/10.1089/neu.2016.4407>.
- Howlett, J.R., Stein, M.B., 2016. Post-traumatic stress disorder: relationship to traumatic brain injury and approach to treatment. In: Laskowitz, D., Grant, G. (Eds.), *Translational Research in Traumatic Brain Injury*, Frontiers in Neuroscience. CRC Press/Taylor and Francis Group, Boca Raton (FL).
- Husson, I., Rangon, C.-M., Lelièvre, V., Bemelmans, A.-P., Sachs, P., Mallet, J., Kosofsky, B.E., Gressens, P., 2005. BDNF-induced white matter neuroprotection and stage-dependent neuronal survival following a neonatal excitotoxic challenge. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 (15), 250–261. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh127>.
- Hylin, M.J., Orsi, S.A., Zhao, J., Bockhorst, K., Perez, A., Moore, A.N., Dash, P.K., 2013. Behavioral and histopathological alterations resulting from mild fluid percussion injury. *J. Neurotrauma* 30, 702–715. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2630>.
- James, L.M., Strom, T.Q., Leskela, J., 2014. Risk-taking behaviors and impulsivity among veterans with and without PTSD and mild TBI. *Mil. Med.* 179, 357–363. <https://doi.org/10.7205/MILMED-D-13-00241>.
- Johnson, E.W., Lovell, M.R., 2011. Neuropsychological assessment. In: *Textbook of Traumatic Brain Injury*. American Psychiatric Publishing, pp. 136–137. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9781585624201.js04>.
- Kamper, J.E., Pop, V., Fukuda, A., Ajao, D., Hartman, R., Badaut, J., 2013. Juvenile traumatic brain injury evolves into a chronic brain disorder: behavioral and histological changes over 6 Months. *Exp. Neurol.* 250, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.09.016>.
- Kaplan, G.B., Vasterling, J.J., Vedak, P.C., 2010. Brain-derived neurotrophic factor in traumatic brain injury, post-traumatic stress disorder, and their comorbid conditions: role in pathogenesis and treatment. *Behav. Pharmacol.* 21, 427–437. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e32833d8bc9>.
- Keith, J., Velezmo, R., O'Brien, C., 2015. Correlates of cognitive flexibility in veterans seeking treatment for posttraumatic stress disorder. *J. Nerv. Ment. Dis.* 203, 287–293. <https://doi.org/10.1097/NMD.0000000000000280>.
- Klimek, M., Hol, J.W., Wens, S., Heijmans-Antonissen, C., Niehof, S., Vincent, A.J., Klein, J., Zijlstra, F.J., 2009. Inflammatory profile of awake function-controlled craniotomy and craniotomy under general anesthesia. *Mediators Inflamm.* <https://doi.org/10.1155/2009/670480>.
- Lagraoui, M., Latoche, J.R., Cartwright, N.G., Sukumar, G., Dalgard, C.L., Schaefer, B.C., 2012. Controlled cortical impact and craniotomy induce strikingly similar profiles of inflammatory gene expression, but with distinct kinetics. *Front. Neurol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00155>.
- Lai, S.-W., Chen, J.-H., Lin, H.-Y., Liu, Y.-S., Tsai, C.-F., Chang, P.-C., Lu, D.-Y., Lin, C., 2018. Regulatory effects of neuroinflammatory responses through brain-derived neurotrophic factor signaling in microglial cells. *Mol. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0933-z>.
- Liberzon, I., Sripada, C.S., 2008. The functional neuroanatomy of PTSD: a critical review. *Prog. Brain Res.* 167, 151–169. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)67011-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)67011-3).
- Lindemer, E.R., Salat, D.H., Leritz, E.C., McGlinchey, R.E., Milberg, W.P., 2013. Reduced cortical thickness with increased lifetime burden of PTSD in OEF/OIF Veterans and the impact of comorbid TBI. *NeuroImage Clin.* 2, 601–611. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2013.04.009>.
- Linley, S.B., Gallo, M.M., Vertes, R.P., 2016. Lesions of the ventral midline thalamus produce deficits in reversal learning and attention on an odor texture set shifting task. *Brain Res.* 1649, 110–122. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.08.022>.
- Marek, R., Jin, J., Goode, T.D., Giustino, T.F., Wang, Q., Acca, G.M., Holehonnur, R., Ploski, J.E., Fitzgerald, P.J., Lynagh, T., Lynch, J.W., Maren, S., Sah, P., 2018. Hippocampus-driven feed-forward inhibition of the prefrontal cortex mediates relapse of extinguished fear. *Nat. Neurosci.* 21, 384–392. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0073-9>.
- Mathias, J.L., Wheaton, P., 2007. Changes in attention and information-processing speed following severe traumatic brain injury: a meta-analytic review. *Neuropsychology* 21, 212–223. <https://doi.org/10.1037/0894-4105.21.2.212>.
- Mayeux, J.P., Teng, S.X., Katz, P.S., Gilpin, N.W., Molina, P.E., 2015. Traumatic brain injury induces neuroinflammation and neuronal degeneration that is associated with escalated alcohol self-administration in rats. *Behav. Brain Res.* 0, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.053>.
- Merkel, S.F., Razmpour, R., Lutton, E.M., Tallarida, C.S., Heldt, N.A., Cannella, L.A., Persidsky, Y., Rawls, S.M., Ramirez, S.H., 2017. Adolescent traumatic brain injury induces chronic mesolimbic neuroinflammation with concurrent enhancement in the rewarding effects of cocaine in mice during adulthood. *J. Neurotrauma* 34, 165–181. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4275>.
- Milad, M.R., Pitman, R.K., Ellis, C.B., Gold, A.L., Shin, L.M., Lasko, N.B., Zeidan, M.A., Handwerker, K., Orr, S.P., Rauch, S.L., 2009. Neurobiological basis of failure to recall extinction memory in posttraumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry* 66, 1075–1082. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.06.026>.
- Mozhui, K., Karlsson, R.-M., Kash, T.L., Ihne, J., Norcross, M., Patel, S., Farrell, M.R., Hill, E.E., Graybeal, C., Martin, K.P., Camp, M., Fitzgerald, P.J., Ciobanu, D.C., Sprengel, R., Mishina, M., Wellman, C.L., Winder, D.G., Williams, R.W., Holmes, A., 2010. Strain differences in stress responsivity are associated with divergent amygdala gene expression and glutamate-mediated neuronal excitability. *J. Neurosci.* 30, 5357–5367. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5017-09.2010>.
- Olesen, S.P., 1987. Leakiness of rat brain microvessels to fluorescent probes following craniotomy. *Acta Physiol. Scand.* 130, 63–68. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716>

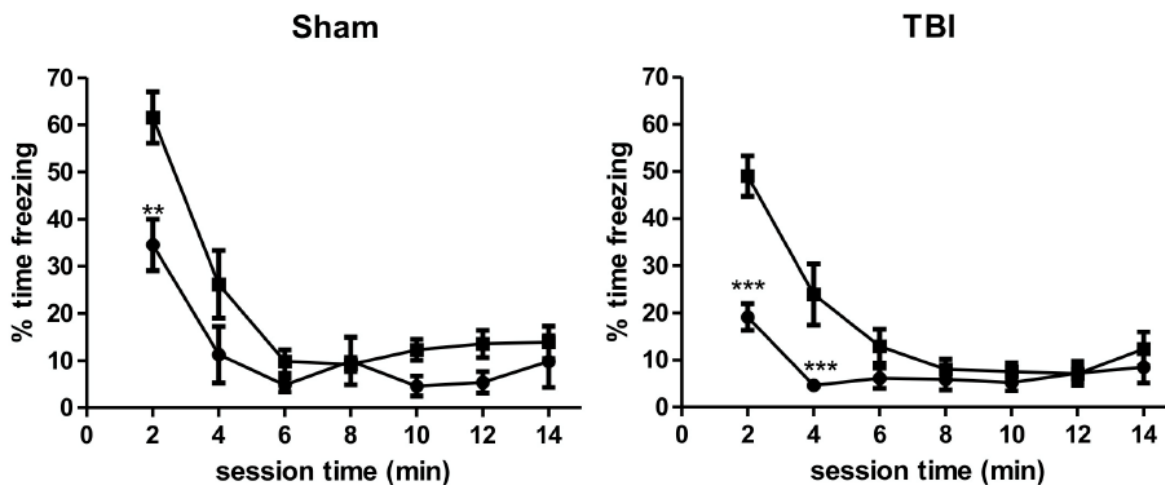
- 1987.tb08112.x.
- Ou, L.-C., Yeh, S.-H., Gean, P.-W., 2010. Late expression of brain-derived neurotrophic factor in the amygdala is required for persistence of fear memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 93, 372–382. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.12.003>.
- Palmer, C.P., Metheny, H.E., Elkind, J.A., Cohen, A.S., 2016. Diminished amygdala activation and behavioral threat response following traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 277, 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.01.004>.
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press.
- Pearson, J.M., Heilbronner, S.R., Barack, D.L., Hayden, B.Y., Platt, M.L., 2011. Posterior cingulate cortex: adapting behavior to a changing world. *Trends Cogn. Sci.* 15, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.02.002>.
- Prasad, K.N., Bondy, S.C., 2015. Common biochemical defects linkage between post-traumatic stress disorders, mild traumatic brain injury (TBI) and penetrating TBI. *Brain Res.* 1599, 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.038>.
- Pu, H., Guo, Y., Zhang, W., Huang, L., Wang, G., Liou, A.K., Zhang, J., Zhang, P., Leak, R.K., Wang, Y., Chen, J., Gao, Y., 2013. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation improves neurologic recovery and attenuates white matter injury after experimental traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1474–1484. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.108>.
- Reger, M.L., Poulos, A.M., Buen, F., Giza, C.C., Hovda, D.A., Fanselow, M.S., 2012. Concussive brain injury enhances fear learning and excitatory processes in the amygdala. *Biol. Psychiatry* 71, 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.11.007>.
- Rohleder, N., Wolf, J.M., Wolf, O.T., 2010. Glucocorticoid sensitivity of cognitive and inflammatory processes in depression and posttraumatic stress disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.12.003>.
- Rosas-Vidal, L.E., Do-Monte, F.H., Sotres-Bayon, F., Quirk, G.J., 2014. Hippocampal-prefrontal BDNF and memory for fear extinction. *Neuropsychopharmacology* 39, 2161–2169. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.64>.
- Sanjuan, P.M., Thoma, R., Claus, E.D., Mays, N., Caprihan, A., 2013. Reduced white matter integrity in the cingulum and anterior corona radiata in posttraumatic stress disorder in male combat veterans: a diffusion tensor imaging study. *Psychiatry Res.* 214, 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2013.09.002>.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.
- Schober, M.E., Block, B., Requena, D.F., Hale, M.A., Lane, R.H., 2012. Developmental traumatic brain injury decreased brain derived neurotrophic factor expression late after injury. *Metab. Brain Dis.* 27, 167–173. <https://doi.org/10.1007/s11011-012-9309-7>.
- Schwarzbold, M.L., Rial, D., De Bem, T., Machado, D.G., Cunha, M.P., dos Santos, A.A., dos Santos, D.B., Figueiredo, C.P., Farina, M., Goldfeder, E.M., Rodrigues, A.L.S., Prediger, R.D.S., Walz, R., 2010. Effects of traumatic brain injury of different severities on emotional, cognitive, and oxidative stress-related parameters in mice. *J. Neurotrauma* 27, 1883–1893. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1318>.
- Shucard, J.L., Cox, J., Shucard, D.W., Fetter, H., Chung, C., Ramasamy, D., Violanti, J., 2012. Symptoms of posttraumatic stress disorder and exposure to traumatic stressors are related to brain structural volumes and behavioral measures of affective stimulus processing in police officers. *Psychiatry Res. Neuroimaging* 204, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2012.04.006>.
- Sierra-Mercado, D., McAllister, L.M., Lee, C.C.H., Milad, M.R., Eskandar, E.N., Whalen, M.J., 2015. Controlled cortical impact before or after fear conditioning does not affect fear extinction in mice. *Brain Res.* 1606, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.02.031>.
- Siopi, E., Cho, A.H., Homsy, S., Croci, N., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C., Jafarian-Tehrani, M., 2011. Minocycline restores sAPP α levels and reduces the late histopathological consequences of traumatic brain injury in mice. *J. Neurotrauma* 28, 2135–2143. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1738>.
- Spain, A., Daumas, S., Lifshitz, J., Rhodes, J., Andrews, P.J.D., Horsburgh, K., Fowler, J.H., 2010. Mild fluid percussion injury in mice produces evolving selective axonal pathology and cognitive deficits relevant to human brain injury. *J. Neurotrauma* 27, 1429–1438. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1288>.
- Spring, S., Lerch, J.P., Wetzel, M.K., Evans, A.C., Henkelman, R.M., 2010. Cerebral asymmetries in 12-week-old C57Bl/6J mice measured by magnetic resonance imaging. *NeuroImage* 50, 409–415. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.12.043>.
- Svetlicky, V., Lubin, G., 2010. Combat exposure, posttraumatic stress symptoms and risk-taking behavior in veterans of the Second Lebanon War. *Isr. J. Psychiatry Relat. Sci.* 47, 276.
- Taib, T., Leconte, C., Van Steenwinkel, 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., Besson, V.C., 2017. Neuroinflammation, myelin and behavior: Temporal patterns following mild traumatic brain injury in mice. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184811>.
- Takei, S., Morinobu, S., Yamamoto, S., Fuchikami, M., Matsumoto, T., Yamawaki, S., 2011. Enhanced hippocampal BDNF/TrkB signaling in response to fear conditioning in an animal model of posttraumatic stress disorder. *J. Psychiatr. Res.* 45, 460–468. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2010.08.009>.
- Titus, D.J., Wilson, N.M., Freund, J.E., Carballosa, M.M., Sikah, K.E., Furones, C., Dietrich, W.D., Gurney, M.E., Atkins, C.M., 2016. Chronic cognitive dysfunction after traumatic brain injury is improved with a phosphodiesterase 4B inhibitor. *J. Neurosci.* 36, 7095–7108. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3212-15.2016>.
- Wang, X.-W., Karki, A., Du, D.-Y., Zhao, X.-J., Xiang, X.-Y., Lu, Z.-Q., 2015. Plasma levels of high mobility group box 1 increase in patients with posttraumatic stress disorder after severe blunt chest trauma: a prospective cohort study. *J. Surg. Res.* 193, 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.06.020>.
- Wang, X., Gao, X., Michalski, S., Zhao, S., Chen, J., 2016. Traumatic brain injury severity affects neurogenesis in adult mouse hippocampus. *J. Neurotrauma* 33, 721–733. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4097>.
- Washington, P.M., Forcelli, P.A., Wilkins, T., Zapple, D.N., Parsadian, M., Burns, M.P., 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. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2456>.
- Whiting, D.L., Deane, F.P., Simpson, G.K., McLeod, H.J., Ciarrochi, J., 2017. Cognitive and psychological flexibility after a traumatic brain injury and the implications for treatment in acceptance-based therapies: a conceptual review. *Neuropsychol. Rehabil.* 27, 263–299. <https://doi.org/10.1080/09602011.2015.1062115>.
- Wurtz, H., El-Khoury-Malhame, M., Wilhelm, F.H., Michael, T., Beetz, E.M., Roques, J., Reynaud, E., Courtin, J., Khalifa, S., Herry, C., 2016. Preventing long-lasting fear recovery using bilateral alternating sensory stimulation: a translational study. *Neuroscience* 321, 222–235. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.012>.
- Xiao, J., Wong, A.W., Willingham, M.M., van den Buuse, M., Kilpatrick, T.J., Murray, S.S., 2010. Brain-derived neurotrophic factor promotes central nervous system myelination via a direct effect upon oligodendrocytes. *Neurosignals* 18, 186–202. <https://doi.org/10.1159/000323170>.
- Xu, H.-T., Pan, F., Yang, G., Gan, W.-B., 2007. Choice of cranial window type for in vivo imaging affects dendritic spine turnover in the cortex. *Nat. Neurosci.* 10, 549. <https://doi.org/10.1038/nn1883>.
- Zhao, J., Huynh, J., Hylin, M.J., O'Malley, J.J., Perez, A., Moore, A.N., Dash, P.K., 2017. Mild traumatic brain injury reduces spine density of projection neurons in the medial prefrontal cortex and impairs extinction of contextual fear memory. *J. Neurotrauma*. <https://doi.org/10.1089/neu.2016.4898>.

Supplementary data

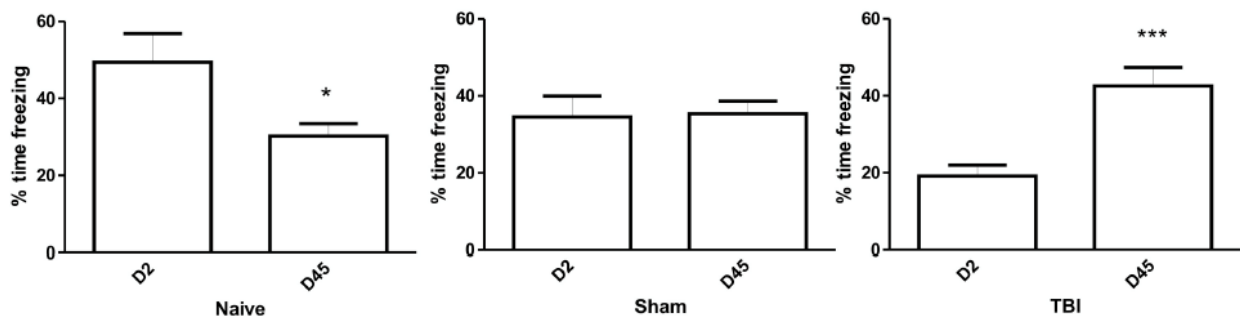
Supplementary tables and figures

Gene name	Forward/reverse (5' - 3')	Sequence
BDNF 1	Forward	GTCGGTGTGAACGGATTTGG
	Reverse	GTCAATGAAGGGGTCGTTGATG
BDNF 4	Forward	CGCCATGCAATTTCCACTATCAATAATTTAAC
	Reverse	CTTTTTTCAGTCACTACTTGTCAAAGTAAAC
BDNF 9	Forward	AGTGTAATCCCATGGGTTACACCA
	Reverse	CAGGAAGTGTCTATCCTTATGAATCG
GAPDH	Forward	AGTTGCTTTGTCTTCTGTAGTCGC
	Reverse	CCTGGAGACTCAGTGTCTTAA

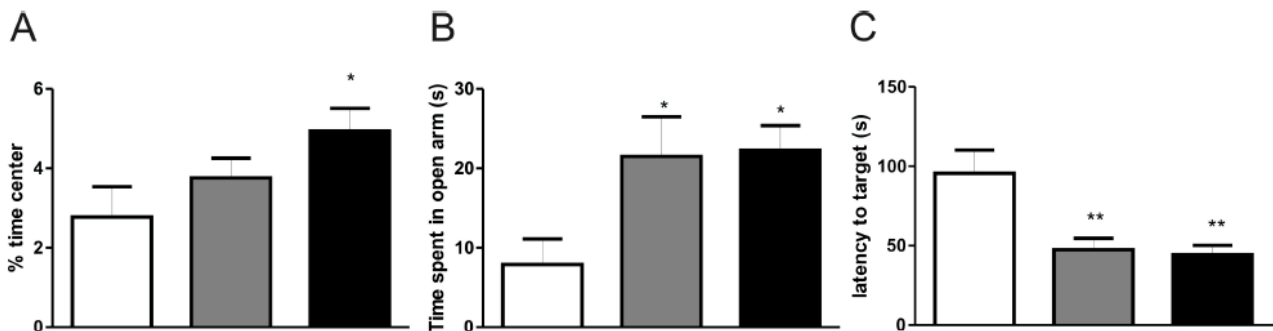
Supp. table 1. List of primers used for mRNA expression analysis



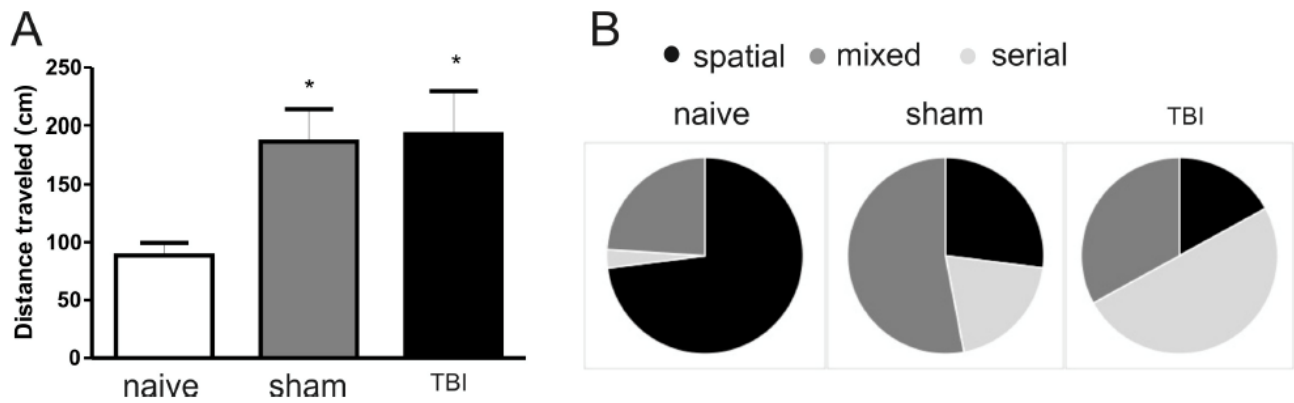
Supp. fig. 1. Auditory conditioned fear extinction for sham and TBI mice. Amount of freezing expressed during the first 14 min of extinction, on day-1 (squares) and day-2 (circles). Data were analysed with a Two-way ANOVA for repeated measurements, followed by a Bonferroni's pair-wise comparison. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. For sham mice there was a significant effect of Time [$F(6, 120) = 31.3, P < 0.0001$], not of Day [$F(1, 20) = 9.8, P = 0.38$] but a significant interaction [$F(6, 120) = 10.1, P < 0.0001$] and for TBI mice, there was a significant effect of Time [$F(6, 162) = 31.3, P < 0.0001$], Day [$F(1, 27) = 9.8, P < 0.01$] and a significant interaction [$F(6, 162) = 10.1, P < 0.0001$].



Supp. fig. 2. Resurgence of auditory conditioned fear in TBI mice during the probe test on day-45. Freezing was measured during the first 2 min of day-2 (after some acquisition of extinction on day-1) vs. freezing during the 2 min probe test on day-45. Data were first analyzed using the Two-way ANOVA. There was no overall effect of Surgery [$F(2, 66) = 1.8, P = 0.16$], of Day [$F(1, 66) = 1.8, P = 0.19$], but there was significant interaction [$F(2, 66) = 10.5, P < 0.001$]. The data were then analyzed with a Student t-test. There was a further acquisition of extinction in naïve mice, but not in sham mice. In contrast there was a resurgence of conditioned freezing in TBI mice. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$



Supp. fig. 3. TBI and sham craniotomy mice express greater exploratory behaviors compared to naïve mice in novel environments. They therefore spent more time in the center of an open-field (A), on the open arms of the elevated plus-maze (B), and could reach the target faster in the Barnes maze, on the first trial, before any learning took place (C). ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, TBI or sham vs. naïve; One-way Anova followed by the Newman-Keuls test $n = 10-15$.



Supp. fig. 4. TBI and sham craniotomy mice travel a greater distance and display less spatial strategy to reach the target. Traveled distance during the third trial **(A)** and proportion of mice displaying either spatial vs. serial strategies or a mix of the latter strategies to reach the target during the third trial **(B)**. * $P < 0.05$, TBI or sham vs. naïve; One-way Anova followed by the Newman-Keuls test $n = 10-12$.

	Naive	Sham	TBI
Frontal ctx	0.96 +/- 0.02	0.86 +/- 0.07	0.92 +/- 0.03
Ventricles	0.78 +/- 0.04	0.85 +/- 0.08	0.79 +/- 0.06
Amygdala	1.94 +/- 0.06	1.97 +/- 0.08	1.97 +/- 0.05
Hippocampus	3.93 +/- 0.14	3.70 +/- 0.20	3.80 +/- 0.12

Supp. table 2. Volume of the frontal cortex and of brain areas below the craniotomy. Data (in mm^3) are mean +/- SEM, $n=6-7$.

Résultats supplémentaires sur les modifications épigénétiques du Bdnf suite au traumatisme crânien

La méthylation de l'ADN est la modification épigénétique la plus accessible en post-mortem chez l'humain du fait de la résilience de l'ADN. Dans l'optique de trouver des marqueurs associés à la vulnérabilité psychiatrique post-TC, la méthylation de l'ADN était donc une cible de choix. Suite aux résultats obtenus lors de l'analyse des niveaux d'expression des exons I et IV du Bdnf dans notre premier article (Figure 5B et 5C), nous avons souhaité déterminer si ceux-ci seraient accompagnés d'une altération de la méthylation des promoteurs de ces exons (p1 et p4, respectivement), en employant la technique de MeDIP (voir Matériel et Méthodes, section 7). Nous rappelons que l'exon IX reflète la totalité des transcrits du Bdnf, c'est pourquoi il n'existe pas un locus spécifique où évaluer les niveaux de méthylation pour comprendre la diminution de l'expression de cet exon dans le cortex pariétal ipsilatéral (Article 1, Figure 5B).

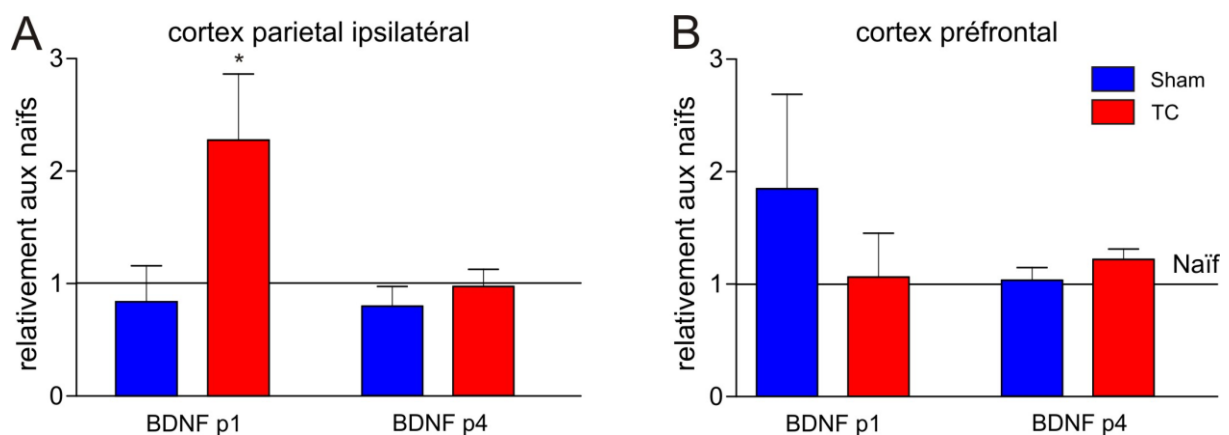


Figure 1. Analyse des niveaux de méthylation des promoteurs des exons I et IV du Bdnf dans les régions présentant une diminution de ses niveaux d'expression. Niveau de méthylation du p1 et du p4 dans le cortex pariétal ipsilatéral (A) et le cortex préfrontal (B) 3 semaines post-TC suivi du conditionnement et de l'extinction de la peur, exprimé relativement au groupe naïf. Les données ont été analysées par une Anova à un facteur suivie du test de Neumann-Keuls (* $p < 0,05$ versus naïfs).

Après l'exposition au conditionnement de la peur 3 semaines post-TC, les niveaux de méthylation étaient augmentés dans le cortex pariétal ipsilatéral chez les animaux TC au niveau du p1 relativement au naïfs ($p < 0.05$, Figure 1A). Cette augmentation est cohérente avec les théories considérant la méthylation comme répressive (décrites dans le chapitre 3, section 1.3). Alors que les transcrits Bdnf contenant l'exon I étaient aussi

diminués chez les animaux sham, les niveaux de méthylation de son promoteur n'étaient pas affectés. Concernant le p4, les niveaux de méthylation étaient similaires dans tous les groupes (Figure 1A). Ces résultats sont surprenants, car la diminution de l'expression de l'exon IV chez les animaux TC était comparable à celle de l'exon I (Article 1, Figure 5B), nous aurions donc pu nous attendre à une augmentation des niveaux de méthylation du p4.

Au niveau du cortex préfrontal, aucune modification des niveaux de méthylation n'a pu être détectée, que ce soit pour le p1 ou le p4 (Figure 1B). Bien que ce résultat soit décevant, il est possible que la diminution de l'expression des exons I et IV soit trop faible pour se manifester au niveau de la méthylation des promoteurs (Article 1, Figure 5C). Il n'est pas exclu que les altérations des niveaux d'expression du Bdnf IV soient expliquées par d'autres modifications de l'épigénome, nécessitant plus d'investigation.

Article 2

Limitations of Insulin-like Growth Factors as specific markers of traumatic brain injury: Effects of stress

Rémi Corne¹, Michaël Ogier², Valérie Besson¹, Sofiane Ait Si Slimane¹, Mathieu Coutan²,
Marta LC Palhas¹, Fang Xue Shen¹, Catherine Marchand-Leroux¹, Raymond Mongeau^{1*}

(1) Université de Paris, EA4475 – Pharmacologie de la circulation cérébrale Faculté de Pharmacie de Paris. 4 avenue de l'Observatoire, Paris, France

(2) Institut de Recherche Biomédicale de Armées, Bretigny-sur-Orge, France

En préparation

Réponse du système IGF central et périphérique suite au traumatisme crânien et en relation avec le stress

Le système IGF (IGF1 et IGF2) central et périphérique est impliqué dans le TC et l'ESPT, et a été proposé comme marqueur du TC. Dans la perspective d'une recherche de marqueurs de la vulnérabilité psychiatrique post-TC, la réponse IGF a été évaluée à court et long terme post-TC (3 jours et 3 semaines), et en lien avec le stress du conditionnement de la peur.

À 3 semaines post-TC, les niveaux d'IGF1, évalués par ELISA, augmentaient dans le cortex pariétal ipsilatéral des souris sham et TC, et massivement dans l'hippocampe ipsilatéral des TC. La densité du marquage IGF2 en immunohistochimie n'était pas altérée, mais il subissait une réorganisation massive : situé dans les structures de type vésiculaires chez les animaux naïfs et sham, des fibres IGF2-positives irradiaient du ventricule chez les souris TC. En périphérie, l'IGF1, mais pas l'IGF2, était diminué dans le plasma des souris TC.

À 3 jours post-TC, l'IGF1 augmentait massivement dans le cortex pariétal ipsilatéral des animaux TC, modérément dans l'hippocampe ipsilatéral, et légèrement dans le cortex pariétal controlatéral. Chez les animaux sham, IGF1 augmentait dans ces régions autant ou plus que chez les souris TC, ainsi que dans l'hippocampe controlatéral, l'amygdale ipsilatérale, et le CPF. L'IGF2 était réorganisé comme précédemment, mais, cette fois-ci, sa densité était augmentée chez les souris TC. De manière surprenante, dans le plasma, IGF1 et IGF2 n'étaient pas altérés.

Suite au conditionnement de la peur seul, ou suivi de l'extinction de la peur 24 h plus tard, les niveaux périphériques d'IGF1 étaient diminués, sans effet sur ses niveaux centraux ou ceux d'IGF2. Chez les animaux exposés au TC puis au conditionnement et à l'extinction de la peur 3 semaines plus tard, nos marqueurs présentaient les mêmes altérations qu'à 3 semaines post-TC seul. Cependant, suite à ce « double coup », IGF2 était significativement diminué. Dans cette cohorte, l'expression d'Igf1 était augmentée dans le cortex pariétal et l'hippocampe ipsilatéral des souris TC, mais la méthylation du promoteur d'Igf1 n'augmentait que dans leur hippocampe.

Le système IGF central répond donc fortement et de façon durable après le TC, mais l'IGF périphérique ne semble pas être un marqueur optimal : IGF1 n'est pas affecté

à court-terme post-TC et diminue aussi en réponse à un stress comportemental, et IGF2 ne diminue qu'avec le « double coup » stress + TC.

Abstract

Traumatic brain injury (TBI) is a vulnerability factor for psychiatric disorders, particularly post-traumatic stress disorder (PTSD). The insulin-like growth factor (IGF) system was proposed as a biological marker of TBI and, by extension, psychiatric vulnerability. We induced a mild focal TBI by controlled cortical impact in male C57BL/6J mice and evaluated short- and long-term (3 days vs 3 weeks) changes in central IGF1 and IGF2 by ELISA and immunohistochemistry, respectively, as well as plasma IGF1 and IGF2 by ELISA. We also evaluated the effect of fear conditioning and extinction on these parameters as well as the interaction between TBI and fear conditioning. In the long-term, IGF1 levels increased in the ipsilateral parietal cortex and hippocampus with TBI, but only in the ipsilateral parietal cortex with sham. In the short-term, IGF1 increased in these same regions as well as in the contralateral parietal cortex in TBI animals. Surprisingly, sham animals displayed stronger IGF1 increases than TBI animals as well as additional ones in the ipsilateral amygdala and prefrontal cortex. By contrast, IGF2 staining in the lateral ventricle only displayed increased density in TBI animals on the short-term. However, on both the short- and long-term, IGF2 staining was massively reorganized from speck-like structures in naïve and sham animals to fiber-like structures in TBI animals. Plasma IGF1 decreased in TBI animals only on the long-term, while IGF2 was never affected. Fear conditioning and/or subsequent extinction only decreased plasma IGF1, not central IGF1. When these procedures were done 3 weeks post-TBI, the same changes were observed as with TBI alone, with the addition of a decrease in plasma IGF2. In these animals, methylation analysis revealed increased methylation at the IGF1 promoter in the hippocampus only. These results show that the IGF system may not be an ideal marker of TBI-induced psychiatric vulnerability as it is not affected on the short-term and responds similarly to stress alone in the plasma.

1. Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is a major health concern. It affects millions of people every year and is the leading cause of death and disability for young adults in Europe (www.center-tbi.eu, 2019). Mild TBI (mTBI) constitutes the vast majority of all TBIs, and, is increasingly considered as a risk factor for psychiatric disorders. In addition to cognitive deficits, mTBI may cause symptoms of anxiety and depression. Although most victims speedily recover, a non-trivial subset retains symptoms, developing a chronic

form of mTBI (Cole and Bailie, 2016). In addition, psychiatric symptoms in general are persistent and prevalent following mTBI, with anxiety disorders being the most frequent (Vaishnavi et al., 2009). Of those, post-traumatic stress disorder (PTSD) seems to be the most common, with military studies suggesting that the risk for this disorder is multiplied by 3 in soldiers with mTBI (Bryant, 2011). Soldiers exposed to mTBI display altered fear behaviour in the fear-conditioning paradigm (Glenn et al., 2017), although this may concern only a subset of patients that develop the chronic form of mTBI (Ragsdale et al., 2018). mTBI recovery very often occurs in the context of subsequent exposure to stressful events (e.g. military combat, domestic violence ; Vasterling et al., 2018).

Progressing white matter degeneration is predictive of persisting post-traumatic symptoms in patients with mTBI (Yin et al., 2019). Human and animal studies have also demonstrated chronic neurodegeneration in the grey matter following TBI, especially in the hippocampus, the amygdala and the frontal cortex, regions known to be involved in fear memory (Meyer et al., 2012; Tomaiuolo et al., 2012). Although most brain damage occur at the moment of the traumatic insult, a chronic state of neuroinflammation may persist, furthering lesions through microglial activation (Ramlackhansingh et al., 2011). This happens while the brain is attempting to limit and repair damage to the gray and white matters, by promoting neural stem cell proliferation (Gao and Chen, 2013), oligodendrogenesis (Butovsky et al., 2006b) and release of trophic factors. As such, the balance between post-traumatic neurodegenerative and neurorepair processes dictates neurobiological outcomes and, therefore, psychiatric vulnerability. In this context, we wished to determine if the Insulin-like Growth Factor (IGF) system could be used as a marker of mild brain injury.

IGF is one of many neurotrophic systems associated with brain tissue preservation and neurorepair following a brain insult (Scheepens et al., 2000), and may play a crucial role especially in the context of TBI and the development of post-traumatic anxiety disorders. The IGF system is composed of two hormones, IGF1 and IGF2. The main source of IGF1 is the liver, and it can penetrate into the brain in a synaptic activity dependant manner to promote neuronal proliferation and myelination (Lichtenwalner et al., 2001; Ye et al., 2002). IGF1 is also produced by all major cell types in the brain. The cerebral production of IGF1 seems to be independent of growth hormone regulation, unlike its peripheral production (Gubbi et al., 2018). By contrast, the main sources of IGF2 are the choroid plexus of the ventricles and the meninges (Ayer-le Lievre et al., 1991; Logan et

al., 1994). IGF2 is involved in local genesis and maturation of synapses, and can also modulate hippocampal neurogenesis (Bracko et al., 2012; Schmeisser et al., 2012). Animal studies have demonstrated that synthesis of brain IGF1 is upregulated following TBI, most probably in an effort to locally repair lesions (Madathil et al., 2017; Santi et al., 2018a). Conflicting results regarding the effect of TBI on blood IGF1 level have also been reported (Santi et al., 2018a; Wildburger et al., 2001). However, it is generally accepted that TBI causes hypopituitarism, which is associated with deficits in peripheral IGF1 levels (Giuliano et al., 2017). Alterations in gene expression as well as epigenetic changes, such as DNA methylation, could underlie the effects of TBI on brain IGF1 levels (Schober et al., 2012b). Decreased peripheral IGF1 levels could also reflect central changes, as Santi et al (2018) recently suggested that there may be a central uptake of peripheral IGF1 following TBI, and therefore, peripheral IGF1 could be used to infer the level of neurorepair at the lesion site (Santi et al., 2018a). Although its role has been largely neglected so far, IGF2 might also be important in the context of TBI. The production of IGF2 is increased following a penetrating brain injury (Walter et al., 1999). As both IGF1 and IGF2 may be key mediators of brain healing, the level of activation of the IGF system could be a marker of acute and ongoing posttraumatic processes. Assessing this system could thus be beneficial for individuals who were exposed to mTBI.

PTSD shares pathophysiological commonalities with TBI, especially chronic alterations in neurotrophic systems (Kaplan et al., 2010). Interestingly, the IGF system is involved in fear and anxiety behaviours and its regulation was proposed to alleviate PTSD-like symptoms (Alani et al., 2013; Burgdorf et al., 2017). In addition, blood IGF1 levels seem to predict the risk of developing depression in brain injured victims (Sung et al., 2016), and are correlated with symptom improvement in PTSD (Rusch et al., 2015). It has also been reported that peripheral IGF1 may be sensitive to adverse life events, its levels negatively correlating with anxiety-like behaviour in rodents (Santi et al., 2018b). Alterations in the IGF system could therefore represent a diagnostic and a recovery progression marker not only of TBI, but also of psychological trauma.

We recently demonstrated that mice exposed to mTBI, using the controlled cortical impact technique (CCI), acquire fear conditioning and extinction normally, but display a spontaneous resurgence of fear when tested for fear extinction recall 6 weeks later (Corne et al., 2019). This occurs together with alterations in brain white matter integrity and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) expression, which are

detectable as early as 3 weeks post-TBI (Corne et al., 2019). In the present work, we used the same animal model to determine how the IGF system is impacted by mTBI and if IGF1 and IGF2 could be used as specific biomarkers of mTBI (acute and/or chronic). To assess the specificity of these putative biomarkers of mTBI, we also investigated the effect of a single exposure to a stressful event on the IGF system. Finally, we investigated the effect of combining both factors, since we previously showed that stressful conditions can aggravate TBI deficits (Ogier et al., 2017). We evaluated the status of the IGF system (IGF1 and IGF2) on the short- (3 days) and the long-term (3 weeks) following mTBI.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

The experiments were conducted and the animals cared for according to the ARRIVE guidelines. The experimental procedures were validated by the Animal Ethics Committee of Paris Descartes' University, and were in accordance with the French regulations, and the European Union Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EEC) on the protection of animals for experimental use (APAFiS#21165). Procedures were in conformity with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health (publication 85-23, revised 1996).

2.2 Animals

Two-month-old male C57BL/6J mice from Janvier Labs (Le Genet St Isle, France) were housed under temperature and light controlled conditions with access to food and water *ad libitum*. They were habituated to the animal facility conditions for one week before being subjected to any experimental procedure.

2.3. Experimental design

Four sets of experiments were performed; each designed to answer specific questions (supplemental figure 1).

Experiment 1: We asked whether mTBI can result in chronic dysfunction of the IGF system in the blood and brain compartments. A 3-week time point was chosen based on previous work from our laboratory showing alterations in the expression of BDNF at this stage in the same mTBI model used here (Corne et al., 2019). Mice were randomly

assigned to one of the following experimental groups: naive, sham and TBI. Animals were subjected to sham surgery (craniotomy without impact) or TBI (trauma induced by the CCI procedure; see below). Three weeks after the surgery (or an equivalent amount of time for naive animals), mice were sacrificed and their cardiac blood, liver and brain were collected. IGF1 and IGF2 protein levels were measured in plasma samples using ELISA. IGF1 protein levels were measured in selected micro-dissected brain regions using ELISA, whereas IGF2 protein density and distribution were quantified in brain sections using immunohistochemistry. We could not measure IGF2 levels within brain areas using ELISA due to its low level of expression. IGF1 gene expression was measured from brain and liver samples using RT-qPCR.

Experiment 2: Here, we asked whether mTBI can result in acute dysfunction of the IGF system. A 3-day time point was chosen because mice generally have recovered full motor function and normal weight at this stage following mTBI. Mice were randomly assigned to one of the following experimental groups: naive, sham and TBI. Three days after surgery (or an equivalent amount of time for naive animals), mice were sacrificed and their cardiac blood, liver and brain were collected. The parameters analysed were as described for experiment 1.

Experiment 3: We asked whether exposure to a traumatic-like stress influences blood and brain IGF1 and IGF2 levels. Mice were randomly assigned to one of the following experimental groups: naive animals subjected to a fear conditioning procedure (FC) or subjected to FC followed by a fear memory extinction procedure (FC+Ext). The animals were exposed to those conditions at an age equivalent to mTBI/surgery + 3 weeks, as we wanted to explore the effect of stress exposure at a stage equivalent to the chronic phase post-mTBI. Three hours after FC or FC+Ext, the mice were sacrificed and their cardiac blood, liver and brain were collected. Subsequent tissue analyses were as described for experiment 1.

Experiment 4: In this final experiment, in conditions of a traumatic-like stress (fear conditioning followed by conditioned cue re-exposure on the next day), we asked whether blood and brain IGF1 and IGF2 levels are altered in sham and mTBI mice at the 3-week time point (chronic phase post-mTBI), and whether post-traumatic alterations in brain IGF1 level are due to epigenetic modifications. For epigenetic studies, we focused on IGF1 because its expression can be measured in numerous brain regions, unlike that of IGF2, which is limited to the ventricles and the meninges. Mice were randomly assigned

to one of the following experimental groups: naive, sham and TBI, and were all exposed to FC+Ext at 3 weeks post mTBI/surgery, or an equivalent age for naive mice. Three hours after exposure to FC+Ext, mice were sacrificed and their cardiac blood and brain were collected. Three sets of experiments were run: a first set to determine the effect of the experimental conditions on IGF1 and IGF2 concentrations (plasma and brain tissues/ELISA), a second one, to determine to what extent the different treatments affect the expression of the gene encoding IGF1 (brain and liver tissues/RT-qPCR), and a third one, to determine whether the treatments alter the epigenetic properties of the *Igf1* gene (brain tissues/MeDIP) and the expression of associated genes (Methyl CpG-binding protein 2; MeCP2 and DNA methyltransferases).

2.2 Controlled cortical impact

The whole surgical procedure was performed under isoflurane anaesthesia (induction 3% and maintenance 1.5%). Mice weighing 28-30g were placed in a stereotaxic frame. A 4 mm craniotomy was performed slightly rostral to lambda, above the left parietal cortex, taking care not to damage the dura mater. The impact was delivered on the surface of the brain using a pneumatically controlled device (TBI 0310 Impactor, Precision System Instruments, USA) with the following parameters: 3.5 m/s speed, 1 mm depth, and 50 ms dwell time. Note that these parameters do not produce major neurological deficits and are considered mild by literature standards (Washington et al., 2012). A bone wax skullcap was placed over the bone surrounding the craniotomy before the skin was sown shut. Sham mice underwent the same procedure with the exception of the impact. Mice were left to recover at 28°C for one hour before being returned to their home cage.

2.3 Fear conditioning and extinction procedures

Mice were exposed to the cue fear conditioning (FC) and the cue fear memory extinction (Ext) procedures at 3 weeks post-surgery or an equivalent period for naive mice (Supplemental figure 1). On day 1, mice were exposed to the FC procedure. They were placed in a lit cage (19 × 22 cm, height 13 cm, 50 lux), which floor was equipped with an electrifiable grid. The context was defined by a vanilla odour (0.1% in 75% ethanol). After a period of habituation, a loudspeaker located inside the cage exposed mice to a tone (2.5 kHz, 85 dB), the conditioned stimulus (CS), immediately followed by a footshock (2 s; 0.5 mA), the unconditioned stimulus (US). This sequence was repeated 6 times with an

inter-trial interval (ITI) of 2 min. Mice were then returned to their home cage. The fear response, behaviourally expressed as the percent time spent freezing (total immobility except respiration) was sampled every two seconds by an observer blind to treatment.

For the Ext procedure, on day 2, mice were re-exposed to the CS alone in a novel, dark and odourless context (Plexiglas cage; 15 × 21 cm, height 13 cm). The session consisted of 40 CS exposures (30 s, 5 s ITI) that generate a fear response as well as by a partial fear extinction. It will subsequently be referred to as “conditioned cue re-exposure”. Freezing was quantified automatically using an infrared video tracking software (Viewpoint, France).

2.4 Sacrifice and sample collection

Mice were deeply anesthetised with pentobarbital (110 mg/kg; i.p.), then, 500µL of blood was collected from the inferior vena cava. Immediately after blood collection, mice were perfused through the left ventricle (0.9% NaCl for 5 min at 100 mmHg). A liver sample from the left lateral lobe and the entire brain were collected, and immediately frozen at -35°C in isopentane.

Plasma was extracted from blood samples within 10 minutes of collection by centrifugation (1300 x g, 10 min, 4°C). Plasma samples were stored at -80°C until ELISA was performed.

Thirty-five microns-thick coronal brain sections were cut using a cryostat (Jung CM 3000 Leica Microsystems). Sections containing the lateral ventricle were cut at -0.5 mm to 0 mm from Bregma and directly collected onto gelatin-coated glass slides. These sections were stored at -80°C before being used for *in situ* immunohistochemical detection of IGF2 protein. Sections containing the prefrontal cortex (including the infralimbic and prelimbic regions only), the parietal cortex, the hippocampus, and the amygdala were collected on a steel plate cooled to -20°C. The regions of interest were then punched with a 2.5mm diameter steel needle, and placed in Eppendorf tubes. For ELISA measurements, brain tissues were homogenized using sterile polypropylene pestles in 15 volumes of phosphate buffered-saline solution (0.1M PBS, pH 7.4; 15µL/mg of tissue), frozen and thawed twice in liquid nitrogen, centrifuged (12,000 x g, 20 min, 4°C), and then, the supernatant was collected and stored at -80°C until ELISA was performed. For expression studies (RT-qPCR), brain and liver tissues were homogenized

in Trizol reagent (Fisher Scientifics, France). RNA was extracted in Trizol using the procedure provided by the manufacturer (see full procedure below).

2.5 ELISA

IGF1 protein levels in plasma and brain were determined using the Mouse/rat IGF1 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems). ELISA was performed using 50 μ L of pure protein samples. Because circulating IGF1 levels are relatively high, plasma samples were diluted 1/500 in a reagent provided by the manufacturer before ELISA was performed. Fifty microliters of diluted plasma samples were used for quantitation of circulating IGF1. IGF1 concentration was determined using a standard curve run in parallel with samples, and was expressed relative to the initial mass of tissue (pg/mg tissue) or the volume of plasma used (ng/mL).

IGF2 concentration in plasma samples was determined using the Mouse/Rat/Porcine/Canine IGF-II/IGF2 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems). ELISA was run using 50 μ L of 1/40 diluted plasma samples. Plasma IGF2 concentration was determined using a standard curve run in parallel with the samples, and expressed relative to the volume of plasma (ng/mL). Brain IGF2 concentration was too low to be assessed using this technique/detection kit.

2.6 Immunohistochemistry and image analysis

Brain sections were left to dry for 15 minutes at room temperature. Then, they were post-fixed in 1:1 ethanol/acetone for 15 minutes at room temperature and rinsed with phosphate buffer (PBS 0.1M; 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, pH=7.4). A blocking solution (5% goat serum and 0.25% Triton X-100 in PBS) was applied for 90 minutes before incubating the sections overnight at 4°C in the primary antibody solution: 1/200 rabbit anti-mouse IGF2 (ab63984, Abcam), 1% goat serum, 0.25% Triton X-100, in PBS. The following day, sections were rinsed in PBS-0.1% Tween 20 and incubated for 2 hours at room temperature in the secondary antibody solution: 1/1000 goat anti-rabbit IgG coupled to Alexafluor 555 (Abcam, France), 1% goat serum, 0.25% Triton X-100, in PBS. Then, sections were rinsed in PBS and incubated for 2 minutes in a 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) containing solution (0.1 μ g/ μ L) before being mounted under glass microslides in Mowiol (Sigma Aldrich). Sections were digitized at a 40x magnification using a fluorescence microscope (Zeiss).

IGF2 staining density was evaluated using the Image J software within the epithelial layer defined with DAPI co-staining. Between 5 to 10 sections were analysed per animal. The percentage of sections containing IGF2-immunopositive fibers was evaluated for each animal. Results were averaged for each experimental group.

2.7 Quantitative RT-PCR

RNA concentration and purity was evaluated with a Nanodrop One spectrophotometer (Thermofisher, France). 500 ng of total RNA were reverse-transcribed into cDNA with the High Capacity cDNA Reverse transcription Kit (Thermofisher, France). Quantitative real-time PCR was performed using KAPA SYBR Fast ABI PRISM (Clinisciences, France) on a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, France) with the following cycling parameters: 95°C – 3 min (1 cycle); 95°C – 15s, 60°C – 30s, 72°C – 30s (40 cycles). Expression levels of selected cDNAs (see list of cDNAs and primers used in Supplemental Table 1) were calculated according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Schmittgen and Livak, 2008) after normalization to GAPDH-cDNA level.

2.8 MeDIP

Total tissue DNA was extracted with the Nucleospin Tissue Kit (Macharey Nagel, France). Then, it was sheared into 400 bp fragments with a Bioruptor Plus (Diagenode, France) and methylated DNA levels were estimated after methylated DNA immunoprecipitation using a MagMeDIP Kit (Diagenode, France) according to manufacturer's instructions. Briefly, 1 μ g of DNA was incubated in the presence of antibodies targeting methylated sites and tagged with magnetic beads, in a reaction reagent provided by the manufacturer (overnight at 4°C on a rotating wheel). Antibodies were then recovered using a magnetic plate, rinsed several times, and separated from the methylated DNA by proteinase K digestion. After centrifugation, the supernatant containing methylated DNA was collected and directly used for qPCR quantification. The primers were chosen to target different loci upstream of the *Igf1* transcription start site. The primers were designed to target the following regions relative to the transcription start site: locus 1 from -264 to +11, locus 2 from -442 to -343, and locus 3 from -363 to -127. The level of DNA methylation was estimated by comparison to the reference sample (that did not follow the immunoprecipitation procedure) using an equation provided by the manufacturer: % DNA methylation = $2^{[(Ct(\text{reference sample}) - 3.32) - Ct(\text{immunoprecipitated sample})]} \times$

100%. Because this method does not give an absolute measure of DNA methylation, we chose to express the results relative to the naive mice group.

2.9. Statistical analyses

All statistical analyses and graphs were performed with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Behavioral data of the fear conditioning and cue re-exposure sessions were analysed with a two-way ANOVA for repeated measures followed by the Bonferroni test. IGF1 and IGF2 data were analysed by one-way ANOVA followed by Neuwman-Keuls test, with the exception of the percentage of IGF2-positive fibers. Because these data have a non-parametric distribution, they were analysed with a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparisons test. Methylation data was analysed by two-way ANOVA followed by Bonferroni test.

3. Results

3.1 Blood and brain IGF1 and IGF2 systems are altered 3 weeks after a single mTBI

Many researchers and clinicians call for novel biomarkers to better assess mTBI, in addition to those studied and tested so far (Buonora et al., 2015). Therefore, we investigated the status of the IGF system at 3 weeks post-mTBI, in view of our previous studies showing decreased cortical BDNF at this particular time point (Corne et al., 2019). The brain regions investigated here were chosen because they are either close to the traumatic impact site and/or involved in the cerebral circuitry of fear memory, shown disrupted on the long-term in our experimental model of mTBI (Corne et al., 2019).

Plasma IGF1, but not IGF2, levels were significantly decreased in mTBI mice compared to both sham and naive mice (-9%, $p < 0.05$, Figure 1A, B). This was not associated with an alteration in the expression level of the *Igf1* gene in the liver, the main source of peripheral IGF1 (Supplemental Table 2). In parallel, brain IGF1 tissue content was altered, although this was restricted to regions located in the vicinity of the injury site. TBI produced a moderate increase in the parietal cortex ipsilateral to the impact site (+113% relative to naïve, $p < 0.001$; Figure 1E), as well as a massive increase in the ipsilateral hippocampus (+650% and 450% relative to sham and naïve mice, respectively, $p < 0.001$; Figure 1F). The cortical increase in IGF1 content was not specific to TBI, since

it was also observed in sham animals (+65% relative to naïve mice, $p < 0.05$, Figure 1E). In more distant regions such as the prefrontal cortex, ipsilateral amygdala (Figure 1C, D), contralateral parietal cortex and contralateral hippocampus (Figure 1H and 1I, respectively), mTBI did not significantly affect IGF1 tissue content.

Although plasma IGF2 level did not seem to be altered, we asked whether brain IGF2 levels/distribution was altered at this time point after TBI. In the epithelium of the ipsilateral lateral ventricle, IGF2 immunostaining was mostly localised within speck-like cellular compartments, in both naive and sham animals (Figure 1J, left panel). By contrast, exposure to mTBI was associated with massive reorganisation of the IGF2 staining in both the ipsi- and contralateral sides: it was more diffuse in the epithelial layer and was present in fibre-like structures (Figure 1J, right panel). TBI animals displayed IGF2-positive fibers in most brain sections (62%), while sham (19%) and naive (6%) animals mostly did not (Figure 1K). The overall intensity of the IGF2 staining measured by optical density within the ipsilateral epithelial layer of the ventricle, as structurally defined with nuclear DAPI staining, was not altered after TBI (naive = 932 ± 95 ; sham = 845 ± 129 ; TBI = 1065 ± 194 A.U.).

3.2 Blood and brain IGF1 and IGF2 systems are altered 3 days after a single mTBI

To assess whether blood IGF1 and IGF2 levels could be used as diagnostic markers of mTBI, we measured all the above-mentioned parameters in the acute phase (3 days) post-mTBI.

In contrast with what we had measured at 3 weeks post-mTBI (Figure 1A), there was no change in blood IGF1 level at this early time point (Figure 2A). Liver *Igf1* gene expression level was not affected either (Supplemental Table 2). Nonetheless, brain IGF1 tissue content was increased in specific brain regions in mTBI mice (Figure 2 E-G). IGF1 tissue content in mTBI mice was still not altered in the most distal regions from the impact site, i.e. the prefrontal cortex and the ipsilateral and contralateral amygdala (Figures 2C, 2D and data not shown). It was not affected in the contralateral hippocampus either (Figure 2H). By contrast, in the vicinity of the primary injury, i.e. in the ipsilateral parietal cortex and hippocampus, IGF1 tissue content was increased in mTBI animals relative to naive animals (+325 and +99%, respectively, $p < 0.001$; Figures 2E and 2G). In addition, at 3 days post-surgery, IGF1 tissue content was increased in the contralateral

parietal cortex (+22% relative to naïve, $p < 0.01$; Figure 2F). However, these alterations were not specific to mTBI, as they were also measured in sham animals (+587, +32% and +181%, $p < 0.01$; Figure 2E-G). In fact, and surprisingly, IGF1 tissue content was more increased in these brain regions in sham animals than in mice exposed to mTBI (Figure 2E and 2G; $p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively). Moreover, sham mice displayed an increase in IGF1 content: the prefrontal cortex, ipsilateral amygdala, and the contralateral hippocampus (prefrontal cortex: +24% relative to naïve, $p < 0.01$, Figure 2C; ipsilateral amygdala: +34% relative to naïve, $p < 0.01$, Figure 2D; contralateral hippocampus : +20% relative to naïve and +9% relative to TBI, $p < 0.01$, Figure 2H).

Plasma IGF2 level was not altered by any treatment (Figure 2B), as already observed at the later time point (Figure 1B). Nonetheless, *in situ* redistribution of IGF2 immunostaining was already present in the ipsilateral lateral ventricle region (Figure 2I), as previously described for the 3-week time point (Figure 1K). The redistribution here was specific to the mTBI group and absent in sham animals (Figure 2I). At 3 days post-mTBI, unlike 3 weeks, IGF2 redistribution was associated with an increase in overall intensity of the IGF2 staining measured by optical density within the ipsilateral epithelial layer of the ventricle (+30%, relative to sham and naïve, $p < 0.05$; Figure 2J).

3.3 Reactivity of the IGF system to an acute traumatic-like stress exposure

Victims of brain trauma are often exposed to additional psycho-traumatic stress. This is particularly true for soldiers (Yurgil et al., 2014), we therefore wished to extensively investigate the IGF system in this particular context.

Exposure to traumatic-like stress, i.e. fear conditioning training alone or exposure to a conditioned cue reexposure on the next day, produced a significant decrease in plasma IGF1 concentration relative to age-matched unexposed animals (-11% and -9% respectively, $p < 0.05$, Figure 3A). This was not associated with any alteration in the expression level of the *Igf1* gene in the liver (Supplemental Table 2). On the other hand, exposure to fear conditioning or to the fear-conditioned tone alone, in absence of mTBI, did not affect tissue IGF1 levels in the fear circuitry (prefrontal cortex, amygdala, hippocampus; supplemental Figure 2). Thus, a single exposure to traumatic-like stress can decrease blood IGF1 concentration in animals naïve to any other treatment, without disturbing IGF1 content in these brain areas.

Plasma IGF2 concentration was not affected by exposure to traumatic-like stress, neither by exposure to conditioning alone, nor by exposure to conditioning and subsequent cue reexposure (Figure 3B). Because brain IGF1 was not altered, we did not assess IGF2 distribution within the lateral ventricle region of stressed animals. It is likely that stress exposure alone did not affect this parameter (see section 3.4).

3.4 Reactivity of the IGF system to mTBI in the context of an acute traumatic-like stress exposure

In view of the pronounced alterations in plasma IGF1 concentration, hippocampal IGF1 content and ventricular IGF2 immunostaining previously reported in the chronic post-trauma stage, as well as the effect of stress exposure on blood IGF1 concentration, we decided to measure the status of blood and brain IGF1 and IGF2 systems after exposure to a traumatic-like stress (fear conditioning and cue re-exposure procedures) in mice exposed to mTBI 3 weeks earlier (Figure 3A, 3B). The question we asked was whether the effects of mTBI on the IGF system are influenced by acute stress exposure.

Plasma IGF1 concentration was still significantly decreased in mTBI mice exposed to stress but not in sham animals (-11% relative to sham, $p < 0.05$; Figure 3C). Although exposure to traumatic-like stress is known to impact cerebral fear circuitry, no change in IGF1 tissue content was found in the prefrontal cortex (Figure 3E) or the ipsilateral amygdala (Figures 3F; nor on the contralateral side, naïve = 1.38 ± 0.08 ; sham = 1.4 ± 0.05 ; TBI = 1.41 ± 0.08 pg/mg of tissue) in mTBI mice exposed to stress. The increase in IGF1 content within the ipsilateral parietal cortex and hippocampus initially observed in mTBI animals was still present after exposure to stress (parietal cortex: +32% relative naïve mice, $p < 0.01$; hippocampus: >+300%, relative to sham and naïve mice, $p < 0.001$; Figures 3G and 3H, respectively). As described with exposure to mTBI alone, the combined treatment did not affect IGF1 content within the contralateral parietal cortex, nor did stress exposure change the profile of sham mice. As expected, and in accordance with our preliminary analyses performed in unstressed mice, we found an increase in IGF1 content within the ipsilateral cortex of sham animals (+34%, relative to naïve mice, $p < 0.01$; Figure 3G), once again showing that this phenomenon is not specific to mTBI exposure.

Unexpectedly, plasma IGF2 concentration was decreased in mTBI animals exposed to stress (Figure 3D), although it was not after exposure to the either mTBI or

stress alone (Figures 1B and 3B). Therefore, reactivity of the IGF2 system to stress seems to be altered in animals pre-exposed to mTBI. However, when we investigated the reactivity of the IGF2 system within the brain under mTBI, the distribution of IGF2-positive cellular elements in the epithelium of the ipsilateral lateral ventricle (Figure 3I and 3J), displayed the same reorganization described earlier under mTBI exposure alone (Figures 1J and 1K). IGF2-positive fibers were rarely present in sham and naïve animals exposed to stress (below 5%), fibre staining was observed more often than not in traumatized mice exposed to stress (72% of sections, $p < 0.01$ relative to naïve and sham, Figure 3I). As described in mice exposed to mTBI alone, global density of IGF2 immunostaining within the epithelial layer of the ipsilateral lateral ventricle was not altered in mTBI mice subsequently exposed to stress (naïve = 652 ± 87 ; sham = 521 ± 99 ; TBI = 465 ± 126 ; Figure 3J).

Because the traumatic-like stress could trigger on the very long term PTSD-like symptoms in mice exposed to mTBI (Corne et al., 2019), and because our data suggest that the IGF2 system reacts differently to stress exposure in mice exposed to mTBI, we measured anxiety-like traits (freezing behaviour) in co-exposed mice. As expected from our previous study (Corne et al., 2019), freezing response during the fear conditioning acquisition (day 1) and during conditioned cue re-exposure (day 2) were not affected 3 weeks post-mTBI (supplemental Figure 3).

3.5 Epigenetic and transcriptional alterations of the *Igf1* gene after exposure to mTBI and a traumatic-like stress

To determine molecular mechanisms by which mTBI affects brain IGF1 content, we assessed the level of expression and the degree of methylation of the *Igf1* gene (Figure 4). We studied these two parameters in the two brain regions where IGF1 protein content was consistently increased in mTBI-exposed mice, the parietal cortex and hippocampus, whether they were subsequently exposed to traumatic-like stress or not.

In line with our findings at the protein level, we found that total *Igf1* mRNA levels were sharply increased in both the ipsilateral parietal cortex and hippocampus of mTBI animals (around +220%, relative to sham and naïve, $p < 0.001$; Figure 4A and 4B). Intriguingly, *Igf1* mRNA level was not altered in the ipsilateral parietal cortex in sham animals (Figure 4A), even though IGF1 protein content was increased (Figure 3F). The increased IGF1 protein content measured in sham animals in the parietal cortex is thus

probably not related to a change in its gene expression, but rather to local protein sequestration or enhanced local release from afferent brain regions.

To explore this *Igf1* expression increase, we assessed the methylation status at various loci of the *Igf1* gene promoter region in cortical and hippocampal samples (Figures 4C and 4D). We found no change in the methylation status of the *Igf1* promoter in the parietal cortex (Figure 4C). In the ipsilateral hippocampus, however, there were significant effects of Treatment [$F(2, 78) = 3.9, P < 0.05$], of Locus [$F(2, 78) = 28.4, P < 0.001$] and a significant interaction between factors [$F(4, 78) = 2.8, P < 0.05$]. The Mann-Whitney post-hoc test showed that TBI animals displayed an increase in *Igf1* promoter methylation at the third methylation locus, relative to naive animals (Figure 4D). This did not hold true for sham animals (Figure 4D). Therefore, our data suggest that increased IGF1 expression may be supported by alteration in the epigenetic/methylation state of its gene, although, it seems to be a tissue-specific process, only present in the hippocampus. These data are to be interpreted cautiously, as it cannot be excluded that the methylation state of other loci in the *Igf1* gene is modified by mTBI or sham surgery.

Finally, we assessed if changes in *Igf1* methylation status in the ipsilateral hippocampus could result from an alteration in the expression of the gene encoding MeCP2, which is a potent modulator of gene expression binding to methylated-CpG islands, or of the expression of various DNA methyltransferases, DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 (DNMT1) and DNMT3A. We found no change in the expression level of any of these genes in sham or mTBI mice (Figure 4E).

4. Discussion

Inflammatory, neuronal, and glial peripheral markers have often been proposed to assess mTBI following accidents occurring, for example, during sporting events or military combat. None have yet emerged as the golden standard to detect and monitor post-traumatic changes in brain function. Hence, it is still necessary to investigate other types of markers. Neurotrophic factors, in particular IGF1 and IGF2, seem to be crucial for post-traumatic brain protection and repair, and, therefore, could potentially be used as biomarkers of brain integrity and healing. Hence, we investigated whether recovery from a mild TBI is reflected by changes in brain and circulating IGF1, which is mainly produced by the liver, and IGF2, which is mainly produced by the brain. To test the specificity of these markers with regard to mTBI, we also assessed whether a traumatic-like stress

would impact the IGF system, independently of any physical brain trauma, and whether this kind of stress is susceptible to interfere with TBI-induced changes in IGF1 and IGF2.

In accordance with most previously published data, we found that blood IGF1 level is decreased a few weeks after mTBI, while its brain level is increased (Santi et al., 2018a; Sung et al., 2016). Decreased peripheral IGF1 may be associated with cerebral uptake of peripheral IGF1 following TBI, to support cerebral neurorepair at the lesion site, as it has been suggested previously (Santi et al., 2018a). Brain alterations were primarily located in the parietal cortex and the hippocampus, which are the two closest brain regions from the traumatic impact site. We could not measure any alteration in IGF1 level in any other distant brain region following mTBI. In fact, the only alteration specific to mTBI was located in the hippocampus. Hence, unlike many other studies, we included two control groups in our experiments, a naive group and a sham-operated group, and our results suggest that craniotomy, which is an important step of the CCI procedure, can by itself trigger a long-term increase in parietal cortex IGF1 level. This is an important finding, as most of the work done on the topic so far has focused on the differences measured between sham-operated and TBI-exposed animals. These craniotomy-induced changes in brain physiology were even more pronounced at 3 days post-surgery, as IGF1 level were altered in the sham group of most brain regions investigated. More surprising yet, IGF1 tissue content changed to a greater extent in sham animals than those exposed to mTBI. This phenomenon might reflect the complex relationship between brain inflammation and the activity of the IGF1 system. Indeed, IGF1 secretion from activated microglial cells is known to be inhibited by cytokines (Cao et al., 2003; Fan et al., 1996; Suh et al., 2013) , and in the CCI trauma model, 3 days after surgery, cytokines are less increased in the sham craniotomy compared to the TBI groups of animals (Lagraoui et al., 2012; Xu et al., 2017). As a consequence, recovery from a craniotomy alone might boost neurotrophic systems, and support IGF1 synthesis, while a more severe brain lesion would somehow restrain this process.

We were also surprised to observe that blood IGF1 was not altered at 3 days post-mTBI. Although few studies have investigated acute alterations in the IGF system at this early time after trauma, the fact that brain IGF1 levels, but not its blood levels, were increased at this stage may reflect an early endogenous protective mechanism that does not require further support from peripheral IGF1 system. This result suggests that blood IGF1 levels cannot be used as an acute diagnostic marker for mTBI.

It has been estimated that TBI-induced IGF1 decreases frequently found in the blood of patients are the result of the prolonged stress that TBI may cause (Marina et al., 2015). In our experimental conditions, exposure to a traumatic-like stress was associated with a decrease in blood IGF1, independently of any physical brain trauma, which is consistent with previously published data (Piskunov et al., 2016; Santi et al., 2018b). The precise reason for this decrease remains elusive, as the conditioned fear stress did not change *Igf1* mRNA production in the liver, and we failed to observe any change in brain IGF1 content in stressed mice. An independent study using a predator stress model of PTSD recently reported a decrease with stress, but a small recovery of brain IGF1 content following fear extinction, relative to the conditioned fear stress condition alone (Ogundele et al., 2017). Thus, it is possible that the impact of stress exposure on the IGF1 system may depend on the extent of fear extinction. In addition, it cannot be excluded that the IGF1 tissue content is modified in our experimental stress conditions, in other brain regions or organs (such as the adrenals). Our results show that although stress by itself can alter blood IGF1 levels, it does not interfere with the effects of mTBI on this system. Hence, blood IGF1 levels might not be a specific marker of TBI, but if proper controls are taken into account, it could perhaps discriminate between no-TBI stressed individuals and TBI stressed individuals.

Higher cortical and hippocampal IGF1 content at 3 weeks post-TBI was associated with an increase in *Igf1* gene expression. As an attempt to determine the mechanisms by which such an increase in IGF1 expression occurs, we investigated the epigenetic status of the *IGF1* gene in these two brain regions. We found increased DNA methylation in the *IGF1* promoter in samples collected in the hippocampus, but not in the parietal cortex, of traumatized mice. We did not detect any epigenetic modification of the *Igf1* gene in sham animals. These results suggest that mTBI can leave epigenetic tissue-specific “scars” on the *Igf1* gene. This process is only to be found in brain regions specifically altered by mTBI, but not by craniotomy. Similar results have previously been found (Schober et al., 2012b) reinforcing the idea that the hippocampus is a peculiar region in the context of TBI. Post-traumatic DNA methylation changes were not associated with alterations of MeCP2, DNMT1 or DNMT3 gene expression, the product of which are involved in gene repression and the maintenance of promoter methylation state. The mechanisms by which an enhanced methylated state of the *Igf1* gene influences its expression must further be explored.

Contrary to IGF1, blood IGF2 levels were not altered in the long-term following mTBI, or at 3 days post-mTBI. This was to be expected, since the main locus of IGF2 production is the brain, especially the meninges and choroid plexus. The only modification we were able to measure regarding blood IGF2 level was a decrease after acute traumatic-like stress exposure in TBI mice. We demonstrated that IGF2 cerebral distribution was profoundly altered following mTBI. Indeed, the distribution of IGF2 immunoreactivity was relocated within cellular processes in the lateral ventricle region in most traumatized animals, while it was restricted to vesicle-like structures in naïve animals. Unlike IGF1, brain IGF2 distribution was never altered in the sham group, suggesting that this process is specific to mTBI. This is, to our knowledge, the first time such a remodelling has been described following TBI. This remodelling seems to be part of a chronic process which is triggered relatively early, since it can be detected as soon as 3 days post-mTBI. This is an evolutive process, as there was increased IGF2 immunostaining intensity at 3 days, but not 3 weeks, post-mTBI. This transient increase in IGF2 brain content may, here again, be linked with local inflammatory processes. Indeed, contrary to IGF1, IGF2 secretion is stimulated by cytokines released from activated microglial cells (Cao et al., 2003; Fan et al., 1996; Suh et al., 2013). Given that inflammatory processes are generally more intense in the aftermath of TBI than later on, the early increase in IGF2 measured here could relate to a cytokine hypersecretory state that decreases and disappears over time. The cellular reorganization of IGF2 in the epithelial layer of the lateral ventricles may be due to the transport of the neurotrophin to other brain regions, potentially to the damaged parenchyma, as different studies have reported increased levels of IGF2 within damaged regions of the brain, in the absence of increased local mRNA expression (Giannakopoulou et al., 2000; Walter et al., 1999). IGF2 production has been shown to peak during the early phase (3 to 7 days) post-TBI, concomitantly with that of the IGF-binding protein 2 in the choroid plexus, from where it is synthesized and transported to the injured brain areas (Stylianopoulou et al., 1988; Walter et al., 1999). Taken together, our data warrant more thorough investigations regarding IGF2 in the context of TBI.

The main goal of the present study was to reach conclusions regarding the potential use of plasma IGF1 and IGF2 protein levels in the diagnosis and monitoring of mTBI. Our data indicate that plasma level of IGF1 might be useful to assess recovery from a brain damage, rather than to diagnose one as it is somehow linked with on-going brain

neurotrophic factor processes. However, we showed that exposure to a traumatic-like stress can decrease plasma IGF1, therefore a determination of plasma IGF1 levels alone may lack specificity with regards to TBI. Although altered in the brain compartment, the peripheral IGF2 system does not seem to be sensitive to mTBI, although the level of plasma IGF2 under acute stress seems to be decreased in mice subjected to mTBI. To conclude, blood IGF1 and IGF2 do not seem to be promising biomarkers in the context of TBI except, maybe, if proper control population is used for comparison (i.e. same professional activity) and stress level is co-jointly monitored.

Conflict of Interest Disclosure

The authors have no conflict of interest to declare.

Financial disclosure

This work was supported by a grant from the French Ministry of the Armed Forces (Direction Generale de l'Armement – BioMedef Program), and by the Fondation des Gueules Cassées (www.gueules-casses.asso.fr/).

References

- www.center-tbi.eu (2018). CENTER-TBI Project.
- Alani, B., Maghsoudi, N., Khatibi, A., Nouredini, M., Asefifar, F., and Shams, J. (2013). Study of the variations in apoptotic factors in hippocampus of male rats with posttraumatic stress disorder. *Adv Biomed Res* 2, 42.
- Ayer-le Lievre, C., Ståhlbom, P.A., and Sara, V.R. (1991). Expression of IGF-I and -II mRNA in the brain and craniofacial region of the rat fetus. *Development* 111, 105–115.
- Bracko, O., Singer, T., Aigner, S., Knobloch, M., Winner, B., Ray, J., Clemenson, G.D., Suh, H., Couillard-Despres, S., Aigner, L., et al. (2012). Gene expression profiling of neural stem cells and their neuronal progeny reveals IGF2 as a regulator of adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 32, 3376–3387.
- Bryant, R. (2011). Post-traumatic stress disorder vs traumatic brain injury. *Dial Clin Neurosci* 13, 251.
- Buonora, J.E., Yarnell, A.M., Lazarus, R.C., Mousseau, M., Latour, L.L., Rizoli, S.B., Baker, A.J., Rhind, S.G., Diaz-Arrastia, R., and Mueller, G.P. (2015). Multivariate analysis of traumatic brain injury: development of an assessment score. *Front Neurol* 6, 68.
- Burgdorf, J., Colechio, E.M., Ghoreishi-Haack, N., Gross, A.L., Rex, C.S., Zhang, X., Stanton, P.K., Kroes, R.A., and Moskal, J.R. (2017). IGFBP2 produces rapid-acting and long-lasting effects in rat models of posttraumatic stress disorder via a novel mechanism associated with structural plasticity. *Int J Neuropsychopharmacol* 20, 476–484.
- Butovsky, O., Ziv, Y., Schwartz, A., Landa, G., Talpalar, A.E., Pluchino, S., Martino, G., and Schwartz, M. (2006). Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce

- neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 31, 149–160.
- Cao, Y., Gunn, A.J., Bennet, L., Wu, D., George, S., Gluckman, P.D., Shao, X.-M., and Guan, J. (2003). Insulin-like growth factor (IGF)-1 suppresses oligodendrocyte caspase-3 activation and increases glial proliferation after ischemia in near-term fetal sheep. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 739–747.
- Cole, W.R., and Bailie, J.M. (2016). Neurocognitive and psychiatric symptoms following mild traumatic brain injury. In *Translational Research in Traumatic Brain Injury*, D. Laskowitz, and G. Grant, eds. (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor and Francis Group), pp. 1–54.
- Corne, R., Leconte, C., Ouradou, M., Fassina, V., Zhu, Y., Déou, E., Besson, V., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C., and Mongeau, R. (2019). Spontaneous resurgence of conditioned fear weeks after successful extinction in brain injured mice. *Prog Neuropsychopharm Biol Psy* 88, 276–286.
- Fan, J., Wojnar, M.M., Theodorakis, M., and Lang, C.H. (1996). Regulation of insulin-like growth factor (IGF)-I mRNA and peptide and IGF-binding proteins by interleukin-1. *Am J Physiol* 270, R621–629.
- Gao, X., and Chen, J. (2013). Moderate traumatic brain injury promotes neural precursor proliferation without increasing neurogenesis in the adult hippocampus. *Exp Neurol* 239, 38–48.
- Giannakopoulou, M., Mansour, M., Kazanis, E., Bozas, E., Philpippidis, H., and Stylianopoulou, F. (2000). NMDA receptor mediated changes in IGF-II gene expression in the rat brain after injury and the possible role of nitric oxide. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26, 513–521.
- Giuliano, S., Talarico, S., Bruno, L., Nicoletti, F.B., Ceccotti, C., and Belfiore, A. (2017). Growth hormone deficiency and hypopituitarism in adults after complicated mild traumatic brain injury. *Endocrine* 58, 115–123.
- Glenn, D.E., Acheson, D.T., Geyer, M.A., Nievergelt, C.M., Baker, D.G., Risbrough, V.B., and MRS-II Team (2017). Fear learning alterations after traumatic brain injury and their role in development of posttraumatic stress symptoms. *Depress Anxiety* 34, 723–733.
- Gubbi, S., Quipildor, G.F., Barzilai, N., Huffman, D.M., and Milman, S. (2018). 40 years of IGF1: IGF1: the Jekyll and Hyde of the aging brain. *J Mol Endocrinol* 61, T171–T185.
- Kaplan, G.B., Vasterling, J.J., and Vedak, P.C. (2010). Brain-derived neurotrophic factor in traumatic brain injury, post-traumatic stress disorder, and their comorbid conditions: role in pathogenesis and treatment. *Behav Pharm* 21, 427–437.
- Lagraoui, M., Latoche, J.R., Cartwright, N.G., Sukumar, G., Dalgard, C.L., and Schaefer, B.C. (2012). Controlled cortical impact and craniotomy induce strikingly similar profiles of inflammatory gene expression, but with distinct kinetics. *Front Neurol* 3, 155.
- Lichtenwalner, R.J., Forbes, M.E., Bennett, S.A., Lynch, C.D., Sonntag, W.E., and Riddle, D.R. (2001). Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* 107, 603–613.
- Logan, A., Gonzalez, A.M., Hill, D.J., Berry, M., Gregson, N.A., and Baird, A. (1994). Coordinated pattern of expression and localization of insulin-like growth factor-II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 in the adult rat brain. *Endocrinology* 135, 2255–2264.
- Madathil, S., Evans, H.N., and Saatman, K.E. (2010). Temporal and regional changes in IGF-1/IGF-1R signaling in the mouse brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 27, 95–107.
- Madathil, S.K., Deng-Bryant, Y., Wilfred, B.S., Leung, L.Y., Gilsdorf, J.S., and Shear, D.A. (2017). Alterations in brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor-

- 1 protein levels after penetrating ballistic-like brain injury in rats. *J Trauma Acute Care Surg* 83, S16–S24.
- Meyer, D.L., Davies, D.R., Barr, J.L., Manzerra, P., and Forster, G.L. (2012). Mild traumatic brain injury in the rat alters neuronal number in the limbic system and increases conditioned fear and anxiety-like behaviors. *Exp. Neurol.* 235, 574–587.
- Ogier, M., Belmeguenai, A., Lieutaud, T., Georges, B., Bouvard, S., Carré, E., Canini, F., and Bezin, L. (2017). Cognitive deficits and inflammatory response resulting from mild-to-moderate traumatic brain injury in rats are exacerbated by repeated pre-exposure to an innate stress stimulus. *J Neurotrauma* 34, 1645–1657.
- Ogundele, O.M., Ebenezer, P.J., Lee, C.C., and Francis, J. (2017). Stress-altered synaptic plasticity and DAMP signaling in the hippocampus-PFC axis; elucidating the significance of IGF-1/IGF-1R/CaMKII α expression in neural changes associated with a prolonged exposure therapy. *Neuroscience* 353, 147–165.
- Piskunov, A., Stepanichev, M., Tishkina, A., Novikova, M., Levshina, I., and Gulyaeva, N. (2016). Chronic combined stress induces selective and long-lasting inflammatory response evoked by changes in corticosterone accumulation and signaling in rat hippocampus. *Metab Brain Dis* 31, 445–454.
- Ragsdale, K.A., Gramlich, M.A., Beidel, D.C., Neer, S.M., Kitsmiller, E.G., and Morrison, K.I. (2018). Does traumatic brain injury attenuate the exposure therapy process? *Behav Ther* 49, 617–630.
- 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., et al. (2011). Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Ann Neurol* 70, 374–383.
- Rusch, H.L., Guardado, P., Baxter, T., Mysliwiec, V., and Gill, J.M. (2015). Improved sleep quality is associated with reductions in depression and PTSD arousal symptoms and increases in IGF-1 concentrations. *J Clin Sleep Med* 11, 615–623.
- Santi, A., Genis, L., and Torres Aleman, I. (2018a). A coordinated action of blood-borne and brain insulin-like growth factor I in the response to traumatic brain injury. *Cereb Cortex* 28, 2007–2014.
- Santi, A., Bot, M., Aleman, A., Penninx, B.W.J.H., and Aleman, I.T. (2018b). Circulating insulin-like growth factor I modulates mood and is a biomarker of vulnerability to stress: from mouse to man. *Transl Psychiatry* 8, 142.
- Scheepens, A., Williams, C.E., Breier, B.H., Guan, J., and Gluckman, P.D. (2000). A role for the somatotrophic axis in neural development, injury and disease. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13 Suppl 6, 1483–1491.
- Schmeisser, M.J., Baumann, B., Johannsen, S., Vindedal, G.F., Jensen, V., Hvalby, Ø.C., Sprengel, R., Seither, J., Maqbool, A., Magnutzki, A., et al. (2012). I κ B kinase/nuclear factor κ B-dependent insulin-like growth factor 2 (Igf2) expression regulates synapse formation and spine maturation via Igf2 receptor signaling. *J Neurosci* 32, 5688–5703.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3, 1101–1108.
- Schober, M.E., Ke, X., Xing, B., Block, B.P., Requena, D.F., McKnight, R., and Lane, R.H. (2012). Traumatic brain injury increased IGF-1B mRNA and altered IGF-1 exon 5 and promoter region epigenetic characteristics in the rat pup hippocampus. *J Neurotrauma* 29, 2075–2085.
- Stylianopoulou, F., Herbert, J., Soares, M.B., and Efstratiadis, A. (1988). Expression of the insulin-like growth factor II gene in the choroid plexus and the leptomeninges of the adult rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 141–145.

- Suh, H.-S., Zhao, M.-L., Derico, L., Choi, N., and Lee, S.C. (2013). Insulin-like growth factor 1 and 2 (IGF1, IGF2) expression in human microglia: differential regulation by inflammatory mediators. *J Neuroinflammation* 10, 37.
- Sung, C.-W., Chen, K.-Y., Chiang, Y.-H., Chiu, W.-T., Ou, J.-C., Lee, H.-C., Tsai, S.-H., Lin, J.-W., Yang, C.-M., Tsai, Y.-R., et al. (2016). Heart rate variability and serum level of insulin-like growth factor-1 are correlated with symptoms of emotional disorders in patients suffering a mild traumatic brain injury. *Clin Neurophysiol* 127, 1629–1638.
- Tomaiuolo, F., Bivona, U., Lerch, J.P., Di Paola, M., Carlesimo, G.A., Ciurli, P., Matteis, M., Cecchetti, L., Forcina, A., Silvestro, D., et al. (2012). Memory and anatomical change in severe non missile traumatic brain injury: ~1 vs. ~8 years follow-up. *Brain Res Bull* 87, 373–382.
- Vaishnavi, S., Rao, V., and Fann, J.R. (2009). Neuropsychiatric problems after traumatic brain injury: unraveling the silent epidemic. *Psychosomatics* 50, 198–205.
- Vasterling, J.J., Jacob, S.N., and Rasmusson, A. (2018). Traumatic brain injury and posttraumatic stress disorder: conceptual, diagnostic, and therapeutic considerations in the context of co-occurrence. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 30, 91–100.
- Walter, H.J., Berry, M., Hill, D.J., Cwyfan-Hughes, S., Holly, J.M., and Logan, A. (1999). Distinct sites of insulin-like growth factor (IGF)-II expression and localization in lesioned rat brain: possible roles of IGF binding proteins (IGFBP) in the mediation of IGF-II activity. *Endocrinology* 140, 520–532.
- Washington, P.M., Forcelli, P.A., Wilkins, T., Zapple, D.N., Parsadanian, M., and Burns, M.P. (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.
- Wildburger, R., Zarkovic, N., Leb, G., Borovic, S., Zarkovic, K., and Tatzber, F. (2001). Post-traumatic changes in insulin-like growth factor type 1 and growth hormone in patients with bone fractures and traumatic brain injury. *Wien. Klin. Wochenschr.* 113, 119–126.
- Xu, X., Gao, W., Cheng, S., Yin, D., Li, F., Wu, Y., Sun, D., Zhou, S., Wang, D., Zhang, Y., et al. (2017). Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of atorvastatin in a murine model of traumatic brain injury. *J Neuroinflamm* 14, 167.
- Ye, P., Li, L., Richards, R.G., DiAugustine, R.P., and D'Ercole, A.J. (2002). Myelination is altered in insulin-like growth factor-I null mutant mice. *J Neurosci* 22, 6041–6051.
- Yin, B., Li, D.-D., Huang, H., Gu, C.-H., Bai, G.-H., Hu, L.-X., Zhuang, J.-F., and Zhang, M. (2019). Longitudinal changes in diffusion tensor imaging following mild traumatic brain injury and correlation with outcome. *Front Neural Circuits* 13, 28.
- Yurgil, K.A., Barkauskas, D.A., Vasterling, J.J., Nievergelt, C.M., Larson, G.E., Schork, N.J., Litz, B.T., Nash, W.P., Baker, D.G., and Marine Resiliency Study Team (2014). Association between traumatic brain injury and risk of posttraumatic stress disorder in active-duty Marines. *JAMA Psychiatry* 71, 149–157.

Figures

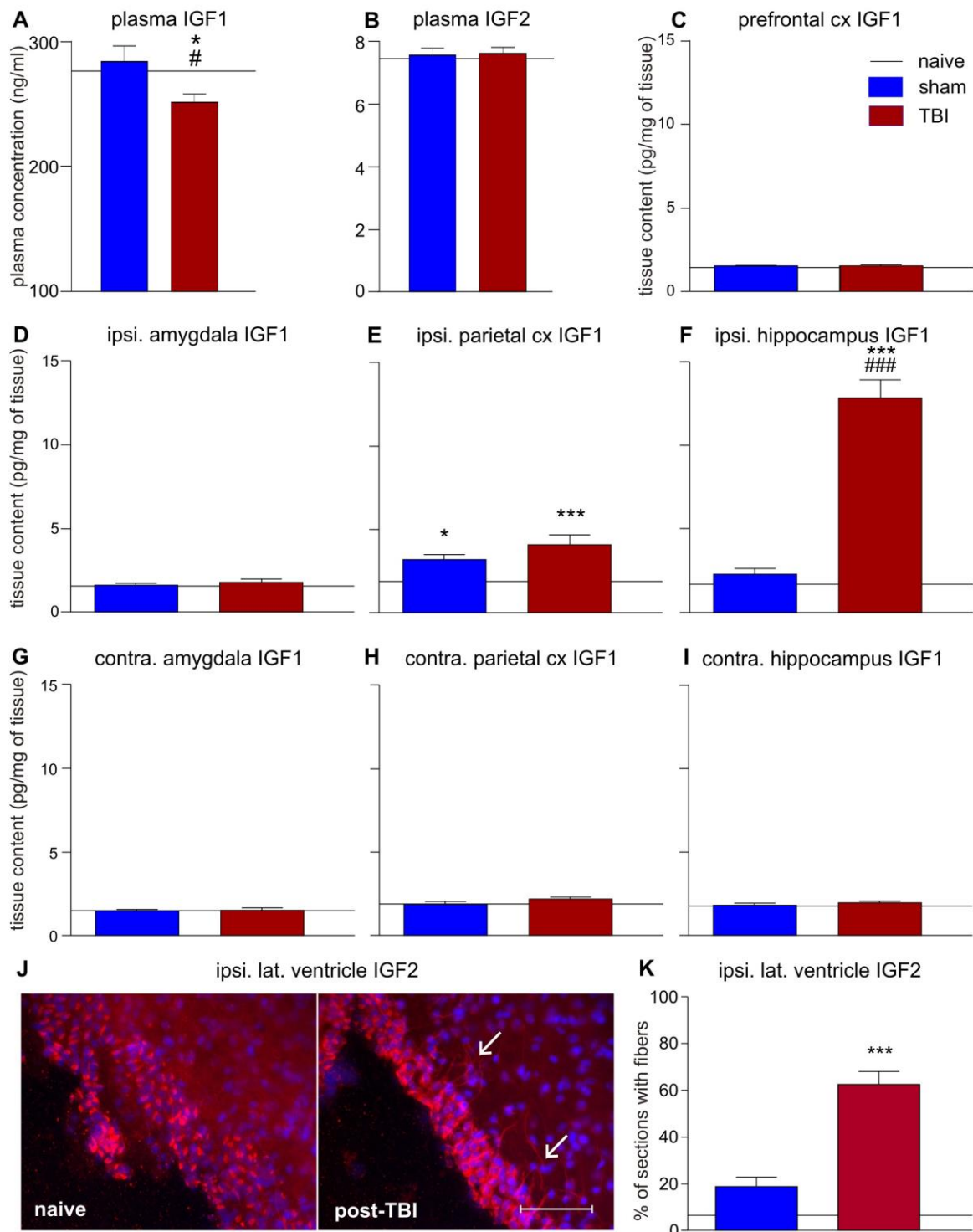


Figure 1. Alterations of the IGF system at 3 weeks post-mTBI. Plasma IGF1 (A) and IGF2 (B) concentrations. IGF1 tissue content in the prefrontal cortex (C), the ipsilateral amygdala (D), the parietal cortex (E), the hippocampus (F) and in the corresponding contralateral areas (G, H, I, respectively). IGF2 protein distribution in the epithelial layer of the ipsilateral lateral ventricle of naive (left) and TBI (right) animals (J; scale = 25 μ M). (K) Percentage of sections containing IGF2-immunopositive fibers. Data are mean \pm SEM, n = 10–14 and were analysed with a One-way ANOVA, followed by a Newman-Keuls' test, with the exception of data in (K) which were analysed by a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparisons test (* P < 0.05, *** P < 0.001 compared to naive mice, # P < 0.05, ### P < 0.001 compared to sham mice).

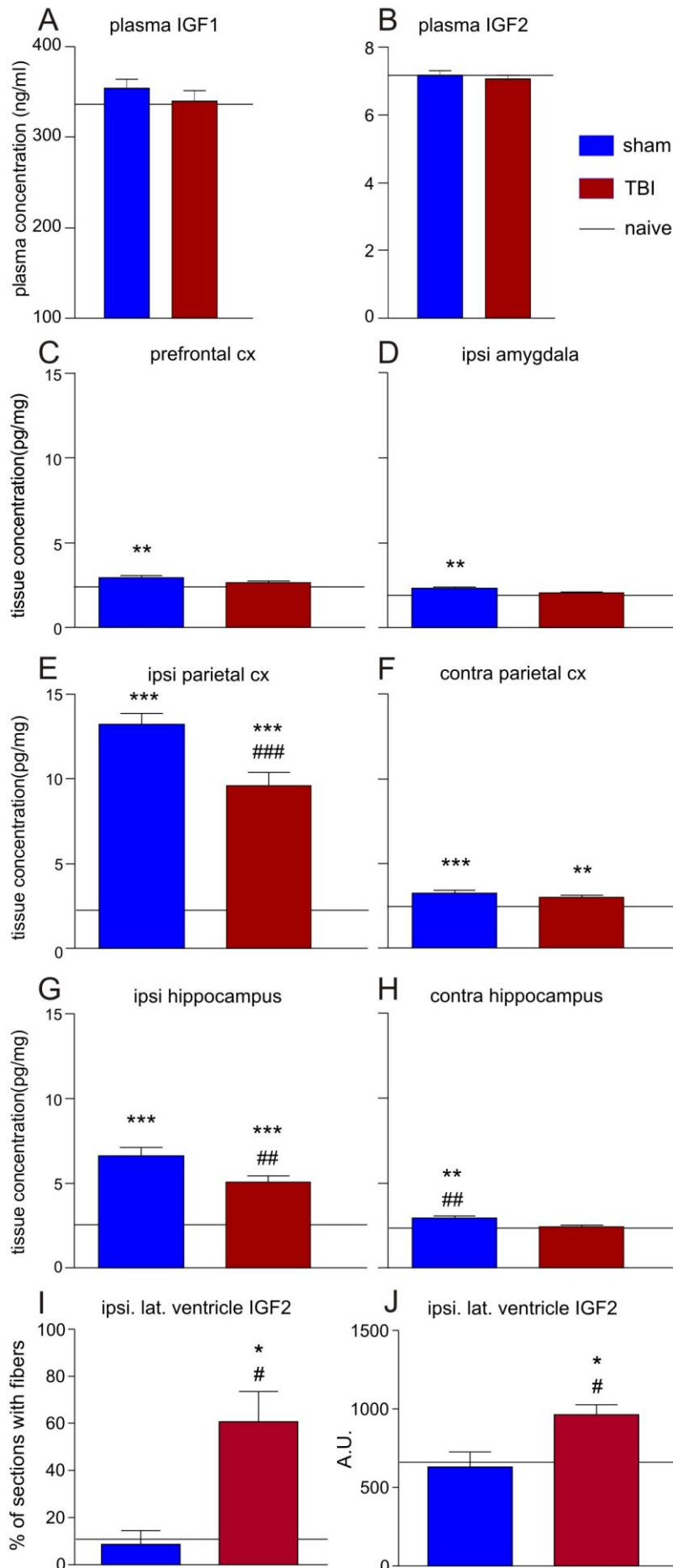


Figure 2. Alterations of the IGF system at 3 days post-mTBI. Lack of alteration in plasma IGF1 (A) and IGF2 (B) concentration in the acute phase post exposure to mTBI. IGF1 tissue content in the prefrontal cortex (C), ipsilateral amygdala (D), ipsilateral (E) and contralateral parietal cortex (F), and ipsilateral (G) and contralateral (H) hippocampus, 3 days post-surgery/mTBI. Quantification of the percentage of sections containing IGF2-positive fibers (I) and optical density of the IGF2 staining (J) in the epithelium of the ipsilateral lateral ventricle. Data are mean \pm SEM, $n = 10-14$ and were analysed with a One-way ANOVA, followed by a Newman-Keuls' test, with the exception of data in (I) which were analysed by a Kruskal-Wallis test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared to naive mice, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ compared to sham mice).

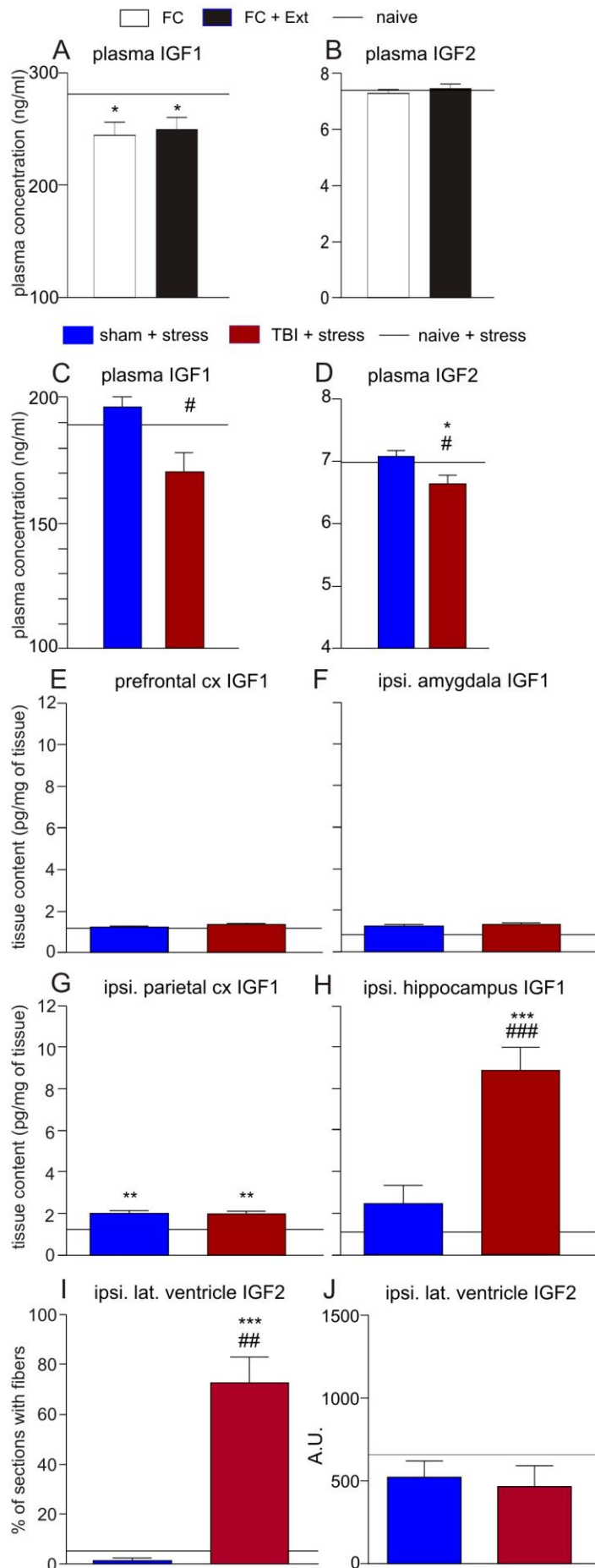


Figure 3. Alterations of the IGF system after stress in control, sham and mTBI-exposed mice 3 weeks post-TBI. Plasma IGF1 (A) or IGF2 (B) concentrations following fear conditioning or cue re-exposure. Plasma IGF1 (C) and IGF2 (D) concentrations following exposure to stress in mice previously exposed to mTBI. IGF1 tissue content in the prefrontal cortex (E), ipsilateral amygdala (F), parietal cortex (H) or hippocampus (H) or hippocampus in mice exposed to stress following mTBI. Quantification of the percentage of sections containing IGF2-positive fibers (I) and optical density of the IGF2 staining (J) in the epithelium of the ipsilateral lateral ventricle. Data are mean \pm SEM, $n = 10-14$ and were analysed with a One-way ANOVA, followed by a Newman-Keuls' test, with the exception of data in (I) which were analysed by a Kruskal-Wallis test (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared to naive mice, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ compared to sham mice).

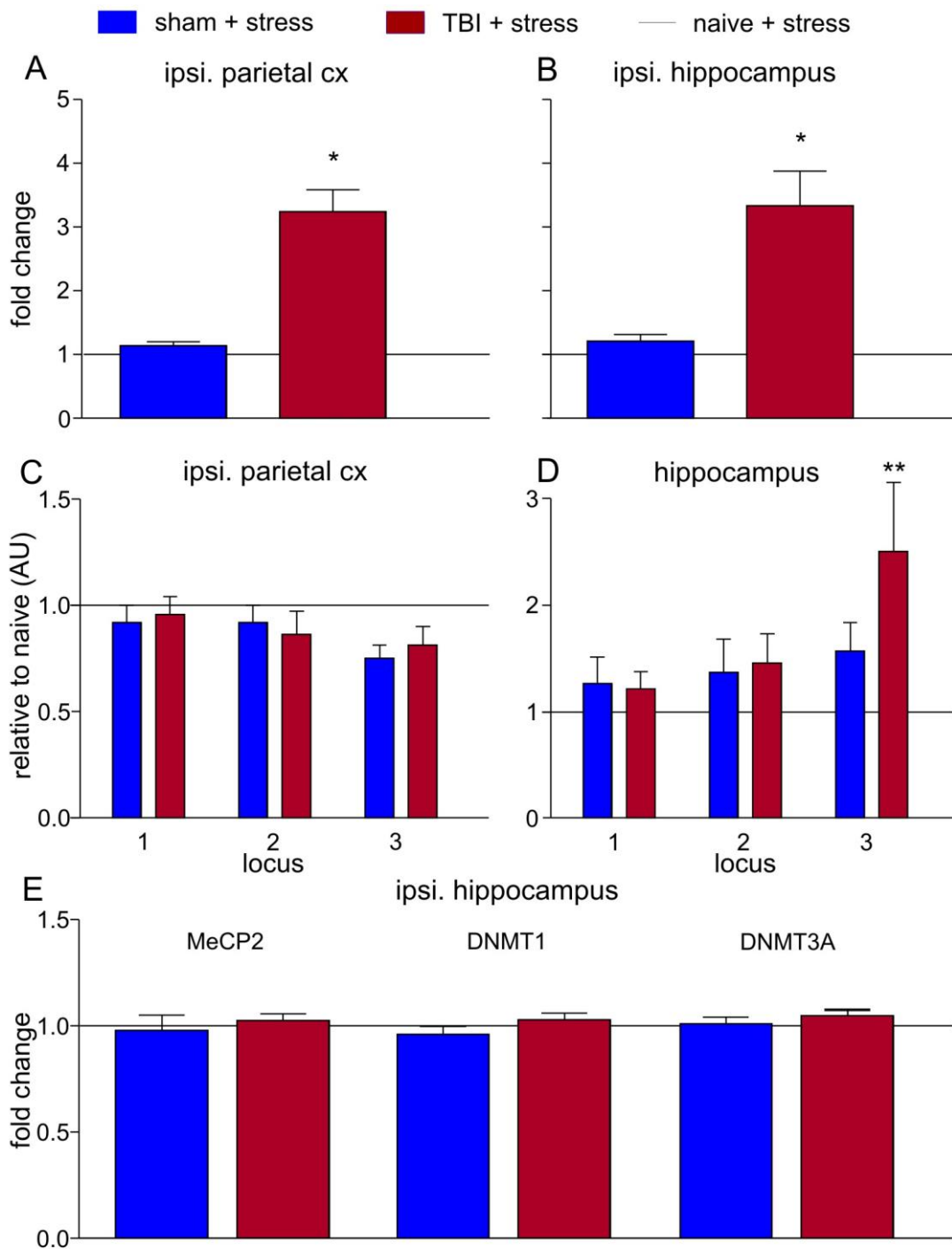


Figure 4. Long-term changes in IGF1 expression and methylation following TBI and subsequent exposure to a traumatic-like stress. Total IGF1 mRNA level in the ipsilateral parietal cortex (A) and ipsilateral hippocampus (B) 3 weeks post-injury/mTBI and 3 hours after cue-fear exposure (and the fear conditioning procedure on the previous day). Relative methylation levels at different loci of the *Igf1* promoter in the ipsilateral parietal cortex (C) and hippocampus (D) in our different experimental conditions (naïve, sham and mTBI mice). (E) Relative mRNA expression of MeCP2, DNMT1 and DNMT3A in the ipsilateral hippocampus. Data are mean \pm SEM, $n = 8-11$. In (A), (B) and (E) data were analysed with a One-way ANOVA, followed by a Newman-Keuls test (*** $P < 0.001$ compared to naive mice, ### $P < 0.001$ compared to sham mice). In (C) and (D), data were analysed with the Two-way ANOVA, followed by a Bonferroni's pairwise comparison (** $P < 0.01$ compared to naive mice).

Supplementary data

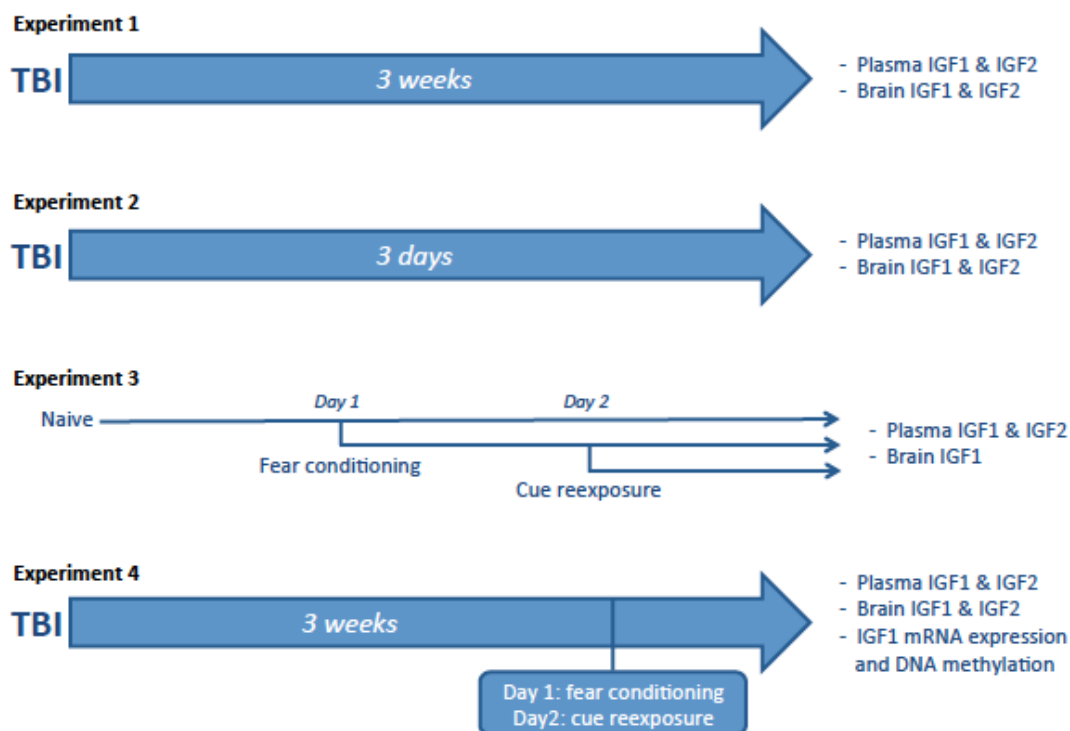


Figure S1. Experimental design showing the procedures used and parameters measured for each experiment. The first experiment wished to determine the chronic effects of TBI on blood and brain IGF1 and IGF2. The second experiment used the same metrics to evaluate the acute effects of TBI. The third experiment evaluated the response of the IGF system following a traumatic-like stress alone. In the fourth experiment we exposed mice to the traumatic-like stress following TBI to see whether the interaction of these interventions affected the IGF system differently. We repeated this experiment several times to conduct gene expression and epigenetic studies as well.

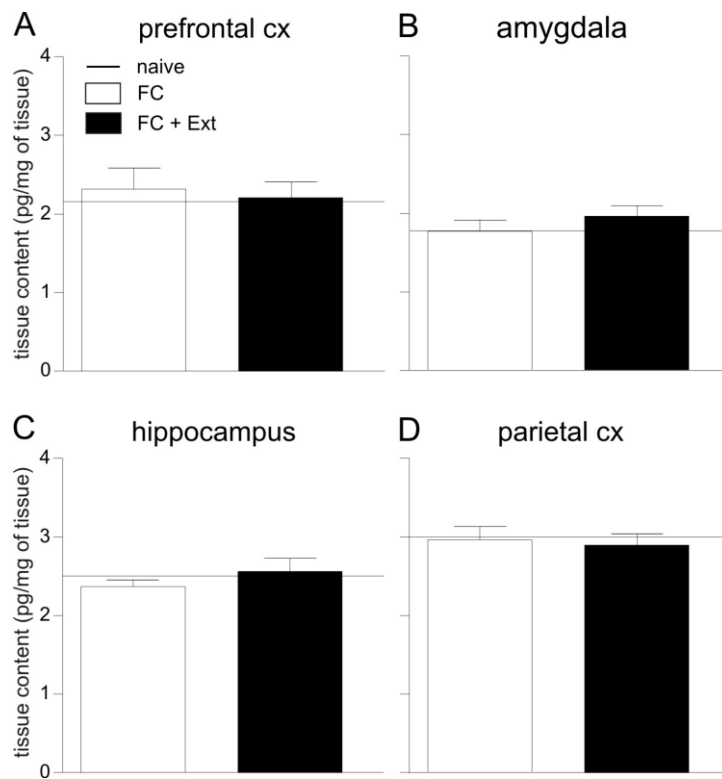


Figure S2. Tissue IGF1 concentrations in the fear circuitry and the parietal cortex 3 hours post fear conditioning (FC) or conditioned cue re-exposure (Ext). Tissue IGF1 concentrations of mice exposed to conditioned fear stresses were similar to those of naïve animals in the prefrontal cortex (A), the amygdala (B), the hippocampus (C), and the parietal cortex (D). Data are mean \pm SEM, $n = 10-11$.

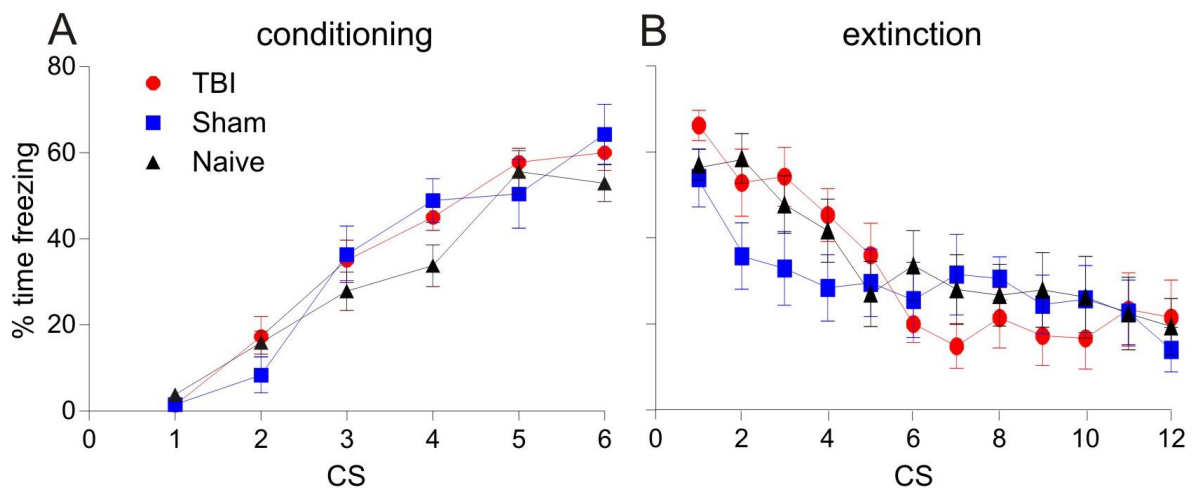


Figure S3. Acquisition and expression of conditioned fear 3 weeks post-injury. The amount of conditioned freezing expressed was similar in all groups during the acquisition phase (A) and the repeated cue re-exposure on the next day (B). Data are mean \pm SEM, $n = 10-11$, and were analysed with a Two-way Anova for repeated measurements followed by a Bonferroni's pairwise comparison. There was a significant effect of time during both conditioning and fear extinction ($P < 0.001$).

Gene	Forward/Reverse	Sequence (5' – 3')
IGF1	Forward	AAAAGCAGCCCGCTCTATCC
	Reverse	CTTCTGAGTCTTGGGCATGTCA
IGF1 promoter 1	Forward	ATATCCGTGGAAAGCATGC
	Reverse	CTGTGTCTGAGTGTGTATTCC
IGF1 promoter 2	Forward	TTTCTATCCATGGGGCAGCG
	Reverse	CGGACTCTCAGGGGGATTG
IGF1 promoter 3	Forward	AAATCCCCCTGAGAGTCCGA
	Reverse	CCTTTGCCACAGGGAATGGA
MeCP2	Forward	AAACCACCTAAGAAGCCCAAATC
	Reverse	TTGACAACAAGTTTCCAGGG
DNMT1	Forward	AGAGACCAGGATAAGAAACGCA
	Reverse	CTCCTTTGATTTCCGCCTCAAT
DNMT3A	Forward	ATGTGGTTCGGAGATGGCAAG
	Reverse	AGATGGCTTTGCGGTACATGG

Table S1. List of the primers used for qPCR experiments.

	Naive	FC	FC + Ext
Fear conditioning	1.02 ± 0.08	0.88 ± 0.6	0.94 ± 0.05
	Naive	Sham	TBI
3 weeks post-TBI	1.02 ± 0.06	1.11 ± 0.06	1.11 ± 0.06
3 days post-TBI	1.03 ± 0.7	1.03 ± 0.09	0.99 ± 0.07

Table S2. Effects of stress and short vs long term TBI on liver IGF1 mRNA expression. Data are mean ± SEM, n = 10–14.

Discussion générale

Le but de cette thèse était double. Nous voulions tout d'abord modéliser certains des symptômes de type ESPT survenant après l'exposition à un TC, puis déterminer les altérations concomitantes au niveau des circuits neuroanatomiques pertinents, de la substance blanche et des facteurs neurotrophiques participant à la neuroréparation, pour déterminer l'utilité de ces derniers en tant que marqueurs.

Nous avons ainsi pu montrer que suite à l'exposition à un TCL, les souris présentent un déficit de la mémoire d'extinction. Celui-ci se manifeste par une résurgence spontanée de la peur conditionnée à long terme, en dépit d'une acquisition et d'une extinction de la peur conditionnée similaire à celles des animaux contrôles. Ce phénomène, rapporté pour la première fois ici, survient conjointement à d'autres altérations comportementales similaires à celles des patients ESPT (comportements de risque, déficit de flexibilité cognitive). De plus, dans notre modèle, le TC engendre à très long terme, des altérations cérébrales comparables à celles pouvant être observées chez l'Homme. Nous avons notamment mis en évidence des modifications neuroanatomiques et de la substance blanche dans les régions impliquées dans les comportements de peur (asymétrie de l'amygdale, substance blanche dans le cortex retrosplénial, l'hippocampe, le thalamus et l'amygdale), ainsi que dans un réseau de substance blanche, le CC, bien connu pour sa vulnérabilité au TC. En parallèle, le TC (à 3 semaines) affecte l'expression du Bdnf post-extinction de la peur ainsi que l'état épigénétique du gène du Bdnf. Bien que ces dernières modifications soient d'une amplitude modérée, elles suggèrent que les perturbations induites par le TC sont durables et peuvent influencer la mémoire à long terme.

Le BDNF nous paraissant quand même peu prometteur en tant que marqueur du TC et de la vulnérabilité psychiatrique qui en résulte, nous nous sommes intéressés ensuite au système IGF. Celui-ci évolue plus nettement avec le traumatisme crânien, à la fois dans l'hippocampe et la périphérie, et est également sensible aux stress de type traumatique. Nous avons pu montrer qu'il est différemment altéré à court terme (3 jours) et à long terme (3 semaines), permettant ainsi de suivre l'évolution post-TC. Un résultat intéressant de cette deuxième étude est celui concernant la réorganisation de la distribution de l'IGF2 dans l'épithélium des ventricules latéraux, jamais décrite auparavant, qui mériterait des investigations additionnelles. Concernant l'IGF1, les

altérations centrales observées étaient associées à des modifications de l'expression du gène et de son état épigénétique, qui étaient dans ce cas région-dépendantes. Bien que n'élucidant pas les modifications observées au niveau des protéines (persistance à long terme de la surexpression d'IGF1 dans l'hippocampe), celles-ci traduisent ici aussi les changements de fonctionnement profonds et à long terme induits par le TC. Nous allons maintenant discuter tous ces résultats avec plus de précision.

1. Le traumatisme crânien léger, facteur de vulnérabilité psychiatrique

1.1 Un traumatisme crânien vraiment léger ?

Tout d'abord, la sévérité de notre modèle doit être traitée, puisque plusieurs auteurs cherchent depuis quelques années à modéliser le TC dit léger, qui concerne la majorité de la population clinique, notamment celle atteinte par des conséquences psychiatriques. Notre modèle est défini comme léger vis-à-vis des modèles d'impact cortical contrôlé employés dans la littérature (Washington et al., 2012), mais cette classification reste à justifier. Nous considérons ce modèle comme étant léger, car il ne cause pas de trouble de type neurologique majeur (Article 1, Figure 2A). Globalement, la distribution des scores neurologiques pourrait paraître différente chez les animaux TC relativement aux deux autres groupes, avec seulement 6 animaux sur 15 n'atteignant pas le score maximal. Néanmoins, cette différence n'est pas significative, et le score neurologique le plus faible ne tombe pas en dessous de 15.

Mais, le score neurologique est-il bien le meilleur indicateur de la sévérité ? Intéressons-nous aux autres comportements étudiés. On peut voir que la résurgence de la peur conditionnée est sensible, dans une certaine mesure, à la craniotomie, qui est l'atteinte la plus légère pouvant être générée avec le modèle de l'impact cortical contrôlé (Article 1, Figure 1E). Les comportements de risque ne sont pas non plus un indicateur fiable de la sévérité puisqu'ils émergent avec un TCL et restent présents au même niveau avec des TC plus sévères (Washington et al., 2012). En revanche, le retard d'apprentissage de la mémoire spatiale et la diminution de la flexibilité cognitive montrent bien l'effet délétère du TC. Néanmoins, des déficits cognitifs peuvent également être observés chez les humains victimes de TCL (Niogi et al., 2008; Zhou et al., 2013), et les formes de TC plus

sévères chez la souris affectent la mémoire spatiale bien plus sévèrement que dans notre modèle (Washington et al., 2012). Ainsi, le meilleur indicateur comportemental de la sévérité du TC est le score neurologique puisque c'est le paramètre qui évolue de la façon la plus mesurable avec les différents degrés de sévérité employés (Washington et al., 2012).

Intéressons-nous maintenant aux altérations neuroanatomiques. La lésion engendrée par notre modèle de TC induit une disparition locale du cortex dorsal qui peut paraître sévère, mais celle-ci n'est présente que dans la zone impactée et n'affecte que modérément les tissus sous-jacents. Le volume de l'hippocampe n'est pas affecté (Article 1, Figure supplémentaire 2) alors que dans les modèles de TC plus sévères celui-ci peut fortement s'atrophier, et même disparaître dans certains cas (Washington et al., 2012). Les autres altérations observées, principalement au niveau de la substance blanche, restent d'une amplitude limitée et étaient attendues sur la base des études cliniques sur le TCL (Bonnelle et al., 2011; Yuh et al., 2013; Zhou et al., 2013).

En conclusion, nous pouvons être relativement confiants : notre modèle engendre un TC de sévérité légère. L'impact cortical contrôlé reste un TC expérimental dont l'induction est peu ressemblante aux causes physiques des TC focaux survenant chez l'humain. Néanmoins, comme discuté dans le chapitre 1 (section 3.1), un modèle plus réaliste, comme le lâcher de poids, est moins reproductible et moins facile à caractériser en termes de sévérité.

1.2 Conséquences neuroanatomiques et comportementales du modèle de l'impact cortical contrôlé

D'un point de vue neuroanatomique, la majorité des études réalisées sur le TCL a eu tendance à se concentrer sur les atteintes au niveau de la lésion primaire. Or, comme nous avons pu le voir dans notre première étude, un TCL par impact cortical contrôlé peut affecter des régions qui en sont relativement distantes.

Les atteintes au niveau de la lésion primaire étaient attendues (Article 1, Figure 4A et 4B). L'agression cérébrale que constitue le TC conduit à une atrophie des tissus directement atteints, ici le cortex dorsal. Le CC étant immédiatement sous le cortex dorsal, il n'est pas surprenant qu'il soit lui aussi atteint. De façon prévisible, ceci conduit à une

diminution des niveaux de substance blanche (volume et densité de MBP) dans le CC et le cortex retrosplénial, ce dernier étant aussi situé à proximité de la lésion primaire. Il est surprenant que la diminution de MBP dans le cortex retrosplénial ne soit visible que relativement aux animaux sham, qui avaient plutôt tendance à avoir des densités de marquage MBP augmentées. Ces résultats étaient néanmoins attendus au vu de la littérature décrite dans le chapitre 1 de l'introduction (sections 4.5.1 et 4.5.2).

Concernant les régions plus distantes, nous aurions pu nous attendre à des altérations volumiques au niveau de l'hippocampe. Néanmoins, bien que de la neurodégénérescence y ait été décrite après un TCL chez le rat (Hall et al., 2008), il semblerait qu'une atrophie de cette région ne puisse être visible que suite à des TC plus sévères, autant chez l'humain que chez l'animal (Rushby et al., 2016; Tate & Bigler, 2000 ; voir aussi chapitre 1, section 4.5). Il existe des descriptions d'atrophie de l'hippocampe chez les humains victimes de TCL, mais celles-ci ont été observées après des expositions répétées (Singh et al., 2014). L'absence d'atrophie de l'hippocampe suggère une fois de plus une sévérité légère du TC dans notre modèle.

L'altération la plus surprenante que nous ayons observée est celle concernant l'asymétrie gauche/droite de l'amygdale (Article 1, Figure 4F). La diminution de cette asymétrie en l'absence d'une altération de volume est décrite ici, à notre connaissance, pour la première fois chez des animaux TCL et touche à la fois les animaux sham et TC. De manière intéressante, des altérations de volume de l'amygdale ont déjà été décrites chez les patients ESPT (Starcevic et al., 2014; Su et al., 2018), et TC sévère (Rushby et al., 2016), mais pas chez les victimes de TCL. Au vu de l'importance de cette région dans la réponse émotionnelle et en particulier les comportements de peur conditionnée, il a été suggéré que son altération suite au TC pourrait prédire la vulnérabilité aux pathologies de la peur (Rushby et al., 2016). La diminution de l'asymétrie a été trouvée ici chez des animaux exposés au conditionnement de la peur 3 semaines post-TC. On pourrait ainsi supposer qu'elle n'est pas un effet du TC seul, mais du « double coup » (TC + stress), comme cela avait déjà été observé chez l'humain (Depue et al., 2014). Le niveau d'asymétrie de l'amygdale pourrait donc être un marqueur neuroanatomique de la vulnérabilité post-TC et nécessite des recherches supplémentaires.

Les altérations de substance blanche au niveau des sites secondaires confirment bien l'importance de celle-ci en tant que marqueur neuroanatomique du TC. Les régions plus distantes comme le cortex frontal, cingulaire, ou le septum ne sont pas atteintes, mais

les régions situées ventralement vis-à-vis de l'impact présentent une diminution des quantités de MBP par rapport aux animaux sham. Une fois de plus, ceux-ci tendaient à avoir une densité plus grande de protéine MBP que les animaux naïfs (ces effets sham seront discutés plus tard, dans la section 2.2). Il est étonnant de ne pas avoir retrouvé de diminution de la MBP dans le CPF alors qu'une diminution de la substance blanche dans cette région avait été décrite chez l'humain après un TCL, celle-ci étant corrélée aux symptômes d'anxiété (Zhou et al., 2013). Nous voyons peut-être ici une des limites translationnelles des modèles animaux du TC. Les diminutions de substance blanche observées dans l'hippocampe, le thalamus et l'amygdale n'ont à notre connaissance jamais été décrites dans ce modèle d'impact cortical contrôlé. Celles-ci ne sont pas surprenantes au vu des altérations neuroanatomiques décrites dans le chapitre 1 (section 4.5), et sachant que ces régions subissent chez l'humain de l'inflammation et de l'atrophie suite au TC (Farbota et al., 2012; Hazra et al., 2014).

Les altérations locales de substance blanche pourraient très bien rendre compte de certains déficits comportementaux que nous observons dans notre modèle, vu l'importance de ces régions dans les comportements de peur et d'anxiété (voir chapitre 2, section 3.3). Néanmoins, ces altérations de substance blanche ne devraient pas être considérées comme des marqueurs locaux d'atteintes post-TC, mais plutôt comme le reflet des lésions diffuses qui se manifestent dans diverses régions. En effet, comme suggéré dans le chapitre 1 (section 4.5), la neuroanatomie du TC devrait être étudiée sous l'angle de perturbations au niveau de réseaux plutôt que d'atteintes locales, puisque ce sont elles qui reflèteraient le mieux les déficits comportementaux chez l'humain (Bonnelle et al., 2011; Sharp & Ham, 2011). Ainsi, les modifications de comportement observées dans notre modèle ne devraient pas être surprenantes si l'on considère que le TC induit une désorganisation des réseaux neuronaux. De plus, l'intégrité des réseaux de substance blanche a été impliquée dans les comportements à risque chez l'humain (Kohno et al., 2017), et il ne devrait donc pas être étonnant de constater que ceux-ci sont altérés dans notre modèle de TC. Au vu de sa nature stressante, nous aurions pu nous attendre à ce que le TC induise un profil anxieux, plutôt que d'augmenter l'ambulation dans les bras ouverts et le centre de "l'open-field". Néanmoins, ce résultat a souvent été décrit précédemment dans le même modèle de TC expérimental (Ojo et al., 2014; Taib et al., 2017; Washington et al., 2012). La nature de l'effet du TC serait fonction du modèle employé, puisque le TC par lâcher de poids induit un profil plutôt anxieux chez les

animaux (Meyer et al., 2012). Notre résultat serait normalement interprété comme un effet « anxiolytique thérapeutique », une interprétation qui ne nous semblait pas plausible chez des animaux exposés à une agression cérébrale. C'est pour cela que nous avons plutôt pris un point de vue éthologique et interprété ce résultat comme une augmentation de la prise de risque (qui devrait survenir dans un environnement naturel). Il y aurait probablement des méthodes pour mesurer plus spécifiquement ces comportements dans un contexte éthologique approprié, afin d'évaluer la pertinence de ce résultat en lien avec les comportements à risque observés chez les patients ESPT. Il existe par exemple des modèles permettant d'évaluer le désir d'un animal à atteindre une récompense qui, par l'emploi de stimuli menaçants, permettent de déterminer le niveau de risque que l'animal est prêt à tolérer pour obtenir cette récompense (Dent et al., 2014).

L'aspect comportemental le plus intéressant de notre modèle est évidemment la résurgence à long terme de la peur conditionnée. Bien qu'une résurgence de la peur n'ait jamais été décrite auparavant suite au TC expérimental, celle-ci est caractéristique des patients ESPT (Blechert et al., 2007; Milad et al., 2009). Ce phénomène est d'autant plus surprenant que les animaux TC parvenaient initialement à acquérir et éteindre la peur conditionnée de façon comparable aux autres groupes. Ceci n'était pas nécessairement évident, puisqu'une augmentation du freezing lors de l'acquisition du conditionnement avait déjà été observée dans d'autres conditions expérimentales (Davies et al., 2016; Meyer et al., 2012; Reger et al., 2012; Schneider et al., 2016). Néanmoins, dans chacun de ces modèles, la sévérité du TC était supérieure à celle de notre modèle. Par ailleurs, la procédure de conditionnement de la peur était réalisée à plus court terme (avant 2 semaines post-TC). Au vu de la nature stressante de la chirurgie nécessaire pour induire le TC, on peut supposer une influence encore forte de ce stress physique sur les réponses de stress psychogéniques. Concernant l'acquisition de l'extinction de la peur, la littérature est moins claire. Une diminution de celle-ci avait déjà été rapportée suite à un impact cortical contrôlé (Schneider et al., 2016), mais une étude employant un modèle de TC par lâcher de poids n'avait pas constaté d'effet, ni sur l'acquisition de l'extinction ni sur sa rétention à court terme (Meyer et al., 2012). De nouveau, nous devons souligner que le stress lié à la procédure de TC pourrait complexifier l'interprétation des résultats. Une autre étude avait trouvé que l'addition d'un stress par défaite sociale se combinait au TC et diminuait les capacités d'extinction (Davies et al., 2016), alors que ni l'un ni l'autre n'avait d'effet seul. Le faible nombre d'études sur le sujet et le grand nombre de

différences entre les protocoles employés nous empêche pour l'instant de statuer de manière définitive sur les effets du TCL vs le TC sévère sur l'acquisition de la mémoire d'extinction de la peur.

On pourrait penser que la rétention plus faible de la peur conditionnée chez les animaux TC (Article 1, Figure 1B) est à l'origine de la diminution de l'index d'extinction. S'il y a moins de peur exprimée immédiatement suite au conditionnement, alors le delta en freezing exprimé après l'extinction, c'est-à-dire l'index d'extinction, sera plus faible. Néanmoins, si cela en était vraiment l'explication on devrait déjà voir une différence émerger entre le premier et le deuxième jour d'extinction. L'absence de déficit d'extinction à ce stade indique donc bien que la résurgence de la peur est un phénomène se produisant après la deuxième séance d'extinction. Par ailleurs, si les animaux expriment moins de freezing le premier jour d'extinction, c'est aussi le cas lors du deuxième jour, et la diminution du freezing entre les deux jours, et donc l'acquisition de l'extinction, est comparable aux autres groupes. Ceci souligne par ailleurs l'importance de construire un index d'extinction plutôt que de s'intéresser simplement au niveau d'expression de la réponse de freezing : dans un article utilisant un modèle d'impact cortical contrôlé chez la souris, des auteurs mettaient en évidence un niveau de freezing plus élevé pendant l'extinction qu'ils interprétaient ensuite faussement comme un déficit d'acquisition de la mémoire d'extinction (Schneider et al., 2016). Les animaux exprimaient plus de freezing pendant le conditionnement, et les graphiques de cette étude (Schneider et al., 2016) nous suggèrent que l'amplitude de la diminution du freezing était en fait comparable à celle du groupe contrôle. Finalement, nos animaux sham présentent eux aussi un certain déficit à long terme de la mémoire d'extinction, alors que leur rétention du conditionnement était similaire à celle des animaux naïfs. Ce déficit est de niveau intermédiaire à celui des animaux TC, suggérant un effet proportionnel à la sévérité de l'atteinte cérébrale.

En dépit de cette résurgence de la mémoire de peur et des comportements de prise de risque, nous n'avons pas ici, proprement dit, un modèle d'ESPT, mais plutôt un modèle de prédisposition à l'ESPT. Il n'est pas certain que le stress employé, c'est-à-dire l'exposition à l'US (la série de chocs), constitue à proprement parler un stimulus traumatique. D'autres modèles, comme celui employant le « stress seul prolongé » (décrit dans le chapitre 2, section 3.1), pourraient se rapprocher plus à un événement traumatique. Ce dernier modèle provoque lui aussi un déficit de rétention de la mémoire

d'extinction, cette fois-ci évaluée à court terme (Knox et al., 2012, 2016), même s'il existe des évidences contraires dans d'autres modèles pertinents (par exemple, le stress de défaite sociale ; Davies et al., 2016). Néanmoins, en faveur de notre stratégie expérimentale, nous pouvons affirmer que nous modélisons bien ici la vulnérabilité post-TC à certains symptômes importants de type ESPT. Ce modèle nous permet aussi de suivre l'évolution des facteurs trophiques et des altérations neuroanatomiques post-TC en lien avec cette vulnérabilité, et pourrait donc être employé pour tester l'effet de différentes thérapies, pharmacologiques ou comportementales, sur celle-ci.

Nous devons réfléchir maintenant à propos de l'interaction entre stress physique et psychologique qui survient lors du TC. Même si les souris sont anesthésiées lors de la procédure, celle-ci reste une source de stress et il ne peut pas être exclu que son intensité soit suffisante pour déclencher un trouble lié au stress. De plus, cette interaction est fréquemment retrouvée chez l'humain puisque les conditions requises pour être atteint d'un TC, même léger, sont nécessairement d'une certaine violence. Ceci nous rapporte évidemment à la confusion historique qui existait lors de la description du « shell shock » (chapitre 2, section 1.1), qui amalgamait le traumatisme physique causé par la déflagration d'un obus et le traumatisme psychologique causé par l'exposition à un bombardement. Il est possible que l'étude du TC se fasse toujours en condition de stress, et ce particulièrement dans les modèles animaux puisque la procédure chirurgicale et les stress qui l'entourent vont probablement constituer, à un certain point, un événement de type traumatique pour l'animal. Ceci est toujours à prendre en compte lors de l'étude de l'interaction entre le TC et le comportement : l'étude des comportements, lorsque réalisée trop peu de temps après le TC, va certainement refléter en partie le stress psychologique qu'il cause, alors que ce sera peut-être moins le cas si le comportement est étudié à plus long terme.

Enfin, dans le cadre des vulnérabilités psychiatriques induites par le TC décrites dans le chapitre 1 (section 5), il serait intéressant d'évaluer d'autres comportements de type psychopathologique en utilisant par exemple des tests permettant d'évaluer les comportements de type dépressifs ou anxieux. Les TC ne prédisposent pas seulement à l'ESPT, mais aussi à la dépression (Ahmed et al., 2017; Deb et al., 1999). L'impact cortical contrôlé chez la souris induit une augmentation de l'immobilité dans le test de Porsolt,

que les auteurs ont interprétée comme un comportement de type dépressif, et ce de manière comparable indépendamment de la sévérité de l'impact (Washington et al., 2012). Ainsi, l'étude des marqueurs biologiques associés à notre modèle pourrait être faite en lien avec d'autres comportements de type psychopathologiques. Ceci permettrait de déterminer si chaque comportement post-TC a sa propre signature biologique, ou s'il existe des mécanismes physiopathologiques communs qui sous-tendent la vulnérabilité à ces différentes psychopathologies dans leur ensemble.

2. Utilité des facteurs trophiques en tant que marqueurs

Les auteurs cherchant à trouver des marqueurs utiles pour la détection du TC et de la vulnérabilité psychiatrique focalisent en grande partie leur attention sur l'inflammation. En effet, le TC peut être considéré comme un trouble dans lequel une réponse inflammatoire chronique exacerbée s'installe (Corps et al., 2015), conduisant à l'aggravation des lésions et donc la survenue d'une vulnérabilité psychiatrique (voir chapitre 1, sections 2.3 et 2.4). En conséquence, un certain nombre de facteurs inflammatoires ont été proposés comme marqueurs, par exemple les cytokines TNF- α , IL-6, IL-1 β et IL-8 (Devoto et al., 2017; Juengst et al., 2014; Kumar et al., 2015). Il a été suggéré que ces marqueurs pourraient prédire la récupération à long terme, au moins dans les TC sévères. Néanmoins, la réponse inflammatoire comporte un axe pro-apoptotique délétère ainsi qu'un axe anti-inflammatoire bénéfique (Da Silva Meirelles et al., 2017), c'est pourquoi plusieurs auteurs considèrent que l'utilisation d'un seul marqueur serait insuffisante. Ainsi, la construction d'un score inflammatoire sur la base de plusieurs marqueurs prenant en compte ces deux axes de la réponse au TC, pro- et anti-inflammatoire, est désormais jugée plus prédictive du devenir des patients (Devoto et al., 2017; Hinson et al., 2015; Kumar et al., 2015; Woiciechowsky et al., 2002).

Au vu de l'antagonisme biologique existant entre neurodégénérescence et neuroréparation suite au TC (voir chapitre 1, sections 4.2 et 4.3), les marqueurs inflammatoires pourraient être insuffisants pour saisir l'état physiopathologique. Une amélioration de l'état de la substance blanche peut être observée chez les patients en relation avec l'amélioration de leurs symptômes post-TC (Sidaros et al., 2008), et au vue de l'importance des facteurs trophiques dans la neuroréparation de la substance blanche

(Butovsky et al., 2006b; Chou et al., 2018; Scheepens et al., 2000), ceux-ci pourraient être un meilleur prédicteur de la vulnérabilité post-TC. Il a d'ailleurs été proposé que la dépression résulterait d'un déséquilibre entre les systèmes inflammatoires et neurotrophiques (Audet & Anisman, 2013). De plus, l'étude des facteurs trophiques permet de prédire la récupération fonctionnelle à la suite du TC (Failla et al., 2016; Feeney et al., 2017; Korley et al., 2016), ainsi que le risque de dépression (Failla et al., 2016). De la même façon qu'un score pro- vs anti-inflammatoire peut être informatif sur le pronostic vital des patients (voir chapitre 1, section 2.4), il se pourrait qu'un score inflammation vs neuroréparation soit plus informatif pour la vulnérabilité psychiatrique, comparativement à des mesures de chacun de ces paramètres séparés.

2.1 Les facteurs trophiques dans le traumatisme crânien

Nous avons donc étudié le BDNF et le système IGF suite au TC, et ce en lien avec les comportements de peur conditionnés. Nous avons trouvé une diminution de l'expression des transcrits activités-dépendants du *Bdnf* chez les animaux sham et TC dans le cortex lésé et le CPF. Ces diminutions étaient modestes, et nous n'avons pas pu étudier les niveaux de BDNF protéiques, difficiles à obtenir chez la souris d'un point de vue technique. Il nous paraissait néanmoins essentiel de nous intéresser au BDNF, étant donnée son importance en psychiatrie (Dwivedi et al., 2003; Gervasoni et al., 2005).

Les résultats obtenus sur le système IGF sont beaucoup plus robustes et dénotent d'une évolution avec le temps post-TC. Ceux-ci étaient attendus au vu de la littérature (voir chapitre 3, section 6.5), mais il semblerait, selon nos propres études, que l'IGF1 périphérique ne soit pas un marqueur idéal du TC ou de la vulnérabilité qui en résulte (voir Article 2, Discussion). Celui-ci n'est pas affecté à court-terme mais diminue en réponse au stress. Il a d'ailleurs été estimé que la diminution d'IGF1 suite au TC serait le résultat d'un état de stress prolongé (Marina et al., 2015). L'IGF2 périphérique quant à lui n'évolue qu'en réponse au « double-coup », il n'est donc pas clair qu'il pourrait avoir une valeur prédictive suite au TC seul. Ce résultat sur l'IGF2 est intéressant en relation avec un article récent montrant une diminution de celui-ci en périphérie, à court terme, chez des patients TC (He et al., 2018).

Concernant les altérations centrales du système IGF, nous avons été surpris de constater que l'augmentation d'IGF1 suite au TC était plus importante dans le cortex pariétal à court terme, mais par contre plus importante dans l'hippocampe à long terme. Étant donné qu'à court terme on peut voir des augmentations d'IGF1 résultant de la craniotomie seule dans d'autres régions, mais pas à long terme, ce résultat renforce l'observation que l'hippocampe est une région dont la réponse est particulière dans le contexte du TC. Ceci est par ailleurs soutenu par le fait qu'il existe des altérations de l'état épigénétique du promoteur d'Igf1 dans l'hippocampe, mais pas dans le cortex pariétal (Article 2 Figure 4C et 4D).

La redistribution d'IGF2 au niveau des ventricules latéraux est une observation très intéressante. Rapportée ici pour la première fois, celle-ci s'accorde avec des résultats de la littérature qui montraient une action à distance d'IGF2, avec la présence de protéines au niveau du site lésé, mais en l'absence d'une augmentation locale des ARNm (Walter et al., 1999). Bien que les auteurs proposent un rôle pour les IGFBP dans ce processus, cette observation suggère l'existence d'un transport de l'IGF2 des plexus choroïdes vers la région lésée, dans des cellules et *via* des mécanismes qui demandent encore à être élucidés. Le type cellulaire astrocytaire semble être un bon candidat étant donné qu'il colocalise avec le marquage d'IGF2 au niveau du site de la lésion primaire (Walter et al., 1999), mais la morphologie des fibres IGF2-positives que nous avons observées dans les ventricules latéraux ne ressemble pas vraiment à celle des astrocytes. D'après nos recherches bibliographiques, la structure des fibres IGF2-positives nous mènerait à penser qu'elles pourraient être des épendymocytes vimentine-positifs (Kirik et al., 2016). La présence de ces cellules augmente après une ischémie expérimentale et l'on peut voir des prolongements qui en émanent jusqu'à la zone lésée (Korzhevskii et al., 2008; Wan et al., 2016). Il est ainsi estimé que ces cellules joueraient un rôle dans la neuroréparation. Nous avons ainsi tenté de réaliser un co-immunomarquage vimentine/IGF2 afin de déterminer s'il y avait co-localisation mais nous n'avons malheureusement pas réussi à observer de marquage vimentine immunopositif dans nos conditions d'immunohistochimie IGF2. Ainsi, des co-marquages IGF2/vimentine et IGF2/GFAP seraient intéressants à réaliser pour mieux comprendre, du point de vue cellulaire, ce qu'il advient au niveau des ventricules suite à un TC.

2.2 Pertinence des deux groupes contrôles, naïf et sham

Dans la littérature sur le modèle d'impact cortical contrôlé, le contrôle utilisé est le plus souvent un groupe de témoins opérés (sham) ayant subi la craniotomie sans l'impact. Nos résultats montrent qu'il est fondamental d'utiliser en plus un groupe naïf, la chirurgie en elle-même ayant des effets très intéressants.

Tout d'abord, les souris sham présentent un certain déficit à long terme de la mémoire d'extinction, suggérant la fragilité de cette mémoire. Les données supplémentaires de notre premier article (Figure supplémentaire 3B), montrent également que les souris sham ont une tendance à adopter des comportements de prise de risque, révélée par le temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé. De plus, leur performance dans le test de Barnes n'est pas identique à celle des souris naïves (Figures supplémentaires 3C, 4A et 4B) : le premier jour ils mettent moins de temps à atteindre la cible, et ils parcourent plus de distance et emploient une stratégie différente le troisième jour. Ainsi, d'un point de vue comportemental, la chirurgie n'est pas neutre, un résultat qui a déjà fait polémique (Cole et al., 2011).

Ces effets de la craniotomie sont d'ailleurs à l'origine des diminutions statistiquement significatives de la MBP chez les souris TC, mises en évidence dans notre premier article (cortex retrosplénial, hippocampe, thalamus, amygdale ; Figure 4B et 4E). La diminution de la MBP chez les souris TC n'était significative que vis-à-vis des animaux sham, qui eux tendaient à montrer des niveaux de MBP augmentés relativement aux souris naïves. L'explication derrière ce phénomène pourrait se trouver dans notre deuxième article. À court terme post-chirurgie, l'augmentation d'IGF1 dans le cerveau était plus robuste chez les animaux sham que les animaux TC et ces premiers présentaient même des augmentations d'IGF1 à des sites neuroanatomiques où les animaux TC n'en avaient pas. Nous avons déjà discuté de l'importance d'IGF1 dans l'oligodendrogenèse et donc le maintien de la production de substance blanche (Aberg et al., 2006; Butovsky et al., 2006b; Suh et al., 2013; Ye et al., 2002 ; chapitre 1, section 4.3.1 et chapitre 3 section 6.5). On pourrait supposer que la balance dégénérescence / neuroréparation penche vers la neuroréparation pour les souris sham dont l'atteinte est moins sévère et qui bénéficient donc d'une meilleure réponse IGF1 suite à l'agression cérébrale induite par la craniotomie. Pour les souris TC en revanche, l'agression étant plus sévère et la réponse d'IGF1 plus faible, la balance penche plutôt vers la dégénérescence. Au vu des résultats

d'IGF1, l'absence d'effet sham sur l'IGF2 central nous a surpris. Nous aurions pu nous attendre à un niveau de redistribution du marquage IGF2 intermédiaire entre celui des animaux naïfs et TC. L'explication pourrait se trouver dans la réponse inflammatoire. Celle-ci est moins forte à la suite de la craniotomie (Lagraoui et al., 2012) et la production et sécrétion d'IGF1 est inhibée par l'inflammation (Fan et al., 1996; Suh et al., 2013), tandis que la production d'IGF2 est elle stimulée par l'inflammation (Suh et al., 2013). Ainsi, l'environnement inflammatoire intense présent chez les souris TC retarderait la neuroréparation IGF1-dépendante et donc la récupération de la substance blanche, ce qui serait moins le cas chez les souris sham. Trois semaines post-TC, la réponse inflammatoire ayant diminué (Lagraoui et al., 2012), les niveaux d'IGF1 augmentent chez les animaux TC, mais pas chez les souris sham qui ont réalisé à ce stade l'essentiel de la neuroréparation. Les recherches futures devraient s'intéresser à la réponse inflammatoire parallèlement à la réponse neurotrophique, pour mieux comprendre leur interaction. Ceci pourrait fournir une stratégie thérapeutique permettant d'intervenir après le TC, en jouant sur la balance inflammation / neuroréparation, au moment le plus approprié.

2.3 Variation des facteurs trophiques en relation avec le comportement de peur

Plus en lien avec les comportements de type ESPT et la mémoire de peur, le résultat concernant la diminution des exons activité-dépendants du *Bdnf* dans le CPF est particulièrement intéressant. L'extinction augmente l'expression des exons I et IV (Bredy et al., 2007), suggérant que nous observons ici un effet du TC qui pourrait avoir un impact sur la réponse BDNF post-extinction. En effet, au vu de l'importance de ces exons dans le processus d'extinction (Hill et al., 2016), le déficit observé dans cette étude au niveau du CPF (Article 1, Figure 5C) pourrait être à l'origine d'une consolidation labile de la mémoire d'extinction, qui causerait à long terme une résurgence de la mémoire de peur.

La diminution de l'IGF1 périphérique suite à la procédure de stress est tout aussi intéressante. Un résultat similaire avait déjà été rapporté précédemment (Santi et al., 2018b), et les auteurs avaient montré dans cet article une corrélation négative entre les

niveaux circulants d'IGF1 et le profil anxieux des souris dans le labyrinthe en croix surélevé. Ces mêmes auteurs avaient aussi observé une corrélation similaire chez des patients, les individus les plus vulnérables au stress ayant des niveaux périphériques d'IGF1 plus faibles (Santi et al., 2018b). Il serait donc intéressant de reproduire la méthodologie de notre premier article étudiant le devenir à long-terme de la rétention de la mémoire d'extinction suite au TC. En réalisant des mesures répétées des niveaux périphériques d'IGF1 après le TC, il se pourrait que l'on puisse utiliser ce paramètre pour prédire un éventuel déficit d'extinction. C'est peut-être aussi le cas de l'IGF2 périphérique qui, comme nous l'avons vu, répond spécifiquement à un double stress (physique + psychogénique). De plus, l'IGF2 a plus souvent été impliqué que l'IGF1 dans les processus de mémoire de peur (voir chapitre 3, sections 6.4 et 7.3.1). Aussi, étant donné que nous avons montré que l'IGF1 diminue en réponse au stress, il se pourrait également que celui-ci puisse être un marqueur utile en lien avec l'évolution d'une thérapie d'extinction. Expérimentalement, en exposant l'animal à de très nombreuses séances successives d'extinction de la peur, une absence de diminution d'IGF1 suite à l'exposition au CS seul pourrait indiquer une extinction complète de la mémoire de peur conditionnée.

2.4 Épigénétique des facteurs trophiques

Le moins que l'on puisse dire de nos résultats épigénétiques est qu'ils sont plutôt étonnants. Nous n'avons trouvé des modifications des niveaux de méthylation des promoteurs du *Bdnf* chez les animaux TC que pour l'exon I du cortex pariétal ipsilatéral. Étant donné que les niveaux d'expression de l'exon IV diminuaient de façon comparable à l'exon I, nous nous attendions à ce que le promoteur de celui-ci soit également plus méthylé. Il est aussi déroutant de ne pas trouver de marque épigénétique associée aux altérations des exons I et IV dans le CPF. Cela pourrait venir du fait que la technique employée pour étudier la méthylation, le MeDIP (voir Matériel et Méthodes, section 7), introduit beaucoup de variabilité (la sonication de l'ADN est notoirement peu reproductible et les billes magnétiques précipitent spontanément, faisant varier leur quantité exacte par échantillon). Une autre hypothèse concerne le locus amplifié que nous avons choisi. Il ne serait peut-être pas situé à un endroit optimal en relation avec le promoteur. En d'autres termes, des altérations auraient pu être observées à d'autres loci

du Bdnf. En effet, les loci des promoteurs que nous avons choisis étaient les mêmes que ceux employés dans un article précédent (Bredy et al., 2007). Bredy et al. (2007) avaient obtenus leurs résultats dans le contexte de l'extinction de la peur indicée, mais il est envisageable, même si cela est difficile à comprendre, que le locus ciblé dans leur cas n'était pas sensible à l'agression cérébrale dans notre modèle de comorbidité TC / stress traumatique (Bredy et al., 2007). Il reste que les mécanismes épigénétiques génèrent très souvent des résultats extrêmement difficiles à expliquer, comme nous allons le voir dans le cas de l'Igf1.

Lors de l'étude de la méthylation de la région promotrice de l'Igf1, nous avons trouvé une augmentation de celle-ci dans l'hippocampe des animaux TC, sans altération dans le cortex pariétal. Ce résultat va dans le même sens que les variations de la protéine IGF1, importantes dans l'hippocampe, mais pas dans le cortex pariétal. Ce résultat reste cependant surprenant, car nous aurions pu nous attendre à un effet dans le cortex pariétal au vu de l'augmentation des ARNm observée dans cette région. Ce qui est également surprenant, c'est la direction des changements de méthylation de l'Igf1 dans l'hippocampe suite au TC. Comme discuté dans le chapitre 3 (section 1.3), la méthylation d'un gène est généralement associée à sa répression, or ici nous constatons que la méthylation du promoteur d'Igf1 est augmentée en parallèle avec son niveau d'expression. Bien que ce résultat soit contre-intuitif, il a déjà été rapporté précédemment (Schober et al., 2012b). Dans un modèle d'impact cortical contrôlé chez le rat, Schober et al. (2012) ont mesuré une augmentation de l'expression des ARNm d'Igf1 simultanément à une augmentation de la méthylation de son promoteur. Malheureusement, cette discordance n'était pas traitée dans la section discussion de leur article (Schober et al., 2012b). En revanche, lorsqu'ils ont évalué les niveaux d'acétylation du promoteur, ceux-ci étaient cohérents avec les théories épigénétiques, à savoir que l'acétylation du promoteur augmentait avec l'expression du gène. Ainsi, une meilleure façon de procéder dans les études épigénétiques serait d'évaluer plusieurs marqueurs épigénétiques de façon concomitante afin de tirer une image plus claire des mécanismes sous-tendant des modifications d'expression. Le seul problème avec cette approche est la multiplication du nombre de cohortes nécessaires : les techniques d'immunoprécipitation de la chromatine requises pour l'étude de l'acétylation des histones sont « gourmandes » en tissus. Celles-ci ne nous étaient donc pas accessibles, car nous nous intéressions à des régions du cerveau bien précises et donc peu volumineuses. De plus, et contrairement à la méthylation de l'ADN,

l'acétylation est ciblée sur une histone, et un résidu de celui-ci en particulier (voir chapitre 3, section 1.2.2), si bien qu'il faudrait procéder à une immunoprécipitation par résidu/histone d'intérêt. Nous n'en n'avions pas les moyens dans cette étude. Finalement, la méthylation de l'ADN est bien plus stable post-mortem et l'étude de celle-ci confère l'avantage de pouvoir valider nos marqueurs par rapport à ceux retrouvés chez l'humain.

Concernant nos résultats sur l'expression de Mecp2, Dnmt1 et Dnmt3A, ceux-ci suggèrent que la réorganisation épigénétique post-TC n'est pas importante au point d'altérer les niveaux d'expression de ces gènes. Néanmoins, l'étude de la fixation de la protéine MeCP2 à son site sur l'ADN et de l'activité enzymatique des DNMT serait un meilleur indicateur de ce qui se déroule au niveau épigénétique, et l'absence d'effet du TC observée ici doit donc être interprétée avec précaution. Cependant, et une fois de plus, les études d'activité sont difficilement réalisables chez l'humain post-mortem contrairement à celles de l'expression des gènes.

Pour les études subséquentes, il serait intéressant d'employer des méthodes plus précises quoique plus coûteuses, pour étudier la méthylation (par exemple le séquençage bisulfite, une technique de séquençage qui permet d'obtenir l'information de méthylation sur chacune des bases), et d'évaluer plusieurs modifications épigénétiques simultanément afin de cartographier plus précisément l'état du matériel génétique post-TC.

3. Conclusions et perspectives

Nous avons pu montrer que le TCL expérimental chez la souris induit certaines altérations comportementales comparables à celles observées chez les patients atteints d'ESPT. En somme, nous avons généré un modèle de la vulnérabilité psychiatrique post-TC. Avec ces altérations comportementales, nous avons pu identifier un certain nombre d'irrégularités anatomiques similaires à celles observées chez l'humain atteint de traumatisme crânien. De façon concomitante, nous avons aussi trouvé une modification du niveau d'expression des systèmes neurotrophiques en parallèle avec des modifications épigénétiques.

Ainsi, notre modèle de la vulnérabilité psychiatrique post-TC pourrait être utilisé à la fois en recherche fondamentale pour mieux explorer le lien entre lésions

neuroanatomiques, facteurs trophiques et comportements, ou en recherche appliquée afin de trouver de potentielles stratégies thérapeutiques. Différentes thérapies neuroprotectrices ont déjà été testées après le TC avec des résultats mitigés chez l'humain, les résultats chez l'animal étant plus encourageants. La plus grande difficulté dans l'intervention post-TC est de déterminer précisément le moment auquel agir, une stratégie pouvant se révéler efficace à un moment, et délétère à un autre (Sharma et al., 2010). Il en est de même pour les stratégies visant l'inflammation, celle-ci étant soit bénéfique, soit délétère selon le moment et la distance avec le site lésé. L'étude de la neuroanatomie en relation avec l'évolution post-TC des facteurs trophiques pourrait servir de marqueur biologique permettant de prévoir l'efficacité de ces thérapies.

Nos résultats, combinés à ceux de la littérature, suggèrent un effet délétère de l'inflammation sur la neuroréparation post-TC. Les recherches futures devront étudier la neuroinflammation et la neuroréparation simultanément pour mieux comprendre leurs interactions. Par exemple, différents marqueurs inflammatoires devraient être monitorés en périphérie simultanément aux facteurs neurotrophiques afin de voir s'ils sont corrélés, autant en périphérie qu'au niveau du système nerveux central. Ceci pourrait apporter de l'information sur la fenêtre thérapeutique dans le TC, et donc déterminer à quel moment il faudrait favoriser une stratégie anti-inflammatoire et/ou une stratégie neurotrophique appropriée.

Nous avons apporté des informations concernant le système IGF au court et au long terme après le TC, montrant ainsi que celui-ci évolue à la fois dans le cerveau et la périphérie, et ce pas nécessairement selon nos *a priori*. Même si les mesures ont été réalisées sur des cohortes différentes, le contraste entre les résultats obtenus à 3 jours et ceux obtenus à 3 semaines suggère fortement qu'il existe une transition entre ces deux temps. Dans l'optique de la recherche de marqueurs utiles à but préventif, il pourrait être intéressant de réaliser une étude longitudinale dans le temps des protéines IGF périphériques sur la même cohorte d'animaux en réalisant plusieurs points. Ceci nous permettrait d'avoir une idée de la dynamique du système IGF post-TC, et donc d'augmenter les chances de trouver un point d'inflexion auquel nos paramètres pourraient être utilisés pour prédire les comportements pathologiques.

En conclusion, les différents paramètres que nous avons trouvés altérés dans nos études (substance blanche, modifications neuroanatomiques et facteurs trophiques), en relation avec des comportements de type pathologique dans un modèle translationnel de

vulnérabilité post-TC à l'ESPT, permettront d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans un premier temps, il serait intéressant de déterminer les effets de traitements pharmacologiques reconnus pour l'ESPT, comme certains antidépresseurs, dans notre modèle de comorbidité. Par la suite, ce modèle pourrait permettre de tester des stratégies thérapeutiques plus novatrices comme celles employant des facteurs trophiques, en relation avec des comportements et altérations neuroanatomiques bien précis. Les modèles animaux translationnels permettront d'explorer la fenêtre thérapeutique des différentes options cliniques possibles, et seront ainsi certainement un élément clef de la recherche future de traitements pour les vulnérabilités induites par le TC.

Bibliographie

<https://www.amsbio.com> (2019). Nucleosomes and Histone Proteins.

<https://www.center-tbi.eu> (2019a). TBI statistics report for Europe.

<https://www.center-tbi.eu> (2019b). White matter abnormalities in TBI patients.

<https://www.ensembl.org> (2019). Ensembl genetic database.

<https://www.phys.org> (2019). Novel study on histones provides better understanding of gene regulation.

Aberg, N.D., Brywe, K.G., and Isgaard, J. (2006). Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *Sci World J* 6, 53–80.

Acosta, S.A., Tajiri, N., Shinozuka, K., Ishikawa, H., Grimmig, B., Diamond, D.M., Diamond, D., Sanberg, P.R., Bickford, P.C., Kaneko, Y., et al. (2013). Long-term upregulation of inflammation and suppression of cell proliferation in the brain of adult rats exposed to traumatic brain injury using the controlled cortical impact model. *PLoS ONE* 8, e53376.

Adamo, M.L., Neuenschwander, S., LeRoith, D., and Roberts, C.T. (1993). Structure, expression, and regulation of the IGF-I gene. *Adv Exp Med Biol* 343, 1–11.

Agis-Balboa, R.C., and Fischer, A. (2014). Generating new neurons to circumvent your fears: the role of IGF signaling. *Cell Mol Life Sci* 71, 21–42.

Agis-Balboa, R.C., Arcos-Diaz, D., Wittnam, J., Govindarajan, N., Blom, K., Burkhardt, S., Haladyniak, U., Agbemenyah, H.Y., Zovoilis, A., Salinas-Riester, G., et al. (2011). A hippocampal insulin-growth factor 2 pathway regulates the extinction of fear memories. *EMBO J* 30, 4071–4083.

Agrawal, R., Noble, E., Tyagi, E., Zhuang, Y., Ying, Z., and Gomez-Pinilla, F. (2015). Flavonoid derivative 7,8-DHF attenuates TBI pathology via TrkB activation. *Biochim Biophys Acta* 1852, 862–872.

Ahmed, S., Venigalla, H., Mekala, H.M., Dar, S., Hassan, M., and Ayub, S. (2017). Traumatic brain injury and neuropsychiatric complications. *Indian J Psychol Med* 39, 114–121.

Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K., and Timmusk, T. (2007). Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* 85, 525–535.

Alani, B., Maghsoudi, N., Khatibi, A., Nouredini, M., Asefifar, F., and Shams, J. (2013). Study of the variations in apoptotic factors in hippocampus of male rats with posttraumatic stress disorder. *Adv Biomed Res* 2, 42.

Alberini, C.M., and Chen, D.Y. (2012). Memory enhancement: consolidation, reconsolidation and insulin-like growth factor 2. *Trends Neurosci.* 35, 274–283.

- Aleman, A., and Torres-Alemán, I. (2009). Circulating insulin-like growth factor I and cognitive function: neuromodulation throughout the lifespan. *Prog Neurobiol* 89, 256–265.
- Allard, J.B., and Duan, C. (2018). IGF-binding proteins: why do they exist and why are there so many? *Front Endocrinol* 9.
- An, C., Jiang, X., Pu, H., Hong, D., Zhang, W., Hu, X., and Gao, Y. (2016). Severity-dependent long-term spatial learning-memory impairment in a mouse model of traumatic brain injury. *Transl Stroke Res* 7, 512–520.
- Armstrong, R.C., Mierzwa, A.J., Marion, C.M., and Sullivan, G.M. (2016). White matter involvement after TBI: clues to axon and myelin repair capacity. *Exp Neurol* 275, 328–333.
- Arulsamy, A., Teng, J., Colton, H., Corrigan, F., and Collins-Praino, L. (2018). Evaluation of early chronic functional outcomes and their relationship to pre-frontal cortex and hippocampal pathology following moderate-severe traumatic brain injury. *Behav Brain Res* 348, 127–138.
- Audet, M.-C., and Anisman, H. (2013). Interplay between pro-inflammatory cytokines and growth factors in depressive illnesses. *Front Cell Neurosci* 7, 68.
- Aungst, S.L., Kabadi, S.V., Thompson, S.M., Stoica, B.A., and Faden, A.I. (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.
- Auxéméry, Y., and Mongeau, R. (2017). Traumatismes crâniens et psychiques intriqués : clinique, diagnostique différentiel et neurobiologie. In *Savoir pour soigner : le trouble de stress post-traumatique*, (Villers-lès-Nacy: Garcia R., Canini F., El-Hage W. pour l'ABC des psychotraumas), pp. 298–308.
- Ayer-le Lievre, C., Ståhlbom, P.A., and Sara, V.R. (1991). Expression of IGF-I and -II mRNA in the brain and craniofacial region of the rat fetus. *Development* 111, 105–115.
- Bach, L.A. (2004). The insulin-like growth factor system: towards clinical applications. *Clin Biochem Rev* 25, 155–164.
- Baker-Andresen, D., Flavell, C.R., Li, X., and Bredy, T.W. (2013). Activation of BDNF signaling prevents the return of fear in female mice. *Learn Mem* 20, 237–240.
- Battesti, M., Canini, F., and El Hage, W. (2017). Histoire de l'isolement d'un concept : le traumatisme psychique. In *Savoir pour soigner : le trouble de stress post-traumatique*, (Villers-lès-Nacy: Garcia R., Canini F., El-Hage W. pour l'ABC des psychotraumas), pp. 7–21.
- Baykara, B., Aksu, I., Buyuk, E., Kiray, M., Sisman, A.R., Baykara, B., Dayi, A., Tas, A., Ozdemir, D., Arda, M.N., et al. (2013). Progesterone treatment decreases traumatic brain injury induced anxiety and is correlated with increased serum IGF-1 levels; prefrontal

cortex, amygdala, hippocampus neuron density; and reduced serum corticosterone levels in immature rats. *Biotech Histochem* 88, 250–257.

Benarroch, E.E. (2012). Insulin-like growth factors in the brain and their potential clinical implications. *Neurology* 79, 2148–2153.

Bendlin, B.B., Ries, M.L., Lazar, M., Alexander, A.L., Dempsey, R.J., Rowley, H.A., Sherman, J.E., and Johnson, S.C. (2008). Longitudinal changes in patients with traumatic brain injury assessed with diffusion-tensor and volumetric imaging. *Neuroimage* 42, 503–514.

Bergman, D., Halje, M., Nordin, M., and Engström, W. (2013). Insulin-like growth factor 2 in development and disease: a mini-review. *Gerontology* 59, 240–249.

Bernier, B.E., Lacagnina, A.F., Ayoub, A., Shue, F., Zemelman, B.V., Krasne, F.B., and Drew, M.R. (2017). Dentate gyrus contributes to retrieval as well as encoding: evidence from context fear conditioning, recall, and extinction. *J Neurosci* 37, 6359–6371.

Besson, V.C., Margail, I., Plotkine, M., and Marchand-Verrecchia, C. (2003). Deleterious activation of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in brain after in vivo oxidative stress. *Free Radic Res* 37, 1201–1208.

Besson, V.C., Zsengellér, Z., Plotkine, M., Szabó, C., and Marchand-Verrecchia, C. (2005). Beneficial effects of PJ34 and INO-1001, two novel water-soluble poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors, on the consequences of traumatic brain injury in rat. *Brain Res* 1041, 149–156.

Blechert, J., Michael, T., Vriends, N., Margraf, J., and Wilhelm, F.H. (2007). Fear conditioning in posttraumatic stress disorder: evidence for delayed extinction of autonomic, experiential, and behavioural responses. *Behav Res & Therapy* 45, 2019–2033.

Blumbergs, P.C., Scott, G., Manavis, J., Wainwright, H., Simpson, D.A., and McLean, A.J. (1994). Staining of amyloid precursor protein to study axonal damage in mild head injury. *Lancet* 344, 1055–1056.

Bomyea, J., Matthews, S.C., Buchsbaum, M.S., Spadoni, A.D., Strigo, I.A., and Simmons, A.N. (2017). Neural differences underlying face processing in veterans with TBI and co-occurring TBI and PTSD. *J Affect Disord* 223, 130–138.

Bonne, O., Brandes, D., Gilboa, A., Gomori, J.M., Shenton, M.E., Pitman, R.K., and Shalev, A.Y. (2001). Longitudinal MRI study of hippocampal volume in trauma survivors with PTSD. *Am J Psychiatry* 158, 1248–1251.

Bonnelle, V., Leech, R., Kinnunen, K.M., Ham, T.E., Beckmann, C.F., De Boissezon, X., Greenwood, R.J., and Sharp, D.J. (2011). Default mode network connectivity predicts sustained attention deficits after traumatic brain injury. *J Neurosci* 31, 13442–13451.

Bracko, O., Singer, T., Aigner, S., Knobloch, M., Winner, B., Ray, J., Clemenson, G.D., Suh, H., Couillard-Despres, S., Aigner, L., et al. (2012). Gene expression profiling of neural stem cells and their neuronal progeny reveals IGF2 as a regulator of adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 32, 3376–3387.

- Bredy, T.W., Wu, H., Crego, C., Zellhoefer, J., Sun, Y.E., and Barad, M. (2007). Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learn Mem* 14, 268–276.
- Brewin, C.R. (2011). The nature and significance of memory disturbance in posttraumatic stress disorder. *Annu Rev Clin Psychol* 7, 203–227.
- Bryant, R. (2011). Post-traumatic stress disorder vs traumatic brain injury. *Dial Clin Neurosci* 13, 251.
- Buonora, J.E., Yarnell, A.M., Lazarus, R.C., Mousseau, M., Latour, L.L., Rizoli, S.B., Baker, A.J., Rhind, S.G., Diaz-Arrastia, R., and Mueller, G.P. (2015). Multivariate analysis of traumatic brain injury: development of an assessment score. *Front Neurol* 6, 68.
- Burgdorf, J., Colechio, E.M., Ghoreishi-Haack, N., Gross, A.L., Rex, C.S., Zhang, X., Stanton, P.K., Kroes, R.A., and Moskal, J.R. (2017). IGFBP2 produces rapid-acting and long-lasting effects in rat models of posttraumatic stress disorder via a novel mechanism associated with structural plasticity. *Int J Neuropsychopharmacol* 20, 476–484.
- Butovsky, O., Landa, G., Kunis, G., Ziv, Y., Avidan, H., Greenberg, N., Schwartz, A., Smirnov, I., Pollack, A., Jung, S., et al. (2006a). Induction and blockage of oligodendrogenesis by differently activated microglia in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 116, 905–915.
- Butovsky, O., Ziv, Y., Schwartz, A., Landa, G., Talpalar, A.E., Pluchino, S., Martino, G., and Schwartz, M. (2006b). Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 31, 149–160.
- Bye, N., Carron, S., Han, X., Agyapomaa, D., Ng, S.Y., Yan, E., Rosenfeld, J.V., and Morganti-Kossmann, M.C. (2011). Neurogenesis and glial proliferation are stimulated following diffuse traumatic brain injury in adult rats. *J Neurosci Res* 89, 986–1000.
- Cain, S.W., Chang, A.-M., Vlasac, I., Tare, A., Anderson, C., Czeisler, C.A., and Saxena, R. (2017). Circadian rhythms in plasma brain-derived neurotrophic factor differ in men and women. *J Biol Rhythms* 32, 75–82.
- Cao, P., Maximov, A., and Südhof, T.C. (2011). Activity-dependent IGF-1 exocytosis is controlled by the Ca(2+)-sensor synaptotagmin-10. *Cell* 145, 300–311.
- Cao, Y., Gunn, A.J., Bennet, L., Wu, D., George, S., Gluckman, P.D., Shao, X.-M., and Guan, J. (2003). Insulin-like growth factor (IGF)-1 suppresses oligodendrocyte caspase-3 activation and increases glial proliferation after ischemia in near-term fetal sheep. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 739–747.
- Carlson, S.W., and Saatman, K.E. (2018). Central infusion of insulin-like growth factor-1 increases hippocampal neurogenesis and improves neurobehavioral function after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 35, 1467–1480.
- Carlson, S.W., Madathil, S.K., Sama, D.M., Gao, X., Chen, J., and Saatman, K.E. (2014). Conditional overexpression of insulin-like growth factor-1 enhances hippocampal

neurogenesis and restores immature neuron dendritic processes after traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 73, 734–746.

Carro, E., Trejo, J.L., Busiguina, S., and Torres-Aleman, I. (2001). Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci* 21, 5678–5684.

Castrén, E. (2014). Neurotrophins and psychiatric disorders. *Handb Exp Pharmacol* 220, 461–479.

Cattaneo, A., Cattane, N., Begni, V., Pariante, C.M., and Riva, M.A. (2016). The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders. *Transl Psychiatry* 6, e958.

Cengiz, P., Uluc, K., Kendigelen, P., Akture, E., Hutchinson, E., Song, C., Zhang, L., Lee, J., Budoff, G.E., Meyerand, E., et al. (2011). Chronic neurological deficits in mice after perinatal hypoxia and ischemia correlate with hemispheric tissue loss and white matter injury detected by MRI. *Dev Neurosci* 33, 270–279.

Chang, E.H., Argyelan, M., Aggarwal, M., Chandon, T.-S.S., Karlsgodt, K.H., Mori, S., and Malhotra, A.K. (2017). The role of myelination in measures of white matter integrity: Combination of diffusion tensor imaging and two-photon microscopy of CLARITY intact brains. *Neuroimage* 147, 253–261.

Chen, D.Y., Stern, S.A., Garcia-Osta, A., Saunier-Rebori, B., Pollonini, G., Bambah-Mukku, D., Blitzer, R.D., and Alberini, C.M. (2011). A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature* 469, 491–497.

Cheng, B., and Mattson, M.P. (1992). IGF-I and IGF-II protect cultured hippocampal and septal neurons against calcium-mediated hypoglycemic damage. *J Neurosci* 12, 1558–1566.

Choi, D.C., Maguschak, K.A., Ye, K., Jang, S.-W., Myers, K.M., and Ressler, K.J. (2010). Prelimbic cortical BDNF is required for memory of learned fear but not extinction or innate fear. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 107, 2675–2680.

Chou, W., Liu, Y.-F., Lin, C.-H., Lin, M.-T., Chen, C.-C., Liu, W.-P., Chang, C.-P., and Chio, C.-C. (2018). Exercise rehabilitation attenuates cognitive deficits in rats with traumatic brain injury by stimulating the cerebral HSP20/BDNF/TrkB signalling axis. *Mol Neurobiol* 55, 8602–8611.

Cianfarani, S. (2012). Insulin-like growth factor-II: new roles for an old actor. *Front Endocrinol* 3, 118.

Cohen, I.R., and Schwartz, M. (1999). Autoimmune maintenance and neuroprotection of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 100, 111–114.

Cole, W.R., and Bailie, J.M. (2016). Neurocognitive and psychiatric symptoms following mild traumatic brain injury. In *Translational Research in Traumatic Brain Injury*, D. Laskowitz, and G. Grant, eds. (CRC Press/Taylor and Francis Group), pp. 1–54.

- Cole, J.T., Yarnell, A., Kean, W.S., Gold, E., Lewis, B., Ren, M., McMullen, D.C., Jacobowitz, D.M., Pollard, H.B., O'Neill, J.T., et al. (2011). Craniotomy: true sham for traumatic brain injury, or a sham of a sham? *J Neurotrauma* 28, 359–369.
- Corne, R., Leconte, C., Ouradou, M., Fassina, V., Zhu, Y., Déou, E., Besson, V., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C., and Mongeau, R. (2019). Spontaneous resurgence of conditioned fear weeks after successful extinction in brain injured mice. *Prog Neuropsychopharm Biol Psy* 88, 276–286.
- Corps, K.N., Roth, T.L., and McGavern, D.B. (2015). Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. *JAMA Neurol* 72, 355–362.
- Da Silva Meirelles, L., Simon, D., and Regner, A. (2017). Neurotrauma: the crosstalk between neurotrophins and inflammation in the acutely injured brain. *Int J Mol Sci* 18.
- Dassa, Y., Crosnier, H., Chevignard, M., Viaud, M., Personnier, C., Flechtner, I., Meyer, P., Puget, S., Boddaert, N., Breton, S., et al. (2019). Pituitary deficiency and precocious puberty after childhood severe traumatic brain injury: a long-term follow-up prospective study. *Eur J Endocrinol* 180, 281–290.
- Davies, D.R., Olson, D., Meyer, D.L., Scholl, J.L., Watt, M.J., Manzerra, P., Renner, K.J., and Forster, G.L. (2016). Mild traumatic brain injury with social defeat stress alters anxiety, contextual fear extinction, and limbic monoamines in adult rats. *Front Behav Neurosci* 10, 71.
- Deb, S., Lyons, I., Koutzoukis, C., Ali, I., and McCarthy, G. (1999). Rate of psychiatric illness 1 year after traumatic brain injury. *Am J Psychiatry* 156, 374–378.
- Dent, C.L., Isles, A.R., and Humby, T. (2014). Measuring risk-taking in mice: balancing the risk between seeking reward and danger. *Eur J Neurosci* 39, 520–530.
- Depue, B.E., Olson-Madden, J.H., Smolker, H.R., Rajamani, M., Brenner, L.A., and Banich, M.T. (2014). Reduced amygdala volume is associated with deficits in inhibitory control: a voxel- and surface-based morphometric analysis of comorbid PTSD/mild TBI. *Biomed Res Int* 2014.
- Devoto, C., Arcurio, L., Fetta, J., Ley, M., Rodney, T., Kanefsky, R., and Gill, J. (2017). Inflammation relates to chronic behavioral and neurological symptoms in military personnel with traumatic brain injuries. *Cell Transplant* 26, 1169–1177.
- Dikkes, P., Hawkes, C., Kar, S., and Lopez, M.F. (2007). Effect of kainic acid treatment on insulin-like growth factor-2 receptors in the IGF2-deficient adult mouse brain. *Brain Res* 1131, 77–87.
- Dikmen, S., Machamer, J., Fann, J.R., and Temkin, N.R. (2010). Rates of symptom reporting following traumatic brain injury. *J Int Neuropsychol Soc* 16, 401–411.
- Dixon, C.E., Kochanek, P.M., Yan, H.Q., Schiding, J.K., Griffith, R.G., Baum, E., Marion, D.W., and DeKosky, S.T. (1999). One-year study of spatial memory performance, brain morphology, and cholinergic markers after moderate controlled cortical impact in rats. *J Neurotrauma* 16, 109–122.

Dubiel, R., Callender, L., Dunklin, C., Harper, C., Bennett, M., Kreber, L., Auchus, R., and Diaz-Arrastia, R. (2018). Phase 2 randomized, placebo-controlled Clinical trial of recombinant human growth hormone (rhGH) during rehabilitation from traumatic brain injury. *Front Endocrinol* 9, 520.

Duman, C.H., Schlesinger, L., Terwilliger, R., Russell, D.S., Newton, S.S., and Duman, R.S. (2009). Peripheral insulin-like growth factor-I produces antidepressant-like behavior and contributes to the effect of exercise. *Behav Brain Res* 198, 366–371.

Dwivedi, Y., Rizavi, H.S., Conley, R.R., Roberts, R.C., Tamminga, C.A., and Pandey, G.N. (2003). Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry* 60, 804–815.

Edwards, J.R., Yarychivska, O., Boulard, M., and Bestor, T.H. (2017). DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics Chromatin* 10, 23.

Egan, M.F., Kojima, M., Callicott, J.H., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Bertolino, A., Zaitsev, E., Gold, B., Goldman, D., Dean, M., et al. (2003). The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112, 257–269.

Etkin, A., and Wager, T.D. (2007). Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. *Am J Psychiatry* 164, 1476–1488.

Ezaki, J., Shimada, R., Shibuya, M., and Kibayashi, K. (2016). Hippocampal neuronal degeneration in the traumatic brain injury mouse: non-trivial effect of scalp incision. *Neurol Res* 38, 994–1002.

Failla, M.D., Juengst, S.B., Arenth, P.M., and Wagner, A.K. (2016). Preliminary associations between brain-derived neurotrophic factor, memory impairment, functional cognition, and depressive symptoms following severe TBI. *Neurorehabil Neural Repair* 30, 419–430.

Fan, J., Wojnar, M.M., Theodorakis, M., and Lang, C.H. (1996). Regulation of insulin-like growth factor (IGF)-I mRNA and peptide and IGF-binding proteins by interleukin-1. *Am J Physiol* 270, R621-629.

Fani, N., King, T.Z., Jovanovic, T., Glover, E.M., Bradley, B., Choi, K., Ely, T., Gutman, D.A., and Ressler, K.J. (2012). White matter integrity in highly traumatized adults with and without post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 37, 2740.

Farbota, K.D.M., Sodhi, A., Bendlin, B.B., McLaren, D.G., Xu, G., Rowley, H.A., and Johnson, S.C. (2012). Longitudinal volumetric changes following traumatic brain injury: a tensor-based morphometry study. *J Int Neuropsychol Soc* 18, 1006–1018.

Feeney, C., Sharp, D.J., Hellyer, P.J., Jolly, A.E., Cole, J.H., Scott, G., Baxter, D., Jilka, S., Ross, E., Ham, T.E., et al. (2017). Serum insulin-like growth factor-I levels are associated with improved white matter recovery after traumatic brain injury. *Ann Neurol* 82, 30–43.

- Feng, Y., Ju, Y., Cui, J., and Wang, L. (2017). Bone marrow stromal cells promote neuromotor functional recovery, via upregulation of neurotrophic factors and synapse proteins following traumatic brain injury in rats. *Mol Med Rep* 16, 654–660.
- Fernandez, A.M., and Torres-Alemán, I. (2012). The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci* 13, 225–239.
- Fitzgerald, J.M., DiGangi, J.A., and Phan, K.L. (2018). Functional neuroanatomy of emotion and its regulation in PTSD. *Harv Rev Psychiatry* 26, 116–128.
- Flandreau, E.I., and Toth, M. (2018). Animal models of PTSD: a critical review. *Curr Top Behav Neurosci* 38, 47–68.
- Friess, S.H., Lapidus, J.B., and Brody, D.L. (2015). Decompressive craniectomy reduces white Matter injury after controlled cortical impact in mice. *J Neurotrauma* 32, 791–800.
- Gao, X., and Chen, J. (2013). Moderate traumatic brain injury promotes neural precursor proliferation without increasing neurogenesis in the adult hippocampus. *Exp Neurol* 239, 38–48.
- Gentleman, S.M., Leclercq, P.D., Moyes, L., Graham, D.I., Smith, C., Griffin, W.S.T., and Nicoll, J. a. R. (2004). Long-term intracerebral inflammatory response after traumatic brain injury. *Forensic Sci Int* 146, 97–104.
- Gerhart, J.I., Hall, B.J., Russ, E.U., Canetti, D., and Hobfoll, S.E. (2014). Sleep disturbances predict later trauma-related distress: cross-panel investigation amidst violent turmoil. *Health Psychol* 33, 365–372.
- Gervasoni, N., Aubry, J.-M., Bondolfi, G., Osiek, C., Schwald, M., Bertschy, G., and Karege, F. (2005). Partial normalization of serum brain-derived neurotrophic factor in remitted patients after a major depressive episode. *Neuropsychobiology* 51, 234–238.
- Giannakopoulou, M., Mansour, M., Kazanis, E., Bozas, E., Philpipedis, H., and Stylianopoulou, F. (2000). NMDA receptor mediated changes in IGF-II gene expression in the rat brain after injury and the possible role of nitric oxide. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26, 513–521.
- Gibon, J., and Barker, P.A. (2017). Neurotrophins and proneurotrophins: focus on synaptic activity and plasticity in the brain. *The Neuroscientist* 23, 587–604.
- Gil, S., Caspi, Y., Ben-Ari, I.Z., Koren, D., and Klein, E. (2005). Does memory of a traumatic event increase the risk for posttraumatic stress disorder in patients with traumatic brain injury? A prospective study. *Am J Psychiatry* 162, 963–969.
- Giuliano, S., Talarico, S., Bruno, L., Nicoletti, F.B., Ceccotti, C., and Belfiore, A. (2017). Growth hormone deficiency and hypopituitarism in adults after complicated mild traumatic brain injury. *Endocrine* 58, 115–123.
- Glenn, D.E., Acheson, D.T., Geyer, M.A., Nievergelt, C.M., Baker, D.G., Risbrough, V.B., and MRS-II Team (2017). Fear learning alterations after traumatic brain injury and their role in development of posttraumatic stress symptoms. *Depress Anxiety* 34, 723–733.

- Goodman, J.C., Robertson, C.S., Grossman, R.G., and Narayan, R.K. (1990). Elevation of tumor necrosis factor in head injury. *J Neuroimmunol* *30*, 213–217.
- Greco, T., Hovda, D., and Prins, M. (2013). The effects of repeat traumatic brain injury on the pituitary in adolescent rats. *J Neurotrauma* *30*, 1983–1990.
- Greer, N., Ackland, P., Sayer, N., Spont, M., Taylor, B., MacDonald, R., McKenzie, L., Rosebush, C., and Wilt, T.J. (2019). Relationship of deployment-related mild traumatic brain injury to posttraumatic stress disorder, depressive disorders, substance use disorders, suicidal ideation, and anxiety disorders: a systematic review (Washington (DC): Department of Veterans Affairs (US)).
- Griesbach, G.S., Hovda, D.A., Molteni, R., and Gomez-Pinilla, F. (2002). Alterations in BDNF and synapsin I within the occipital cortex and hippocampus after mild traumatic brain injury in the developing rat: reflections of injury-induced neuroplasticity. *J Neurotrauma* *19*, 803–814.
- Grima, N., Ponsford, J., Rajaratnam, S.M., Mansfield, D., and Pase, M.P. (2016). Sleep disturbances in traumatic brain injury: a meta-analysis. *J Clin Sleep Med* *12*, 419–428.
- Grosheva, M., Nohroudi, K., Schwarz, A., Rink, S., Bendella, H., Sarikcioglu, L., Klimaschewski, L., Gordon, T., and Angelov, D.N. (2016). Comparison of trophic factors' expression between paralyzed and recovering muscles after facial nerve injury. A quantitative analysis in time course. *Exp Neurol* *279*, 137–148.
- Grundy, P.L., Patel, N., Harbuz, M.S., Lightman, S.L., and Sharples, P.M. (2000). Glucocorticoids modulate BDNF mRNA expression in the rat hippocampus after traumatic brain injury. *Neuroreport* *11*, 3381–3384.
- Guan, J., Williams, C.E., Skinner, S.J., Mallard, E.C., and Gluckman, P.D. (1996). The effects of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-2, and des-IGF-1 on neuronal loss after hypoxic-ischemic brain injury in adult rats: evidence for a role for IGF binding proteins. *Endocrinology* *137*, 893–898.
- Guan, J., Bennet, L., Gluckman, P.D., and Gunn, A.J. (2003). Insulin-like growth factor-1 and post-ischemic brain injury. *Prog. Neurobiol.* *70*, 443–462.
- Gubbi, S., Quipildor, G.F., Barzilai, N., Huffman, D.M., and Milman, S. (2018). 40 years of IGF1: IGF1: the Jekyll and Hyde of the aging brain. *J Mol Endocrinol* *61*, T171–T185.
- Guthrie, R.M., and Bryant, R.A. (2006). Extinction learning before trauma and subsequent posttraumatic stress. *Psychosom Med* *68*, 307–311.
- Hall, E.D., Bryant, Y.D., Cho, W., and Sullivan, P.G. (2008). Evolution of post-traumatic neurodegeneration after controlled cortical impact traumatic brain injury in mice and rats as assessed by the De Olmos silver and fluorojade staining methods. *J Neurotrauma* *25*, 235–247.
- Harris, A.P., Lennen, R.J., Brydges, N.M., Jansen, M.A., Pernet, C.R., Whalley, H.C., Marshall, I., Baker, S., Basso, A.M., Day, M., et al. (2016). The role of brain-derived neurotrophic

factor in learned fear processing: an awake rat fMRI study. *Genes Brain Behav* 15, 221–230.

Harvey, A.G., and Bryant, R.A. (2000). Two-year prospective evaluation of the relationship between acute stress disorder and posttraumatic stress disorder following mild traumatic brain injury. *Am J Psychiatry* 157, 626–628.

Hayes, J.P., Logue, M.W., Sadeh, N., Spielberg, J.M., Verfaellie, M., Hayes, S.M., Reagan, A., Salat, D.H., Wolf, E.J., McGlinchey, R.E., et al. (2017a). Mild traumatic brain injury is associated with reduced cortical thickness in those at risk for Alzheimer's disease. *Brain* 140, 813–825.

Hayes, J.P., Hayes, S., Miller, D.R., Lafleche, G., Logue, M.W., and Verfaellie, M. (2017b). Automated measurement of hippocampal subfields in PTSD: evidence for smaller dentate gyrus volume. *J Psychiatr Res* 95, 247–252.

Hayes, J.P., Reagan, A., Logue, M.W., Hayes, S.M., Sadeh, N., Miller, D.R., Verfaellie, M., Wolf, E.J., McGlinchey, R.E., Milberg, W.P., et al. (2018). BDNF genotype is associated with hippocampal volume in mild traumatic brain injury. *Genes Brain Behav* 17, 107–117.

Hazra, A., Macolino, C., Elliott, M.B., and Chin, J. (2014). Delayed thalamic astrocytosis and disrupted sleep–wake patterns in a preclinical model of traumatic brain injury. *J Neurosci Res* 92, 1434–1445.

He, X.-Y., Dan, Q.-Q., Wang, F., Li, Y.-K., Fu, S.-J., Zhao, N., and Wang, T.-H. (2018). Protein network analysis of the serum and their functional implication in patients subjected to traumatic brain injury. *Front Neurosci* 12, 1049.

Heldt, S.A., Stanek, L., Chhatwal, J.P., and Ressler, K.J. (2007). Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol Psy* 12, 656–670.

Herrera, J.J., Bockhorst, K., Kondraganti, S., Stertz, L., Quevedo, J., and Narayana, P.A. (2017). Acute white matter tract damage after frontal mild traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 34, 291–299.

Hicks, R.R., Numan, S., Dhillon, H.S., Prasad, M.R., and Seroogy, K.B. (1997). Alterations in BDNF and NT-3 mRNAs in rat hippocampus after experimental brain trauma. *Brain Res Mol Brain Res* 48, 401–406.

Hill, J.L., Hardy, N.F., Jimenez, D.V., Maynard, K.R., Kardian, A.S., Pollock, C.J., Schloesser, R.J., and Martinowich, K. (2016). Loss of promoter IV-driven BDNF expression impacts oscillatory activity during sleep, sensory information processing and fear regulation. *Transl Psychiatry* 6, e873.

Hinson, H.E., Rowell, S., and Schreiber, M. (2015). Clinical evidence of inflammation driving secondary brain injury: a systematic review. *J Trauma Acute Care Surg* 78, 184–191.

Hirata, T., Cui, Y.J., Funakoshi, T., Mizukami, Y., Ishikawa, Y.-I., Shibasaki, F., Matsumoto, M., and Sakabe, T. (2007). The temporal profile of genomic responses and protein

synthesis in ischemic tolerance of the rat brain induced by repeated hyperbaric oxygen. *Brain Res* 1130, 214–222.

Hohl, A., Ronsoni, M.F., Debona, R., Ben, J., Schwarzbald, M.L., Diaz, A.P., Thais, M.E.R. de O., Linhares, M.N., Latini, A., Prediger, R.D., et al. (2014). Role of hormonal levels on hospital mortality for male patients with severe traumatic brain injury. *Brain Inj* 28, 1262–1269.

Humbel, R.E. (1990). Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem* 190, 445–462.

Hynes, M.A., Van Wyk, J.J., Brooks, P.J., D’Ercole, A.J., Jansen, M., and Lund, P.K. (1987). Growth hormone dependence of somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acids. *Mol Endocrinol* 1, 233–242.

Ignowski, E., Winter, A.N., Duval, N., Fleming, H., Wallace, T., Manning, E., Koza, L., Huber, K., Serkova, N.J., and Linseman, D.A. (2018). The cysteine-rich whey protein supplement, Immunocal®, preserves brain glutathione and improves cognitive, motor, and histopathological indices of traumatic brain injury in a mouse model of controlled cortical impact. *Free Radic Biol Med* 124, 328–341.

Ioachimescu, A.G., Hampstead, B.M., Moore, A., Burgess, E., and Phillips, L.S. (2015). Growth hormone deficiency after mild combat-related traumatic brain injury. *Pituitary* 18, 535–541.

Iwamoto, T., and Ouchi, Y. (2014). Emerging evidence of insulin-like growth factor 2 as a memory enhancer: a unique animal model of cognitive dysfunction with impaired adult neurogenesis. *Rev Neurosci* 25, 559–574.

Izzo, G., Tirelli, A., Angrisani, E., Cannaviello, G., Cannaviello, L., Puzziello, A., Vatrella, A., and Vitale, M. (2016). Pituitary dysfunction and its association with quality of life in traumatic brain injury. *Int J Surg* 28 Suppl 1, S103-108.

Jindal, A., Mahesh, R., Bhatt, S., and Pandey, D. (2017). Molecular modifications by regulating cAMP signaling and oxidant-antioxidant defence mechanisms, produce antidepressant-like effect: A possible mechanism of etazolate aftermaths of impact accelerated traumatic brain injury in rat model. *Neurochem Int* 111, 3–11.

Johnson, V.E., Stewart, W., and Smith, D.H. (2012). Widespread τ and amyloid- β pathology many years after a single traumatic brain injury in humans. *Brain Pathol* 22, 142–149.

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.

Johnson, V.E., Meaney, D.F., Cullen, D.K., and Smith, D.H. (2015). Animal models of traumatic brain injury. *Handb Clin Neurol* 127, 115–128.

Jorge, R.E., Acion, L., Starkstein, S.E., and Magnotta, V. (2007). Hippocampal volume and mood disorders after traumatic brain injury. *Biol Psychiatry* 62, 332–338.

Jovanovic, T., Norrholm, S.D., Fennell, J.E., Keyes, M., Fiallos, A.M., Myers, K.M., Davis, M., and Duncan, E.J. (2009). Posttraumatic stress disorder may be associated with impaired fear inhibition: relation to symptom severity. *Psychiatry Res* 167, 151–160.

Jovanovic, T., Norrholm, S.D., Blanding, N.Q., Davis, M., Duncan, E., Bradley, B., and Ressler, K.J. (2010). Impaired fear inhibition is a biomarker of PTSD but not depression. *Depress Anxiety* 27, 244–251.

Juengst, S.B., Kumar, R.G., Arendt, P.M., and Wagner, A.K. (2014). Exploratory associations with tumor necrosis factor- α , disinhibition and suicidal endorsement after traumatic brain injury. *Brain Behav Immun* 41, 134–143.

Kaczurkin, A.N., Burton, P.C., Chazin, S.M., Manbeck, A.B., Espensen-Sturges, T., Cooper, S.E., Sponheim, S.R., and Lissek, S. (2017). Neural substrates of overgeneralized conditioned fear in PTSD. *Am J Psychiatry* 174, 125–134.

Kalish, H., and Phillips, T.M. (2010). Analysis of neurotrophins in human serum by immunoaffinity capillary electrophoresis (ICE) following traumatic head injury. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878, 194–200.

Kamper, J.E., Pop, V., Fukuda, A., Ajao, D., Hartman, R., and Badaut, J. (2013). Juvenile traumatic brain injury evolves into a chronic brain disorder: behavioral and histological changes over 6 Months. *Exp Neurol* 250, 8–19.

Kaplan, G.B., Vasterling, J.J., and Vedak, P.C. (2010). Brain-derived neurotrophic factor in traumatic brain injury, post-traumatic stress disorder, and their comorbid conditions: role in pathogenesis and treatment. *Behav Pharm* 21, 427–437.

Kaplan, G.B., Leite-Morris, K.A., Wang, L., Rumbika, K.K., Heinrichs, S.C., Zeng, X., Wu, L., Arena, D.T., and Teng, Y.D. (2018). Pathophysiological bases of comorbidity: traumatic brain injury and post-traumatic stress disorder. *J Neurotrauma* 35, 210–225.

Kasai, K., Yamasue, H., Gilbertson, M.W., Shenton, M.E., Rauch, S.L., and Pitman, R.K. (2008). Evidence for acquired pregenual anterior cingulate gray matter loss from a twin study of combat-related posttraumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry* 63, 550–556.

Kashyap, M.P., Roberts, C., Waseem, M., and Tyagi, P. (2018). Drug targets in neurotrophin signaling in the central and peripheral nervous system. *Mol Neurobiol* 55, 6939–6955.

Kasturi, B.S., and Stein, D.G. (2009). Traumatic brain injury causes long-term reduction in serum growth hormone and persistent astrocytosis in the cortico-hypothalamo-pituitary axis of adult male rats. *J Neurotrauma* 26, 1315–1324.

Keifer, O.P., Hurt, R.C., Ressler, K.J., and Marvar, P.J. (2015). The physiology of fear: reconceptualizing the role of the central amygdala in fear learning. *Physiology* 30, 389–401.

Khalin, I., Alyautdin, R., Wong, T.W., Gnanou, J., Kocherga, G., and Kreuter, J. (2016). Brain-derived neurotrophic factor delivered to the brain using poly (lactide-co-

glycolide) nanoparticles improves neurological and cognitive outcome in mice with traumatic brain injury. *Drug Delivery* 23, 3520–3528.

Kikinis, Z., Muehlmann, M., Pasternak, O., Peled, S., Kulkarni, P., Ferris, C., Bouix, S., Rathi, Y., Koerte, I.K., Pieper, S., et al. (2017). Diffusion imaging of mild traumatic brain injury in the impact accelerated rodent model: a pilot study. *Brain Inj* 31, 1376–1381.

Kirik, O.V., Sufieva, D.A., Nazarenkova, A.V., and Korzhevskii, D.E. (2016). Structural organization of the processes of ependymocytes paving the lateral ventricles of the brain. *Neurosci & Behav Phys* 46, 279–283.

Knox, D., George, S.A., Fitzpatrick, C.J., Rabinak, C.A., Maren, S., and Liberzon, I. (2012). Single prolonged stress disrupts retention of extinguished fear in rats. *Learn Mem* 19, 43–49.

Knox, D., Stanfield, B.R., Staib, J.M., David, N.P., Keller, S.M., and DePietro, T. (2016). Neural circuits via which single prolonged stress exposure leads to fear extinction retention deficits. *Learn Mem* 23, 689–698.

Kohno, M., Morales, A.M., Guttman, Z., and London, E.D. (2017). A neural network that links brain function, white-matter structure and risky behavior. *Neuroimage* 149, 15–22.

Korley, F.K., Diaz-Arrastia, R., Wu, A.H.B., Yue, J.K., Manley, G.T., Sair, H.I., Van Eyk, J., Everett, A.D., TRACK-TBI investigators, Okonkwo, D.O., et al. (2016). Circulating brain-derived neurotrophic factor has diagnostic and prognostic value in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 33, 215–225.

Korzhevskii, D.É., Lentsman, M.V., Kirik, O.V., and Otellin, V.A. (2008). Vimentin-immunopositive cells in the rat telencephalon after experimental ischemic stroke. *Neurosci & Behav Phys* 38, 845–848.

Koskela, M., Bäck, S., Vöikar, V., Richie, C.T., Domanskyi, A., Harvey, B.K., and Airavaara, M. (2017). Update of neurotrophic factors in neurobiology of addiction and future directions. *Neurobiol Dis* 97, 189–200.

Kowiański, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waśkow, M., Steliga, A., and Moryś, J. (2018). BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity. *Cell Mol Neurobiol* 38, 579–593.

Kraus, M.F., Susmaras, T., Caughlin, B.P., Walker, C.J., Sweeney, J.A., and Little, D.M. (2007). White matter integrity and cognition in chronic traumatic brain injury: a diffusion tensor imaging study. *Brain* 130, 2508–2519.

Kumar, R., Husain, M., Gupta, R.K., Hasan, K.M., Haris, M., Agarwal, A.K., Pandey, C.M., and Narayana, P.A. (2009). Serial changes in the white matter diffusion tensor imaging metrics in moderate traumatic brain injury and correlation with neuro-cognitive function. *J Neurotrauma* 26, 481–495.

Kumar, R.G., Boles, J.A., and Wagner, A.K. (2015). Chronic inflammation after severe traumatic brain injury: characterization and associations with outcome at 6 and 12 months postinjury. *J Head Trauma Rehabil* 30, 369–381.

- Lagraoui, M., Latoche, J.R., Cartwright, N.G., Sukumar, G., Dalgard, C.L., and Schaefer, B.C. (2012). Controlled cortical impact and craniotomy induce strikingly similar profiles of inflammatory gene expression, but with distinct kinetics. *Front In Neurol* 3, 155.
- Lamb, Y.N., McKay, N.S., Thompson, C.S., Hamm, J.P., Waldie, K.E., and Kirk, I.J. (2015). Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism, human memory, and synaptic neuroplasticity. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci* 6, 97–108.
- Lang, U.E., Hellweg, R., and Gallinat, J. (2004). BDNF serum concentrations in healthy volunteers are associated with depression-related personality traits. *Neuropsychopharm* 29, 795–798.
- Lattal, K.M., Barrett, R.M., and Wood, M.A. (2007). Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction. *Behav Neurosci* 121, 1125–1131.
- LeDoux, J.E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23, 155–184.
- LeDoux, J.E. (2014). Coming to terms with fear. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 111, 2871–2878.
- Lee, N.M., Chae, S.A., and Lee, H.J. (2017). Effects of neural stem cell media on hypoxic injury in rat hippocampal slice cultures. *Brain Res* 1677, 20–25.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., and Hempstead, B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945–1948.
- Leung, A., Yang, E., Lim, M., Metzger-Smith, V., Theilmann, R., Song, D., Lin, L., Tsai, A., and Lee, R. (2018). Pain-related white matter tract abnormalities in mild traumatic brain injury patients with persistent headache. *Mol Pain* 14.
- Levin, N., Kritman, M., Maroun, M., and Akirav, I. (2017). Differential roles of the infralimbic and prelimbic areas of the prefrontal cortex in reconsolidation of a traumatic memory. *Eur Neuropsychopharmacol* 27, 900–912.
- Li, W., Long, J.A., Watts, L., Shen, Q., Liu, Y., Jiang, Z., and Duong, T.Q. (2016). Spatiotemporal changes in diffusion, T2 and susceptibility of white matter following mild traumatic brain injury. *NMR Biomed* 29, 896–903.
- Li, X., Chen, C., Yang, X., Wang, J., Zhao, M.-L., Sun, H., Zhang, S., and Tu, Y. (2017). Acupuncture improved neurological recovery after traumatic brain injury by activating BDNF/TrkB pathway. *Evid Based Complement Alternat Med* 2017, 8460145.
- Lichtenwalner, R.J., Forbes, M.E., Bennett, S.A., Lynch, C.D., Sonntag, W.E., and Riddle, D.R. (2001). Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* 107, 603–613.
- Linnman, C., Zeidan, M.A., Furtak, S.C., Pitman, R.K., Quirk, G.J., and Milad, M.R. (2012). Resting amygdala and medial prefrontal metabolism predicts functional activation of the fear extinction circuit. *Am J Psychiatry* 169, 415–423.

- Lissek, S. (2012). Toward an account of clinical anxiety predicated on basic, neurally mapped mechanisms of Pavlovian fear-learning: the case for conditioned overgeneralization. *Depress Anxiety* 29, 257–263.
- Lissek, S., Bradford, D.E., Alvarez, R.P., Burton, P., Espensen-Sturges, T., Reynolds, R.C., and Grillon, C. (2014). Neural substrates of classically conditioned fear-generalization in humans: a parametric fMRI study. *Soc Cogn Affect Neurosci* 9, 1134–1142.
- Lithgow, K., Chin, A., Debert, C.T., and Kline, G.A. (2018). Utility of serum IGF-1 for diagnosis of growth hormone deficiency following traumatic brain injury and sport-related concussion. *BMC Endocr Disord* 18, 20.
- Livingstone, C. (2013). IGF2 and cancer. *Endocr Relat Cancer* 20, R321-339.
- 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.
- Loane, D.J., Kumar, A., Stoica, B.A., Cabatbat, R., and Faden, A.I. (2014). Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma: association with chronic microglial activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 73, 14–29.
- Logan, A., Gonzalez, A.M., Hill, D.J., Berry, M., Gregson, N.A., and Baird, A. (1994). Coordinated pattern of expression and localization of insulin-like growth factor-II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 in the adult rat brain. *Endocrinology* 135, 2255–2264.
- Logan, S., Pharaoh, G.A., Marlin, M.C., Masser, D.R., Matsuzaki, S., Wronowski, B., Yeganeh, A., Parks, E.E., Premkumar, P., Farley, J.A., et al. (2018). Insulin-like growth factor receptor signaling regulates working memory, mitochondrial metabolism, and amyloid- β uptake in astrocytes. *Mol Metab* 9, 141–155.
- Losoi, H., Silverberg, N.D., Wäljas, M., Turunen, S., Rosti-Otajärvi, E., Helminen, M., Luoto, T.M., Julkunen, J., Öhman, J., and Iverson, G.L. (2016). Recovery from mild traumatic brain injury in previously healthy adults. *J Neurotrauma* 33, 766–776.
- Lubin, F.D., Roth, T.L., and Sweatt, J.D. (2008). Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci* 28, 10576–10586.
- Luo, Y., Kuang, S., Li, H., Ran, D., and Yang, J. (2017). cAMP/PKA-CREB-BDNF signaling pathway in hippocampus mediates cyclooxygenase 2-induced learning/memory deficits of rats subjected to chronic unpredictable mild stress. *Oncotarget* 8, 35558–35572.
- Madathil, S., Evans, H.N., and Saatman, K.E. (2010). Temporal and regional changes in IGF-1/IGF-1R signaling in the mouse brain after traumatic brain Injury. *J Neurotrauma* 27, 95–107.
- Madathil, S.K., Carlson, S.W., Brelsfoard, J.M., Ye, P., D’Ercole, A.J., and Saatman, K.E. (2013). Astrocyte-specific overexpression of insulin-like growth factor-1 protects hippocampal neurons and reduces behavioral deficits following traumatic brain injury in mice. *PLoS ONE* 8, e67204.

- Madathil, S.K., Deng-Bryant, Y., Wilfred, B.S., Leung, L.Y., Gilsdorf, J.S., and Shear, D.A. (2017). Alterations in brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor-1 protein levels after penetrating ballistic-like brain injury in rats. *J Trauma Acute Care Surg* 83, S16–S24.
- Makinde, H.M., Just, T.B., Cuda, C.M., Bertolino, N., Procissi, D., and Schwulst, S.J. (2018). Monocyte depletion attenuates the development of posttraumatic hydrocephalus and preserves white matter integrity after traumatic brain injury. *PLoS ONE* 13, e0202722.
- Mallya, S., Sutherland, J., Pongracic, S., Mainland, B., and Ornstein, T.J. (2015). The manifestation of anxiety disorders after traumatic brain injury: a review. *J Neurotrauma* 32, 411–421.
- Manivannan, S., Makwana, M., Ahmed, A.I., and Zaben, M. (2018). Profiling biomarkers of traumatic axonal injury: from mouse to man. *Clin Neurol Neurosurg* 171, 6–20.
- Marina, D., Klose, M., Nordenbo, A., Liebach, A., and Feldt-Rasmussen, U. (2015). Early endocrine alterations reflect prolonged stress and relate to 1-year functional outcome in patients with severe brain injury. *Eur J Endocrinol* 172, 813–822.
- Marshall, J., Szmydynger-Chodobska, J., Rioult-Pedotti, M.S., Lau, K., Chin, A.T., Kotla, S.K.R., Tiwari, R.K., Parang, K., Threlkeld, S.W., and Chodobski, A. (2017). TrkB-enhancer facilitates functional recovery after traumatic brain injury. *Sci Rep* 7, 10995.
- Marstaller, L., Burianová, H., and Reutens, D.C. (2017). Adaptive contextualization: A new role for the default mode network in affective learning. *Hum Brain Mapp* 38, 1082–1091.
- McKee, A.C., and Robinson, M.E. (2014). Military-related traumatic brain injury and neurodegeneration. *Alzheimers Dement* 10, S242–253.
- Merkel, S.F., Razmpour, R., Lutton, E.M., Tallarida, C.S., Heldt, N.A., Cannella, L.A., Persidsky, Y., Rawls, S.M., and Ramirez, S.H. (2017). Adolescent traumatic brain injury induces chronic mesolimbic neuroinflammation with concurrent enhancement in the rewarding effects of cocaine in mice during adulthood. *J Neurotrauma* 34, 165–181.
- Meyer, D.L., Davies, D.R., Barr, J.L., Manzerra, P., and Forster, G.L. (2012). Mild traumatic brain injury in the rat alters neuronal number in the limbic system and increases conditioned fear and anxiety-like behaviors. *Exp Neurol* 235, 574–587.
- Michopoulos, V., Norrholm, S.D., Stevens, J.S., Glover, E.M., Rothbaum, B.O., Gillespie, C.F., Schwartz, A.C., Ressler, K.J., and Jovanovic, T. (2017). Dexamethasone facilitates fear extinction and safety discrimination in PTSD: a placebo-controlled, double-blind study. *Psychoneuroendocrinology* 83, 65–71.
- Mierzwa, A.J., Marion, C.M., Sullivan, G.M., McDaniel, D.P., and Armstrong, R.C. (2015). Components of myelin damage and repair in the progression of white matter pathology after mild traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 74, 218–232.
- Milad, M.R., Orr, S.P., Lasko, N.B., Chang, Y., Rauch, S.L., and Pitman, R.K. (2008). Presence and acquired origin of reduced recall for fear extinction in PTSD: results of a twin study. *J Psychiatr Res* 42, 515–520.

Milad, M.R., Pitman, R.K., Ellis, C.B., Gold, A.L., Shin, L.M., Lasko, N.B., Zeidan, M.A., Handwerker, K., Orr, S.P., and Rauch, S.L. (2009). Neurobiological basis of failure to recall extinction memory in posttraumatic stress disorder. *Biol Psych* 66, 1075–1082.

Minelli, A., Zanardini, R., Bonvicini, C., Sartori, R., Pedrini, L., Gennarelli, M., and Bocchio-Chiavetto, L. (2011). BDNF serum levels, but not BDNF Val66Met genotype, are correlated with personality traits in healthy subjects. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 261, 323–329.

Mitre, M., Mariga, A., and Chao, M.V. (2017). Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci* 131, 13–23.

Miu, A.C., Cărnuță, M., Vulturar, R., Szekely-Copîndean, R.D., Bîlc, M.I., Chiș, A., Cioară, M., Fernandez, K.C., Szentágotai-Tătar, A., and Gross, J.J. (2017). BDNF Val66Met polymorphism moderates the link between child maltreatment and reappraisal ability. *Genes Brain Behav* 16, 419–426.

Molendijk, M.L., Bus, B. a. A., Spinhoven, P., Penninx, B.W.J.H., Kenis, G., Prickaerts, J., Voshaar, R.C.O., and Elzinga, B.M. (2011). Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in major depressive disorder: state-trait issues, clinical features and pharmacological treatment. *Mol. Psychiatry* 16, 1088–1095.

Molendijk, M.L., van Tol, M.-J., Penninx, B.W.J.H., van der Wee, N.J.A., Aleman, A., Veltman, D.J., Spinhoven, P., and Elzinga, B.M. (2012). BDNF val66met affects hippocampal volume and emotion-related hippocampal memory activity. *Transl Psychiatry* 2, e74.

Montag, C., Reuter, M., Newport, B., Elger, C., and Weber, B. (2008). The BDNF Val66Met polymorphism affects amygdala activity in response to emotional stimuli: evidence from a genetic imaging study. *Neuroimage* 42, 1554–1559.

Mychasiuk, R., Hehar, H., Ma, I., and Esser, M.J. (2015). Dietary intake alters behavioral recovery and gene expression profiles in the brain of juvenile rats that have experienced a concussion. *Front Behav Neurosci* 9, 17.

Nemetz, P.N., Leibson, C., Naessens, J.M., Beard, M., Kokmen, E., Annegers, J.F., and Kurland, L.T. (1999). Traumatic brain injury and time to onset of Alzheimer's disease: a population-based study. *Am J Epidemiol* 149, 32–40.

Niblock, M.M., Brunso-Bechtold, J.K., and Riddle, D.R. (2000). Insulin-like growth factor I stimulates dendritic growth in primary somatosensory cortex. *J Neurosci* 20, 4165–4176.

Niogi, S.N., Mukherjee, P., Ghajar, J., Johnson, C., Kolster, R.A., Sarkar, R., Lee, H., Meeker, M., Zimmerman, R.D., Manley, G.T., et al. (2008). Extent of microstructural white matter injury in postconcussive syndrome correlates with impaired cognitive reaction time: a 3T diffusion tensor imaging study of mild traumatic brain injury. *Am J Neuroradiol* 29, 967–973.

Norrholm, S.D., and Jovanovic, T. (2018). Fear processing, psychophysiology, and PTSD. *Harv Rev Psychiatry* 26, 129–141.

- Norrholm, S.D., Jovanovic, T., Olin, I.W., Sands, L.A., Karapanou, I., Bradley, B., and Ressler, K.J. (2011). Fear extinction in traumatized civilians with posttraumatic stress disorder: relation to symptom severity. *Biol Psychiatry* 69, 556–563.
- Oberbauer, A.M. (2013). The Regulation of IGF-1 Gene Transcription and Splicing during Development and Aging. *Front Endocrinol* 4.
- Ogier, M., Belmeguenai, A., Lieutaud, T., Georges, B., Bouvard, S., Carré, E., Canini, F., and Bezin, L. (2017). Cognitive deficits and inflammatory response resulting from mild-to-moderate traumatic brain injury in rats are exacerbated by repeated pre-exposure to an Innate stress stimulus. *J Neurotrauma* 34, 1645–1657.
- Ogundele, O.M., Ebenezer, P.J., Lee, C.C., and Francis, J. (2017). Stress-altered synaptic plasticity and DAMP signaling in the hippocampus-PFC axis; elucidating the significance of IGF-1/IGF-1R/CaMKII α expression in neural changes associated with a prolonged exposure therapy. *Neuroscience* 353, 147–165.
- Ojo, J.O., Greenberg, M.B., Leary, P., Mouzon, B., Bachmeier, C., Mullan, M., Diamond, D.M., and Crawford, F. (2014). Neurobehavioral, neuropathological and biochemical profiles in a novel mouse model of co-morbid post-traumatic stress disorder and mild traumatic brain injury. *Front Behav Neurosci* 8, 213.
- Okazaki, H., Beppu, H., Mizutani, K., Okamoto, S., and Sonoda, S. (2014). Changes in serum growth factors in stroke rehabilitation patients and their relation to hemiparesis improvement. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 23, 1703–1708.
- Omalu, B.I., DeKosky, S.T., Minster, R.L., Kamboh, M.I., Hamilton, R.L., and Wecht, C.H. (2005). Chronic traumatic encephalopathy in a National Football League player. *Neurosurgery* 57, 128–134.
- Orr, S.P., Metzger, L.J., Lasko, N.B., Macklin, M.L., Peri, T., and Pitman, R.K. (2000). De novo conditioning in trauma-exposed individuals with and without posttraumatic stress disorder. *J Abnorm Psychol* 109, 290–298.
- Ou, L.-C., Yeh, S.-H., and Gean, P.-W. (2010). Late expression of brain-derived neurotrophic factor in the amygdala is required for persistence of fear memory. *Neurobiol Learn Mem* 93, 372–382.
- Oyesiku, N.M., Evans, C.O., Houston, S., Darrell, R.S., Smith, J.S., Fulop, Z.L., Dixon, C.E., and Stein, D.G. (1999). Regional changes in the expression of neurotrophic factors and their receptors following acute traumatic brain injury in the adult rat brain. *Brain Res* 833, 161–172.
- Ozdemir, D., Baykara, B., Aksu, I., Kiray, M., Sisman, A.R., Cetin, F., Dayi, A., Gurpinar, T., Uysal, N., and Arda, M.N. (2012). Relationship between circulating IGF-1 levels and traumatic brain injury-induced hippocampal damage and cognitive dysfunction in immature rats. *Neurosci Lett* 507, 84–89.
- Pai, A., Suris, A.M., and North, C.S. (2017). Posttraumatic stress disorder in the DSM-5: controversy, change, and conceptual considerations. *Behav Sci* 7, 7.

- Pan, W., Banks, W.A., Fasold, M.B., Bluth, J., and Kastin, A.J. (1998). Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology* 37, 1553–1561.
- Pandey, G.N., Ren, X., Rizavi, H.S., Conley, R.R., Roberts, R.C., and Dwivedi, Y. (2008). Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor signalling in post-mortem brain of teenage suicide victims. *Int J Neuropsychopharmacol* 11, 1047–1061.
- Pardo, M., Cheng, Y., Sitbon, Y.H., Lowell, J.A., Grieco, S.F., Worthen, R.J., Desse, S., and Barreda-Diaz, A. (2018). Insulin growth factor 2 (IGF2) as an emergent target in psychiatric and neurological disorders. Review. *Neurosci Res* epub ahead of print.
- Park, H., and Poo, M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 14, 7–23.
- Patel, R., Spreng, R.N., Shin, L.M., and Girard, T.A. (2012). Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and beyond: a meta-analysis of functional neuroimaging studies. *Neurosci Biobehav Rev* 36, 2130–2142.
- Peeters, W., van den Brande, R., Polinder, S., Brazinova, A., Steyerberg, E.W., Lingsma, H.F., and Maas, A.I.R. (2015). Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochir* 157, 1683–1696.
- Pekny, M., and Pekna, M. (2014). Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev* 94, 1077–1098.
- Perry, D.C., Sturm, V.E., Peterson, M.J., Pieper, C.F., Bullock, T., Boeve, B.F., Miller, B.L., Guskiewicz, K.M., Berger, M.S., Kramer, J.H., et al. (2016). Traumatic brain injury is associated with subsequent neurologic and psychiatric disease: a meta-analysis. *J Neurosurg* 124, 511–526.
- Peters, J., Dieppa-Perea, L.M., Melendez, L.M., and Quirk, G.J. (2010). Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic BDNF. *Science* 328, 1288–1290.
- Pillai, A., Kale, A., Joshi, S., Naphade, N., Raju, M.S.V.K., Nasrallah, H., and Mahadik, S.P. (2010). Decreased BDNF levels in CSF of drug-naive first-episode psychotic subjects: correlation with plasma BDNF and psychopathology. *Int J Neuropsychopharmacol* 13, 535–539.
- Piskunov, A., Stepanichev, M., Tishkina, A., Novikova, M., Levshina, I., and Gulyaeva, N. (2016). Chronic combined stress induces selective and long-lasting inflammatory response evoked by changes in corticosterone accumulation and signaling in rat hippocampus. *Metab Brain Dis* 31, 445–454.
- Plassman, B.L., Havlik, R.J., Steffens, D.C., Helms, M.J., Newman, T.N., Drosdick, D., Phillips, C., Gau, B.A., Welsh-Bohmer, K.A., Burke, J.R., et al. (2000). Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology* 55, 1158–1166.

Prasad, K.N., and Bondy, S.C. (2015). Common biochemical defects linkage between post-traumatic stress disorders, mild traumatic brain injury (TBI) and penetrating TBI. *Brain Res* 1599, 103–114.

Puche, J.E., and Castilla-Cortázar, I. (2012). Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency. *J Transl Med* 10, 224.

Qi, L., Xue, X., Sun, J., Wu, Q., Wang, H., Guo, Y., and Sun, B. (2018). The promising effects of transplanted umbilical cord mesenchymal stem cells on the treatment in traumatic brain injury. *J Craniofac Surg* 29, 1689–1692.

Qiu, Q., Jiang, J.-Y., Bell, M., Tsang, B.K., and Gruslin, A. (2007). Activation of endoproteolytic processing of insulin-like growth factor-II in fetal, early postnatal, and pregnant rats and persistence of circulating levels in postnatal life. *Endocrinology* 148, 4803–4811.

Radiske, A., Rossato, J.I., Köhler, C.A., Gonzalez, M.C., Medina, J.H., and Cammarota, M. (2015). Requirement for BDNF in the reconsolidation of fear extinction. *J Neurosci* 35, 6570–6574.

Ragsdale, K.A., Gramlich, M.A., Beidel, D.C., Neer, S.M., Kitsmiller, E.G., and Morrison, K.I. (2018). Does traumatic brain injury attenuate the exposure therapy process? *Behav Ther* 49, 617–630.

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., et al. (2011). Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Ann Neurol* 70, 374–383.

Rao, S., Martínez-Cengotitabengoa, M., Yao, Y., Guo, Z., Xu, Q., Li, S., Zhou, X., and Zhang, F. (2017). Peripheral blood nerve growth factor levels in major psychiatric disorders. *J Psychiatr Res* 86, 39–45.

Rasmussen, P., Brassard, P., Adser, H., Pedersen, M.V., Leick, L., Hart, E., Secher, N.H., Pedersen, B.K., and Pilegaard, H. (2009). Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Experimental Physiology* 94, 1062–1069.

Rattiner, L.M., Davis, M., French, C.T., and Ressler, K.J. (2004a). Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B involvement in amygdala-dependent fear conditioning. *J Neurosci* 24, 4796–4806.

Rattiner, L.M., Davis, M., and Ressler, K.J. (2004b). Differential regulation of brain-derived neurotrophic factor transcripts during the consolidation of fear learning. *Learn Mem* 11, 727–731.

Reger, M.L., Poulos, A.M., Buen, F., Giza, C.C., Hovda, D.A., and Fanselow, M.S. (2012). Concussive brain injury enhances fear learning and excitatory processes in the amygdala. *Biol Psychiatry* 71, 335–343.

Rosas-Vidal, L.E., Do-Monte, F.H., Sotres-Bayon, F., and Quirk, G.J. (2014). Hippocampal-prefrontal BDNF and memory for fear extinction. *Neuropsychopharm* 39, 2161–2169.

Rossini, Z., Nicolosi, F., Koliass, A.G., Hutchinson, P.J., De Sanctis, P., and Servadei, F. (2019). The history of decompressive craniectomy in traumatic brain injury. *Front Neurol* 10, 458.

Rostami, E., Krueger, F., Plantman, S., Davidsson, J., Agoston, D., Grafman, J., and Risling, M. (2014). Alteration in BDNF and its receptors, full-length and truncated TrkB and p75(NTR) following penetrating traumatic brain injury. *Brain Res* 1542, 195–205.

Roth, T.L., Zoladz, P.R., Sweatt, J.D., and Diamond, D.M. (2011). Epigenetic modification of hippocampal Bdnf DNA in adult rats in an animal model of post-traumatic stress disorder. *J Psychiatr Res* 45, 919–926.

Roth, T.L., Nayak, D., Atanasijevic, T., Koretsky, A.P., Latour, L.L., and McGavern, D.B. (2014). Transcranial amelioration of inflammation and cell death following brain injury. *Nature* 505, 223–228.

Rubin, M., Shvil, E., Papini, S., Chhetry, B.T., Helpman, L., Markowitz, J.C., Mann, J.J., and Neria, Y. (2016). Greater hippocampal volume is associated with PTSD treatment response. *Psychiatry Res Neuroimaging* 252, 36–39.

Rusch, H.L., Guardado, P., Baxter, T., Mysliwiec, V., and Gill, J.M. (2015). Improved sleep quality is associated with reductions in depression and PTSD arousal symptoms and increases in IGF-1 concentrations. *J Clin Sleep Med* 11, 615–623.

Rushby, J.A., McDonald, S., Fisher, A.C., Kornfeld, E.J., De Blasio, F.M., Parks, N., and Piguet, O. (2016). Brain volume loss contributes to arousal and empathy dysregulation following severe traumatic brain injury. *Neuroimage Clin* 12, 607–614.

Saatman, K.E., Contreras, P.C., Smith, D.H., Raghupathi, R., McDermott, K.L., Fernandez, S.C., Sanderson, K.L., Voddi, M., and McIntosh, T.K. (1997). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) improves both neurological motor and cognitive outcome following experimental brain injury. *Exp Neurol* 147, 418–427.

Sagarkar, S., Bhamburkar, T., Shelkar, G., Choudhary, A., Kokare, D.M., and Sakharkar, A.J. (2017). Minimal traumatic brain injury causes persistent changes in DNA methylation at BDNF gene promoters in rat amygdala: A possible role in anxiety-like behaviors. *Neurobiol Dis* 106, 101–109.

Sama, D.M., Carlson, S.W., Joseph, B., Saenger, S., Metzger, F., and Saatman, K.E. (2018). Assessment of systemic administration of PEGylated IGF-1 in a mouse model of traumatic brain injury. *Restor Neurol Neurosci* 36, 559–569.

Sandberg Nordqvist, A.C., von Holst, H., Holmin, S., Sara, V.R., Bellander, B.M., and Schalling, M. (1996). Increase of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF binding protein-2 and -4 mRNAs following cerebral contusion. *Brain Res Mol Brain Res* 38, 285–293.

- Santi, A., Genis, L., and Torres Aleman, I. (2018a). A coordinated action of blood-borne and brain insulin-like growth factor I in the response to traumatic brain injury. *Cereb Cortex* 28, 2007–2014.
- Santi, A., Bot, M., Aleman, A., Penninx, B.W.J.H., and Aleman, I.T. (2018b). Circulating insulin-like growth factor I modulates mood and is a biomarker of vulnerability to stress: from mouse to man. *Transl Psychiatry* 8, 142.
- Scheepens, A., Williams, C.E., Breier, B.H., Guan, J., and Gluckman, P.D. (2000). A role for the somatotrophic axis in neural development, injury and disease. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13 Suppl 6, 1483–1491.
- Schimmel, S.J., Acosta, S., and Lozano, D. (2017). Neuroinflammation in traumatic brain injury: a chronic response to an acute injury. *Brain Circ* 3, 135–142.
- Schmeisser, M.J., Baumann, B., Johannsen, S., Vindedal, G.F., Jensen, V., Hvalby, Ø.C., Sprengel, R., Seither, J., Maqbool, A., Magnutzki, A., et al. (2012). IκB kinase/nuclear factor κB-dependent insulin-like growth factor 2 (Igf2) expression regulates synapse formation and spine maturation via Igf2 receptor signaling. *J Neurosci* 32, 5688–5703.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3, 1101–1108.
- Schneider, B.L., Ghoddoussi, F., Charlton, J.L., Kohler, R.J., Galloway, M.P., Perrine, S.A., and Conti, A.C. (2016). Increased cortical gamma-aminobutyric acid precedes incomplete extinction of conditioned fear and increased hippocampal excitatory tone in a mouse model of mild traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 33, 1614–1624.
- Schober, M.E., Block, B., Beachy, J.C., Statler, K.D., Giza, C.C., and Lane, R.H. (2010). Early and sustained increase in the expression of hippocampal IGF-1, but not EPO, in a developmental rodent model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 27, 2011–2020.
- Schober, M.E., Block, B., Requena, D.F., Hale, M.A., and Lane, R.H. (2012a). Developmental traumatic brain injury decreased brain derived neurotrophic factor expression late after injury. *Metab Brain Dis* 27, 167–173.
- Schober, M.E., Ke, X., Xing, B., Block, B.P., Requena, D.F., McKnight, R., and Lane, R.H. (2012b). Traumatic brain injury increased IGF-1B mRNA and altered IGF-1 exon 5 and promoter region epigenetic characteristics in the rat pup hippocampus. *J Neurotrauma* 29, 2075–2085.
- Schultz, D.H., Balderston, N.L., and Helmstetter, F.J. (2012). Resting-state connectivity of the amygdala is altered following Pavlovian fear conditioning. *Front Hum Neurosci* 6, 242.
- Shahmoradi, A., Radyushkin, K., and Rossner, M.J. (2015). Enhanced memory consolidation in mice lacking the circadian modulators Sharp1 and -2 caused by elevated Igf2 signaling in the cortex. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 112, E3582-3589.

- Sharma, A.N., da Costa e Silva, B.F.B., Soares, J.C., Carvalho, A.F., and Quevedo, J. (2016). Role of trophic factors GDNF, IGF-1 and VEGF in major depressive disorder: A comprehensive review of human studies. *J Affect Disord* 197, 9–20.
- Sharma, H.S., Zimmermann-Meinzingen, S., and Johanson, C.E. (2010). Cerebrolysin reduces blood-cerebrospinal fluid barrier permeability change, brain pathology, and functional deficits following traumatic brain injury in the rat. *Ann N Y Acad Sci* 1199, 125–137.
- Sharp, D.J., and Ham, T.E. (2011). Investigating white matter injury after mild traumatic brain injury. *Curr Opin Neurol* 24, 558–563.
- Shucard, J.L., Cox, J., Shucard, D.W., Fetter, H., Chung, C., Ramasamy, D., and Violanti, J. (2012). Symptoms of posttraumatic stress disorder and exposure to traumatic stressors are related to brain structural volumes and behavioral measures of affective stimulus processing in police officers. *Psych Res Neuroim* 204, 25–31.
- Sidaros, A., Engberg, A.W., Sidaros, K., Liptrot, M.G., Herning, M., Petersen, P., Paulson, O.B., Jernigan, T.L., and Rostrup, E. (2008). Diffusion tensor imaging during recovery from severe traumatic brain injury and relation to clinical outcome: a longitudinal study. *Brain* 131, 559–572.
- Siddle, K. (2011). Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J Mol Endocrinol* 47, R1-10.
- Sierra-Mercado, D., McAllister, L.M., Lee, C.C.H., Milad, M.R., Eskandar, E.N., and Whalen, M.J. (2015). Controlled cortical impact before or after fear conditioning does not affect fear extinction in mice. *Brain Res* 1606, 133–141.
- Sijbrandij, M., Engelhard, I.M., Lommen, M.J.J., Leer, A., and Baas, J.M.P. (2013). Impaired fear inhibition learning predicts the persistence of symptoms of posttraumatic stress disorder (PTSD). *J Psychiatr Res* 47, 1991–1997.
- Simon, D., Nascimento, R.I.M. do, Filho, E.M.R., Bencke, J., and Regner, A. (2016). Plasma brain-derived neurotrophic factor levels after severe traumatic brain injury. *Brain Inj* 30, 23–28.
- Singh, R., Meier, T.B., Kuplicki, R., Savitz, J., Mukai, I., Cavanagh, L., Allen, T., Teague, T.K., Nerio, C., Polanski, D., et al. (2014). Relationship of collegiate football experience and concussion with hippocampal volume and cognitive outcomes. *JAMA* 311, 1883–1888.
- Skaper, S.D. (2018). Neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol Biol* 1727, 1–17.
- Smith, C., Gentleman, S.M., Leclercq, P.D., Murray, L.S., Griffin, W.S.T., Graham, D.I., and Nicoll, J. a. R. (2013). The neuroinflammatory response in humans after traumatic brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39, 654–666.
- Smith, D.H., Soares, H.D., Pierce, J.S., Perlman, K.G., Saatman, K.E., Meaney, D.F., Dixon, C.E., and McIntosh, T.K. (1995). A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *J Neurotrauma* 12, 169–178.

Smith, D.H., Chen, X.H., Pierce, J.E., Wolf, J.A., Trojanowski, J.Q., Graham, D.I., and McIntosh, T.K. (1997). Progressive atrophy and neuron death for one year following brain trauma in the rat. *J Neurotrauma* 14, 715–727.

Soliman, F., Glatt, C.E., Bath, K.G., Levita, L., Jones, R.M., Pattwell, S.S., Jing, D., Tottenham, N., Amso, D., Somerville, L.H., et al. (2010). A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human. *Science* 327, 863–866.

Sönmez, A., Sayın, O., Gürgen, S.G., and Çalışır, M. (2015). Neuroprotective effects of MK-801 against traumatic brain injury in immature rats. *Neurosci Lett* 597, 137–142.

Spielberg, J.M., McGlinchey, R.E., Milberg, W.P., and Salat, D.H. (2015). Brain network disturbance related to posttraumatic stress and traumatic brain injury in veterans. *Biol Psychiatry* 78, 210–216.

Starcevic, A., Postic, S., Radojicic, Z., Starcevic, B., Milovanovic, S., Ilankovic, A., Dimitrijevic, I., Damjanovic, A., Aksić, M., and Radonjic, V. (2014). Volumetric analysis of amygdala, hippocampus, and prefrontal cortex in therapy-naive PTSD participants. *Biomed Res Int* 2014.

Stein, M.B., and McAllister, T.W. (2009). Exploring the convergence of posttraumatic stress disorder and mild traumatic brain injury. *Am J Psychiatry* 166, 768–776.

Stern, S.A., Chen, D.Y., and Alberini, C.M. (2014a). The effect of insulin and insulin-like growth factors on hippocampus- and amygdala-dependent long-term memory formation. *Learn Mem* 21, 556–563.

Stern, S.A., Kohtz, A.S., Pollonini, G., and Alberini, C.M. (2014b). Enhancement of memories by systemic administration of insulin-like growth factor II. *Neuropsychopharm* 39, 2179–2190.

Stragier, E. (2014). Ethanol et épigénétique : conséquences neuroplastiques et fonctionnelles chez la souris. U894, Université Paris Descartes.

Stratakis, C.A., Mastorakos, G., Magiakou, M.A., Papavasiliou, E.C., Panitsa-Fafila, C., Georgiadis, E., and Batrinos, M.L. (1996). 24-hour secretion of growth hormone (GH), insulin-like growth factors-I and -II (IGF-I, -II), prolactin (PRL) and thyrotropin (TSH) in young adults of normal and tall stature. *Endocr Res* 22, 261–276.

Stylianopoulou, F., Herbert, J., Soares, M.B., and Efstratiadis, A. (1988). Expression of the insulin-like growth factor II gene in the choroid plexus and the leptomeninges of the adult rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 141–145.

Su, W.-S., Wu, C.-H., Chen, S.-F., and Yang, F.-Y. (2017). Transcranial ultrasound stimulation promotes brain-derived neurotrophic factor and reduces apoptosis in a mouse model of traumatic brain injury. *Brain Stimul* 10, 1032–1041.

Su, X., Xia, C., Wang, W., Sun, H., Tan, Q., Zhang, S., Li, L., Kemp, G.J., Yue, Q., and Gong, Q. (2018). Abnormal metabolite concentrations and amygdala volume in patients with recent-onset posttraumatic stress disorder. *J Affect Disord* 241, 539–545.

- Suh, H.-S., Zhao, M.-L., Derico, L., Choi, N., and Lee, S.C. (2013). Insulin-like growth factor 1 and 2 (IGF1, IGF2) expression in human microglia: differential regulation by inflammatory mediators. *J Neuroinflammation* 10, 37.
- Sullivan, K.A., Kim, B., and Feldman, E.L. (2008). Insulin-like growth factors in the peripheral nervous system. *Endocrinology* 149, 5963–5971.
- Sung, C.-W., Chen, K.-Y., Chiang, Y.-H., Chiu, W.-T., Ou, J.-C., Lee, H.-C., Tsai, S.-H., Lin, J.-W., Yang, C.-M., Tsai, Y.-R., et al. (2016). Heart rate variability and serum level of insulin-like growth factor-1 are correlated with symptoms of emotional disorders in patients suffering a mild traumatic brain injury. *Clin Neurophysiol* 127, 1629–1638.
- Sutton, E.L. (2014). Psychiatric disorders and sleep issues. *Med Clin North Am* 98, 1123–1143.
- Szczygielski, J., Mautes, A.E., Müller, A., Sippl, C., Glameanu, C., Schwerdtfeger, K., Steudel, W.-I., and Oertel, J. (2016). Decompressive craniectomy increases brain lesion volume and exacerbates functional impairment in closed head injury in mice. *J Neurotrauma* 33, 122–131.
- Tagami, M., Ikeda, K., Nara, Y., Fujino, H., Kubota, A., Numano, F., and Yamori, Y. (1997). Insulin-like growth factor-1 attenuates apoptosis in hippocampal neurons caused by cerebral ischemia and reperfusion in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lab Invest* 76, 613–617.
- Taib, T., Leconte, C., Van Steenwinckel, J., Cho, A.H., Palmier, B., Torsello, E., Lai Kuen, R., Onyeomah, S., Ecomard, K., Benedetto, C., et al. (2017). Neuroinflammation, myelin and behavior: Temporal patterns following mild traumatic brain injury in mice. *PLoS One* 12.
- Takei, S., Morinobu, S., Yamamoto, S., Fuchikami, M., Matsumoto, T., and Yamawaki, S. (2011). Enhanced hippocampal BDNF/TrkB signaling in response to fear conditioning in an animal model of posttraumatic stress disorder. *J Psych Res* 45, 460–468.
- Tam, S.L., and Gordon, T. (2003). Mechanisms controlling axonal sprouting at the neuromuscular junction. *J Neurocytol* 32, 961–974.
- Tang, L., Ge, Y., Sodickson, D.K., Miles, L., Zhou, Y., Reaume, J., and Grossman, R.I. (2011). Thalamic resting-state functional networks: disruption in patients with mild traumatic brain injury. *Radiology* 260, 831–840.
- Tate, D.F., and Bigler, E.D. (2000). Fornix and hippocampal atrophy in traumatic brain injury. *Learn Mem* 7, 442–446.
- Tehse, J., and Taghibiglou, C. (2019). The overlooked aspect of excitotoxicity: Glutamate-independent excitotoxicity in traumatic brain injuries. *Eur J Neurosci* 49, 1157–1170.
- Terracciano, A., Lobina, M., Piras, M.G., Mulas, A., Cannas, A., Meirelles, O., Sutin, A.R., Zonderman, A.B., Uda, M., Crisponi, L., et al. (2011). Neuroticism, depressive symptoms, and serum BDNF. *Psychosom Med* 73, 638–642.

Terracciano, A., Piras, M.G., Lobina, M., Mulas, A., Meirelles, O., Sutin, A.R., Chan, W., Sanna, S., Uda, M., Crisponi, L., et al. (2013). Genetics of serum BDNF: meta-analysis of the Val66Met and genome-wide association study. *World J Biol Psychiatry* 14, 583–589.

Teutsch, P., Jones, C.E., Kaiser, M.E., Avalon Gardner, N., and Lim, M.M. (2018). Gait and conditioned fear impairments in a mouse model of comorbid TBI and PTSD. *Behav Neurol* 2018.

Todd, T.P., DeAngeli, N.E., Jiang, M.Y., and Bucci, D.J. (2017). Retrograde amnesia of contextual fear conditioning: Evidence for retrosplenial cortex involvement in configural processing. *Behav Neurosci* 131, 46–54.

Tomaiuolo, F., Carlesimo, G.A., Di Paola, M., Petrides, M., Fera, F., Bonanni, R., Formisano, R., Pasqualetti, P., and Caltagirone, C. (2004). Gross morphology and morphometric sequelae in the hippocampus, fornix, and corpus callosum of patients with severe non-missile traumatic brain injury without macroscopically detectable lesions: a T1 weighted MRI study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75, 1314–1322.

Tomaiuolo, F., Bivona, U., Lerch, J.P., Di Paola, M., Carlesimo, G.A., Ciurli, P., Matteis, M., Cecchetti, L., Forcina, A., Silvestro, D., et al. (2012). Memory and anatomical change in severe non missile traumatic brain injury: ~1 vs. ~8 years follow-up. *Brain Res Bull* 87, 373–382.

Trejo, J.L., Piriz, J., Fernandez, A.M., Bolós, M., LeRoith, D., Nuñez, A., Torres-Aleman, I., and Torres-Aleman, I. (2007). Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects. *Mol Psychiatry* 12, 1118–1128.

Trejo, J.L., Llorens-Martín, M.V., and Torres-Alemán, I. (2008). The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol Cell Neurosci* 37, 402–411.

Trivedi, M.A., Ward, M.A., Hess, T.M., Gale, S.D., Dempsey, R.J., Rowley, H.A., and Johnson, S.C. (2007). Longitudinal changes in global brain volume between 79 and 409 days after traumatic brain injury: relationship with duration of coma. *J Neurotrauma* 24, 766–771.

Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., and Nestler, E.J. (2007). Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8, 355–367.

Tunc-Ozcan, E., Wert, S.L., Lim, P.H., Ferreira, A., and Redei, E.E. (2018). Hippocampus-dependent memory and allele-specific gene expression in adult offspring of alcohol-consuming dams after neonatal treatment with thyroxin or metformin. *Mol Psychiatry* 23, 1643–1651.

Undurtti, A., Colasurdo, E.A., Sikkema, C.L., Schultz, J.S., Peskind, E.R., Pagulayan, K.F., and Wilkinson, C.W. (2018). Chronic hypopituitarism associated with increased postconcussive symptoms is prevalent after blast-Induced mild traumatic brain injury. *Front Neurol* 9, 72.

Vacchiano, C., and Silva, S. (2017). Characterization of bilateral frontal lobe cerebral oxygen saturation in patients with mild traumatic brain injury. *Nurs Outlook* 65, S36–S43.

- Vaishnavi, S., Rao, V., and Fann, J.R. (2009). Neuropsychiatric problems after traumatic brain injury: unraveling the silent epidemic. *Psychosomatics* 50, 198–205.
- VanElzakker, M.B., Kathryn Dahlgren, M., Caroline Davis, F., Dubois, S., and Shin, L.M. (2014). From Pavlov to PTSD: the extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. *Neurobiol Learn Mem* 113, 3–18.
- Vasterling, J.J., Jacob, S.N., and Rasmusson, A. (2018). Traumatic brain injury and posttraumatic stress disorder: conceptual, diagnostic, and therapeutic considerations in the context of co-occurrence. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 30, 91–100.
- Walter, H.J., Berry, M., Hill, D.J., Cwyfan-Hughes, S., Holly, J.M., and Logan, A. (1999). Distinct sites of insulin-like growth factor (IGF)-II expression and localization in lesioned rat brain: possible roles of IGF binding proteins (IGFBPs) in the mediation of IGF-II activity. *Endocrinology* 140, 520–532.
- Wan, F., Bai, H.-J., Liu, J.-Q., Tian, M., Wang, Y.-X., Niu, X., and Si, Y.-C. (2016). Proliferation and glia-directed differentiation of neural stem cells in the subventricular zone of the lateral ventricle and the migratory pathway to the lesions after cortical devascularization of adult rats. *Biomed Res Int* 2016.
- Wang, G., Shi, Y., Jiang, X., Leak, R.K., Hu, X., Wu, Y., Pu, H., Li, W.-W., Tang, B., Wang, Y., et al. (2015). HDAC inhibition prevents white matter injury by modulating microglia/macrophage polarization through the GSK3 β /PTEN/Akt axis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 112, 2853–2858.
- Wang, W., Shen, M., Sun, K., Wang, Y., Wang, X., Jin, X., Xu, J., Ding, L., and Sun, X. (2018a). Aminoguanidine reverses cognitive deficits and activation of cAMP/CREB/BDNF pathway in mouse hippocampus after traumatic brain injury (TBI). *Brain Inj* 32, 1858–1865.
- Wang, Y.-J., Chen, K.-Y., Kuo, L.-N., Wang, W.-C., Hsu, Y.-W., Wong, H.S.-C., Lin, C.-M., Liao, K.-H., Zhang, Y.-F., Chiang, Y.-H., et al. (2018b). The association between BDNF Val66Met polymorphism and emotional symptoms after mild traumatic brain injury. *BMC Medical Genetics* 19.
- Wangelin, B.C., and Tuerk, P.W. (2015). Taking the pulse of prolonged exposure therapy: physiological reactivity to trauma imagery as an objective measure of treatment response. *Depress Anxiety* 32, 927–934.
- Washington, P.M., Forcelli, P.A., Wilkins, T., Zapple, D.N., Parsadonian, M., and Burns, M.P. (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.
- Weber, M.T., Arena, J.D., Xiao, R., Wolf, J.A., and Johnson, V.E. (2019). CLARITY reveals a more protracted temporal course of axon swelling and disconnection than previously described following traumatic brain injury. *Brain Pathol.* 29, 437–450.

- Werhane, M.L., Evangelista, N.D., Clark, A.L., Sorg, S.F., Bangen, K.J., Tran, M., Schiehser, D.M., and Delano-Wood, L. (2017). Pathological vascular and inflammatory biomarkers of acute- and chronic-phase traumatic brain injury. *Concussion* 2.
- Werner, H., and LeRoith, D. (2014). Insulin and insulin-like growth factor receptors in the brain: physiological and pathological aspects. *Eur Neuropsychopharmacol* 24, 1947–1953.
- Wildburger, R., Zarkovic, N., Leb, G., Borovic, S., Zarkovic, K., and Tatzber, F. (2001). Post-traumatic changes in insulin-like growth factor type 1 and growth hormone in patients with bone fractures and traumatic brain injury. *Wien Klin Wochenschr* 113, 119–126.
- Wilkinson, C.W., Pagulayan, K.F., Petrie, E.C., Mayer, C.L., Colasurdo, E.A., Shofer, J.B., Hart, K.L., Hoff, D., Tarabochia, M.A., and Peskind, E.R. (2012). High prevalence of chronic pituitary and target-organ hormone abnormalities after blast-related mild traumatic brain injury. *Front Neurol* 3, 11.
- Winkelmann, T., Grimm, O., Pohlack, S.T., Nees, F., Cacciaglia, R., Dinu-Biringer, R., Steiger, F., Wicking, M., Ruttorf, M., Schad, L.R., et al. (2016). Brain morphology correlates of interindividual differences in conditioned fear acquisition and extinction learning. *Brain Struct Funct* 221, 1927–1937.
- Winter, H., and Irle, E. (2004). Hippocampal volume in adult burn patients with and without posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 161, 2194–2200.
- Woiciechowsky, C., Schöning, B., Cobanov, J., Lanksch, W.R., Volk, H.-D., and Döcke, W.-D. (2002). Early IL-6 plasma concentrations correlate with severity of brain injury and pneumonia in brain-injured patients. *J Trauma* 52, 339–345.
- Wu, A., Ying, Z., and Gomez-Pinilla, F. (2014). Dietary strategy to repair plasma membrane after brain trauma: implications for plasticity and cognition. *Neurorehabil Neural Repair* 28, 75–84.
- Wurtz, H., El-Khoury-Malhame, M., Wilhelm, F.H., Michael, T., Beetz, E.M., Roques, J., Reynaud, E., Courtin, J., Khalfa, S., and Herry, C. (2016). Preventing long-lasting fear recovery using bilateral alternating sensory stimulation: a translational study. *Neuroscience* 321, 222–235.
- Xiao, H., Yang, Y., Xi, J.-H., and Chen, Z.-Q. (2015). Structural and functional connectivity in traumatic brain injury. *Neural Regen Res* 10, 2062–2071.
- Xing, C., Yin, Y., Chang, R., Gong, X., He, X., and Xie, Z. (2007). Effects of insulin-like growth factor 1 on synaptic excitability in cultured rat hippocampal neurons. *Exp Neurol* 205, 222–229.
- Xiong, L.-L., Hu, Y., Zhang, P., Zhang, Z., Li, L.-H., Gao, G.-D., Zhou, X.-F., and Wang, T.-H. (2017). Neural stem cell transplantation promotes functional recovery from traumatic brain injury via brain derived neurotrophic factor-mediated neuroplasticity. *Mol Neurobiol* 55, 2696–2711.

- Xu, J., Rasmussen, I.-A., Lagopoulos, J., and Håberg, A. (2007). Diffuse axonal injury in severe traumatic brain injury visualized using high-resolution diffusion tensor imaging. *J Neurotrauma* 24, 753–765.
- Xu, S., Zhuo, J., Racz, J., Shi, D., Roys, S., Fiskum, G., and Gullapalli, R. (2011). Early microstructural and metabolic changes following controlled cortical impact injury in rat: a magnetic resonance imaging and spectroscopy study. *J Neurotrauma* 28, 2091–2102.
- Xu, X., Gao, W., Cheng, S., Yin, D., Li, F., Wu, Y., Sun, D., Zhou, S., Wang, D., Zhang, Y., et al. (2017). Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of atorvastatin in a murine model of traumatic brain injury. *J Neuroinflamm* 14, 167.
- Xuan, W., Agrawal, T., Huang, L., Gupta, G.K., and Hamblin, M.R. (2015). Low-level laser therapy for traumatic brain injury in mice increases brain derived neurotrophic factor (BDNF) and synaptogenesis. *J Biophotonics* 8, 502–511.
- Yan, T., Wang, L., Kuang, W., Xu, J., Li, S., Chen, J., and Yang, Y. (2014). Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism association with antidepressant efficacy: a systematic review and meta-analysis. *Asia Pac Psychiatry* 6, 241–251.
- Ye, P., Li, L., Richards, R.G., DiAugustine, R.P., and D’Ercole, A.J. (2002). Myelination is altered in insulin-like growth factor-I null mutant mice. *J Neurosci* 22, 6041–6051.
- Yin, B., Li, D.-D., Huang, H., Gu, C.-H., Bai, G.-H., Hu, L.-X., Zhuang, J.-F., and Zhang, M. (2019). Longitudinal changes in diffusion tensor imaging following mild traumatic brain injury and correlation with outcome. *Front Neural Circuits* 13, 28.
- Yin, X., Gao, Y., Shi, H.-S., Song, L., Wang, J.-C., Shao, J., Geng, X.-H., Xue, G., Li, J.-L., and Hou, Y.-N. (2016). Overexpression of SIRT6 in the hippocampal CA1 impairs the formation of long-term contextual fear memory. *Sci Rep* 6, 18982.
- Yuh, E.L., Mukherjee, P., Lingsma, H.F., Yue, J.K., Ferguson, A.R., Gordon, W.A., Valadka, A.B., Schnyer, D.M., Okonkwo, D.O., Maas, A.I.R., et al. (2013). Magnetic resonance imaging improves 3-month outcome prediction in mild traumatic brain injury. *Ann Neurol* 73, 224–235.
- Yurgil, K.A., Barkauskas, D.A., Vasterling, J.J., Nievergelt, C.M., Larson, G.E., Schork, N.J., Litz, B.T., Nash, W.P., Baker, D.G., and Marine Resiliency Study Team (2014). Association between traumatic brain injury and risk of posttraumatic stress disorder in active-duty Marines. *JAMA Psychiatry* 71, 149–157.
- Zai, C.C., Manchia, M., De Luca, V., Tiwari, A.K., Chowdhury, N.I., Zai, G.C., Tong, R.P., Yilmaz, Z., Shaikh, S.A., Strauss, J., et al. (2012). The brain-derived neurotrophic factor gene in suicidal behaviour: a meta-analysis. *Int J Neuropsychopharmacol* 15, 1037–1042.
- Zapf, J., Walter, H., and Froesch, E.R. (1981). Radioimmunological determination of insulinlike growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J Clin Invest* 68, 1321–1330.
- Zappaterra, M.W., and Lehtinen, M.K. (2012). The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. *Cell Mol Life Sci* 69, 2863–2878.

- Zhang, Y., Chopp, M., Mahmood, A., Meng, Y., Qu, C., and Xiong, Y. (2012). Impact of inhibition of erythropoietin treatment-mediated neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus on restoration of spatial learning after traumatic brain injury. *Exp Neurol* 235, 336–344.
- Zhao, J., Huynh, J., Hylin, M.J., O'Malley, J.J., Perez, A., Moore, A.N., and Dash, P.K. (2017). Mild traumatic brain injury reduces spine density of projection neurons in the medial prefrontal cortex and impairs extinction of contextual fear memory. *J Neurotrauma* 35, 149–156.
- Zhao, M., Chen, L., Yang, J., Han, D., Fang, D., Qiu, X., Yang, X., Qiao, Z., Ma, J., Wang, L., et al. (2018). BDNF Val66Met polymorphism, life stress and depression: a meta-analysis of gene-environment interaction. *J Affect Disord* 227, 226–235.
- Zhao, S., Yu, A., Wang, X., Gao, X., and Chen, J. (2016). Post-Injury treatment of 7,8-dihydroxyflavone promotes neurogenesis in the hippocampus of the adult mouse. *J Neurotrauma* 33, 2055–2064.
- Zhou, Y., Milham, M.P., Lui, Y.W., Miles, L., Reaume, J., Sodickson, D.K., Grossman, R.I., and Ge, Y. (2012). Default-mode network disruption in mild traumatic brain injury. *Radiology* 265, 882–892.
- Zhou, Y., Kierans, A., Kenul, D., Ge, Y., Rath, J., Reaume, J., Grossman, R.I., and Lui, Y.W. (2013). Mild traumatic brain injury: longitudinal regional brain volume changes. *Radiology* 267, 880–890.
- Zidda, F., Andoh, J., Pohlack, S., Winkelmann, T., Dinu-Biringer, R., Cavalli, J., Ruttorf, M., Nees, F., and Flor, H. (2018). Default mode network connectivity of fear- and anxiety-related cue and context conditioning. *Neuroimage* 165, 190–199.

Annexe 1

Utilisation des psychédéliques en psychiatrie : lien avec les neurotrophines

Rémi Corne* et Raymond Mongeau

CNRS ERL 3649 « Neuroplasticité et thérapies des addictions », UMR-S 1124, Université Paris Descartes, 4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

Reçu le 29 avril 2019

Résumé – Les psychédéliques, souvent appelés hallucinogènes, sont une classe de psychotropes très singulière. Les effets subjectifs et comportementaux qu'ils induisent sont très impressionnants, et malgré leur toxicité potentielle, le risque d'addiction est relativement faible par rapport à la nicotine, l'alcool ou les opiacés. Depuis la découverte des effets antidépresseurs de la kétamine, il existe un regain d'intérêt pour cette classe de molécules. En effet, la psilocybine et l'acide lysergique diéthylamide (LSD) gagnent de la popularité en tant que traitement pour la dépression et l'addiction, la 3,4-méthylènedioxyméthamphétamine (MDMA) pour l'état de stress post-traumatique, et l'ibogaïne pour l'addiction. Malgré des profils pharmacologiques distincts, ces différentes drogues partagent une cinétique d'action similaire : leurs effets thérapeutiques se font ressentir dans les heures suivant l'administration et perdurent au-delà de leur élimination par l'organisme. Ceci suggère des mécanismes plastiques et neurogéniques impliquant entre autres des facteurs trophiques. Cette revue explorera la littérature concernant les effets de ces différents composés sur les neurotrophines, ainsi que les adaptations plastiques qui sont mises en place dans les heures et jours suivant l'administration, afin de comprendre leur potentiel thérapeutique étonnant.

Mots clés : dépression, addiction, BDNF, kétamine, LSD

Abstract - Neurotrophic mechanisms of psychedelic therapy. Psychedelic drugs, often referred to as hallucinogens, are quite distinct from other classes of psychotropic drugs. Although the subjective and behavioral effects they induce are quite dramatic, they possess little addictive potential when compared to nicotine, alcohol or opiates. Since the discovery of ketamine antidepressant effects, there has been growing interest for these molecules. Serotonergic psychedelics such as psilocybin and lysergic acid diethylamide (LSD) are gaining attention as potential treatments for depression and addiction, similarly to 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) for post-traumatic stress disorder (PTSD), and ibogaine for addiction. Although they possess distinct pharmacological profiles, their kinetics of action are quite similar: the therapeutic effects are felt within the hours following administration, and last well beyond drug elimination by the organism. This strongly suggests the induction of neurogenic and plastic mechanisms, including the involvement of trophic factors. This review will explore the literature dealing with the effects of psychedelics on neurotrophins, as well as the plastic adaptations that they induce, in an attempt to understand their surprising therapeutic potential. We will show that although ketamine and serotonergic psychedelics have affinity for very different receptors (NMDA, 5-HT_{2A}), they ultimately initiate similar plastic adaptations in the prefrontal cortex through the involvement of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF). We will see that although MDMA uses the same receptors as serotonergic psychedelics to alleviate PTSD symptoms, its effect on BDNF levels seem paradoxical and quite different. Finally, we show how ibogaine could exert its anti-addictive properties through a completely different neurotrophic factor than other psychedelic drugs, the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). While the current literature concerning the psychiatric applications of psychedelic therapy is encouraging, it remains to be determined whether their benefits could be obtained without their psychotomimetic effects, or concerns over potential toxicity.

Keywords: depression, addiction, BDNF, ketamine, LSD

* Auteur correspondant : remi.corne@gmail.com

Abréviations

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
ATV	Aire tégmentale ventrale
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
CPF	Cortex préfrontal
DMT	Diméthyltryptamine
DOI	2,5 diméthoxy-4-iodoamphétamine
ESPT	État de stress post-traumatique
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
LSD	Acide lysergique diéthylamide
MDMA	3,4 méthylènedioxyméthamphétamine
NAc	Noyau accumbens
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NT	Neurotrophine
SERT	Transporteur de la sérotonine
SNC	Substance noire compacte
TrK	<i>Tropomyosine-related kinase</i>

Définition

Le terme psychédélique est employé différemment selon les auteurs, certains se réfèrent ainsi aux drogues induisant des effets dits « hallucinogènes ». Il en existe trois classes : les psychédéliques sérotoninergiques (acide lysergique diéthylamide ; LSD, psilocybine, diméthyltryptophane ; DMT, 2,5-diméthoxy-4-iodoamphétamine ; DOI et mescaline) dont une des actions pharmacologiques est l'agonisme 5HT_{2A}, les empathogènes (ex : 3,4-méthylènedioxyméthamphétamine, MDMA) dont l'une des propriétés est d'inverser le transporteur de la sérotonine (SERT) tout en ayant un peu d'affinité pour le récepteur 5HT_{2A} et les dissociatifs (kétamine, phénylcyclidine) qui sont principalement des antagonistes des récepteurs glutamatergiques NMDA. Un dernier composé, l'ibogaïne et son métabolite actif la noribogaïne, ont également suscité beaucoup d'attention pour leur efficacité dans le traitement de l'addiction. Ce dernier est plus difficile à catégoriser, car il agit sur tous les récepteurs cités plus haut, mais aussi sur les récepteurs kappa-opioïdes. L'utilisation abusive de substances psychédéliques est associée à des problèmes sociétaux importants du fait de leurs effets aigus sur le comportement, mais aussi de santé à cause de leur potentiel addictif et neurotoxique (ex. MDMA, kétamine). Néanmoins, il existe une littérature croissante sur le potentiel thérapeutique que ces composés auraient pour certains troubles psychiatriques, notamment la dépression, l'état de stress post-traumatique (ESPT) et l'addiction. Ces différents traitements induisent une diminution des symptômes dans les heures qui suivent l'administration, effet thérapeutique qui persiste bien au-delà de l'élimination par l'organisme de ces composés. C'est ce qui a mené la recherche à étudier les mécanismes de plasticité synaptique qui pourraient expliquer cette dynamique, en particulier les systèmes neurotrophiques.

Les systèmes neurotrophiques

La découverte nobélisée des neurotrophines a initialement été effectuée en relation avec leur fonction dans la maturation et le développement des circuits neuronaux (Castrén, 2014). Plus récemment, des études ont mis en évidence leur rôle chez l'adulte, soulignant leur importance pour la compréhension des troubles psychiatriques (Kashyap *et al.*, 2018). Cette famille de petites protéines sécrétées comprend le *nerve growth factor* (NGF), les neurotrophines 3 (NT-3) et 4 (NT-4), et le *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) qui partagent environ 50 % d'homologie de séquence (Kashyap *et al.*, 2018). Les neurotrophines sont synthétisées sous la forme de protéine précurseur avec un prodomaine en N-terminal. Leur clivage aboutit à des neurotrophines matures (Kashyap *et al.*, 2018), qui se lient à l'un des trois récepteurs à *tropomyosine-related kinase* (TrK) : NGF à TrKA, BDNF et NT-4 à TrKB, et NT-3 à TrKC (Park et Poo, 2013). Les proneurotrophines, quant à elles, vont préférentiellement se fixer à p75NTR. La fixation d'une neurotrophine à un récepteur TrK induit un signal protrophique par le recrutement de voies intracellulaires comme la voie mTOR (Skaper, 2018). Cette signalisation est notamment mise en jeu dans la potentialisation à long terme des synapses glutamatergiques impliquées dans l'apprentissage. À l'inverse, l'activation de p75NTR recrute le *nuclear factor- κ B*, les Jun kinases, et d'autres voies de signalisation pro-inflammatoires (Skaper, 2018). Les neurotrophines et la signalisation TrK sont des éléments essentiels dans les phénomènes d'activité et de plasticité synaptique impliqués dans la différenciation et la prolifération cellulaire, et notamment la prolifération des épines dendritiques mise en jeu dans la dépression et son traitement (Gibon et Barker, 2017). Nous parlerons également du *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF), qui n'est pas classé comme une neurotrophine à cause de son origine génétique distincte, mais qui est néanmoins un facteur neurotrophique très impliqué dans la survie et la plasticité neuronale, en particulier pour les neurones dopaminergiques (Lin *et al.*, 1993).

Kétamine, psychiatrie et neurotrophines

L'utilisation de la kétamine en psychiatrie a débuté en l'an 2000 avec la découverte de ses effets bénéfiques sur l'idéation suicidaire : une méta-analyse récente a montré qu'une dose subanesthésique réduit fortement l'idéation suicidaire chez plus de 50 % des patients pendant au moins une semaine (Wilkinson *et al.*, 2018). L'intérêt pour la kétamine s'est ensuite étendu à la dépression : la majorité des études cliniques révèle ses effets antidépresseurs après l'infusion de 0,5 mg/kg i.v. de kétamine pendant 40 minutes, répétée deux fois par semaine sur une période d'une ou plusieurs semaines (Sanacora *et al.*, 2017).

Les effets thérapeutiques se font ressentir dans les heures suivant l'infusion (Berman *et al.*, 2000) et perdurent jusqu'à un mois chez une minorité de patients (Rasmussen *et al.*, 2013). Le temps médian de rechute à la

dépression est de 18 jours et est prédit par la réponse thérapeutique à 4 heures post-infusion (Murrough *et al.*, 2013). L'étude la plus crédible réalisée à ce jour (avec 68 patients) suggère un taux de réponse entre 50 et 70 % avec une diminution moyenne dans l'échelle de dépression MADRS de 15–20 points par rapport à un score de base de 35 (Singh *et al.*, 2016).

Pharmacologie

La kétamine est principalement connue pour son antagonisme aux récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Il se ferait surtout sur les interneurons GABAergiques dont l'activité dans l'hippocampe et le cortex préfrontal (CPF) est réduite par l'administration de kétamine (Krystal *et al.*, 2013). Ceci induit une activation indirecte des neurones glutamatergiques corticaux et une libération de glutamate, activant les récepteurs α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (AMPA). Ces derniers sont essentiels à l'effet antidépresseur de la kétamine puisque la réponse peut être supprimée par l'administration d'un antagoniste AMPA (Autry *et al.*, 2011). De plus, la kétamine est rapidement métabolisée par les isoformes du cytochrome p450 ($t_{1/2} < 3$ h) en plusieurs métabolites qui ont une affinité moindre pour les récepteurs NMDA, mais qui possèdent néanmoins des propriétés antidépressives, impliquant vraisemblablement les récepteurs AMPA (Chaki, 2017). L'activation des récepteurs AMPA recrute l'eEF2 kinase qui désinhibe la synthèse de BDNF, qui à son tour active la voie Akt/mTOR (Krystal *et al.*, 2013). Ces voies de signalisation stimulent la synaptogenèse et la croissance des épines dendritiques dans le CPF et l'hippocampe, qui sont probablement impliquées dans l'effet antidépresseur de la kétamine (Li *et al.*, 2010). C'est d'ailleurs grâce aux travaux menés pour comprendre l'effet rapide de la kétamine dans la dépression que le rôle clé de ces différents éléments de la plasticité synaptique (AMPA, eEF2, BDNF, mTOR) a émergé dans la compréhension des mécanismes antidépresseurs en général (Strasburger *et al.*, 2017).

Effet comportemental de la kétamine via les neurotrophines

Une dose unique de kétamine augmente le nombre d'épines dendritiques des neurones pyramidaux sur la couche 5 du cortex, ainsi que leur fonctionnalité, mesurée par l'augmentation des courants postsynaptiques excitateurs induits par le glutamate. Ces effets sur la plasticité pourraient sous-tendre son action à plus long terme (Duman et Li, 2012).

Dans le CPF, la croissance des épines dendritiques a lieu dans les heures post-injection et suit la chronologie des effets antidépresseurs ressentis par le patient (Duman et Li, 2012). Des résultats similaires ont été obtenus chez le rat grâce à l'infusion intracérébrale de BDNF (Björkholm et Monteggia, 2016). Dans des cultures neuronales, la kétamine favorise la libération de BDNF et des études chez

le rongeur ont montré qu'elle favorise l'activation du récepteur TrKB dans le CPF et l'hippocampe (Rantamäki, 2019). L'augmentation du BDNF dans l'hippocampe est associée à une réduction de l'immobilité dans un test de criblage des antidépresseurs, le test de Porsolt et les auteurs argumentent la pertinence de cet effet dans l'action antidépresseur rapide de la kétamine (Garcia *et al.*, 2008). D'autres auteurs ont montré que les effets antidépresseurs pouvaient être supprimés par une délétion conditionnelle du gène du BDNF (Björkholm et Monteggia, 2016) et que l'infusion d'anticorps anti-BDNF dans la portion ventromédiale du CPF abolissait l'action de la kétamine (Lepack *et al.*, 2014). De plus, les expressions de BDNF et de son récepteur TrKB sont augmentées dans l'hippocampe et diminuées dans le striatum 24 h après une injection de kétamine, un profil identique à celui induit par l'administration chronique d'antidépresseurs (Caffino *et al.*, 2016).

Une première étude sur des patients dépressifs ne montrait pas d'effet de la kétamine sur le BDNF sérique ou de lien entre ce dernier et l'amélioration des symptômes (Machado-Vieira *et al.*, 2009). Néanmoins, des études plus récentes ont montré que l'administration de kétamine augmente les niveaux périphériques de BDNF (mais pas des autres neurotrophines) chez les patients qui répondent au traitement, c'est-à-dire ceux dont les symptômes diminuent de moitié (Rybakowski *et al.*, 2013; Haile *et al.*, 2014). Une autre étude a montré une corrélation avec une augmentation de la qualité du sommeil (mesurée par l'augmentation de l'amplitude des ondes lentes en électro-encéphalographie) et que l'association entre BDNF périphérique et amplitude des ondes lentes n'était présente que chez les patients dont les symptômes étaient améliorés par le traitement (Duncan *et al.*, 2013).

L'importance du BDNF dans ces mécanismes antidépresseurs demande à être mieux établie au niveau préclinique, notamment pour comprendre l'interaction avec le génotype val66met qui conduit à des altérations de la circulation dendritique du BDNF et de sa sécrétion activité-dépendante. Des études animales montrent que les porteurs de ce génotype ont des difficultés d'apprentissage, particulièrement en termes de plasticité synaptique NMDA-dépendante dans l'hippocampe et le CPF médian (Hao *et al.*, 2017). Une étude remarquable induisant ce génotype chez la souris a montré que la réponse antidépresseur de la kétamine était diminuée chez les animaux portant la mutation val66met. Ceci était associé à une absence de la synaptogenèse accompagnant normalement la réponse à la kétamine (Liu *et al.*, 2012). De plus, il a été montré chez l'homme que la réponse antidépresseur était diminuée chez les patients portant le génotype val66met (Laje *et al.*, 2012). Cet allèle est présent dans 30 % de la population et pourrait expliquer que certains individus soient résistants aux traitements antidépresseurs. En psychiatrie, le BDNF est de loin la neurotrophine la plus étudiée en relation avec les effets thérapeutiques, et il y a peu d'études concernant les autres neurotrophines. Néanmoins, une étude chez les utilisateurs dépendants à la kétamine a mis en évidence une

baisse sérique de NGF, comme de BDNF, négativement corrélée à la fréquence de la consommation de kétamine (Ke *et al.*, 2014). En revanche, une augmentation des niveaux de BDNF avait précédemment été montrée sans effet sur le NGF chez des utilisateurs réguliers (Ricci *et al.*, 2011). Des profils d'utilisation distincts pourraient sous-tendre ces résultats contrastés. Du côté animal, l'administration chronique de kétamine induit une diminution des transcrits du NGF et des récepteurs Trka/Trkb dans l'hippocampe, ainsi qu'une augmentation de BDNF et de Nt-3 (Becker *et al.*, 2008).

La littérature actuelle considère que les effets sur le BDNF ne persistent pas au-delà de 24h, contrairement aux améliorations comportementales, suggérant une action à long terme sur la plasticité et la croissance synaptique (Björkholm et Monteggia, 2016). Celle-ci se fait conjointement à des diminutions de production de cytokines pro-inflammatoires et d'espèces réactives à l'oxygène. En effet, les patients dépressifs présentent une élévation de leurs niveaux périphériques d'interleukine 6 (IL-6) et les niveaux périphériques d'IL-6 sont plus élevés chez les individus ayant une réponse antidépresseur à la kétamine. Chez ces répondeurs, l'administration de kétamine induisait une baisse des niveaux d'IL-6 persistant jusqu'à trois jours, sans effets sur les niveaux des non-répondeurs. De plus, chez le rat, l'administration de kétamine réduit les niveaux d'IL-6 dans le CPF et l'hippocampe (Cui *et al.*, 2018). Ces résultats suggèrent que la kétamine agit sur la balance pro/anti-trophique en favorisant les mécanismes neurotrophiques (Robertson *et al.*, 2019).

Quelques études ont également été réalisées pour évaluer les propriétés anti-addictives de la kétamine. En 2002, une étude a montré qu'une dose forte, mais pas une faible dose (2 vs 0,2 mg/kg, i.m.) de kétamine, pouvait induire l'abstinence chez des héroïnomanes avec un taux de 80 % à un mois et 20 % un an plus tard (Krupitsky *et al.*, 2002). Les mêmes auteurs ont reproduit ce résultat en 2007 et montré que des doses répétées permettaient de faire monter ce taux à 50% (Krupitsky *et al.*, 2007). Plus récemment, des résultats remarquables ont été obtenus par Dakwar *et al.* (2017) chez des cocaïnomanes ne souhaitant pas être traités ou atteindre l'abstinence: testés dans un paradigme d'auto-administration de cocaïne 24h après une dose unique de kétamine, ils montraient moins d'intérêt et d'auto-administration de cocaïne, et des tests urinaires ont confirmé une consommation réduite et une diminution des symptômes liés à l'abstinence dans la semaine suivante (Dakwar *et al.*, 2014, 2017). Il existe également une étude montrant des effets bénéfiques pour l'ESPT (Feder *et al.*, 2014), une maladie souvent corrélée à l'addiction.

Néanmoins, les effets indésirables induits par la kétamine comme les symptômes psychotomimétiques, son potentiel addictogène, et sa neurotoxicité augmentent les risques liés à l'usage régulier de cette drogue (Chaki, 2017). Les chercheurs portent maintenant leur intérêt sur les psychédéliques sérotoninergiques qui pourraient avoir un profil plus favorable.

Les psychédéliques sérotoninergiques

Les psychédéliques ont commencé à être employés en psychiatrie dans les années 1950, utilisation qui a perduré jusque dans les années 1960 quand les conséquences sociétales de leurs abus ont commencé à se faire sentir. Des législations très restrictives ont mis fin à leur emploi, y compris à des fins psychiatriques ou de recherche. Depuis les années 1990, la recherche a repris peu à peu avec une accélération dans les années 2000 à la suite des premières études pilotes encourageantes sur l'efficacité de la MDMA pour l'ESPT (Mithoefer *et al.*, 2011) et de la psilocybine pour la dépression (Grob *et al.*, 2011) ainsi que pour l'addiction (Garcia-Romeu *et al.*, 2014). Les similarités thérapeutiques avec l'action de la kétamine ont poussé à explorer l'implication des neurotrophines dans l'action de ces composés psychédéliques.

Psychédéliques sérotoninergiques et neurotrophines

Les études sur les effets thérapeutiques des psychédéliques dans la dépression et l'addiction suggèrent la mise en jeu des récepteurs 5HT_{2A}: ils induiraient une augmentation de la libération de glutamate dans le CPF (Béïque *et al.*, 2007) et il a été postulé qu'ils pourraient générer des augmentations de la signalisation BDNF similaires à celles induites par la kétamine (Baumeister *et al.*, 2014). À l'inverse, les souris mutantes KO pour le BDNF disposent de moins de récepteurs 5HT_{2A} et expriment une réponse comportementale altérée à la suite de l'administration de DOI (Klein *et al.*, 2010). Par ailleurs, le DOI augmente l'expression de BDNF dans le CPF médian (Gewirtz *et al.*, 2002), mais la diminue dans le gyrus dentelé de l'hippocampe (Vaidya *et al.*, 1997). Étonnamment, aucun effet du LSD ou du DOI n'a été trouvé sur la neurogenèse hippocampique, que ce soit en administration chronique ou aiguë (Jha *et al.*, 2008). Néanmoins, sur des neuroblastomes, le DOI favorise l'extension des neurites de façon TrKA- et TrKB-dépendante (Marinova *et al.*, 2017).

Dans l'étude la plus conséquente réalisée à ce jour, Ly *et al.* (2018) ont montré que le LSD, la DMT, la noribogaïne, la psilocybine, le DOI, et dans une moindre mesure la MDMA, favorisent la neuritogénèse et augmentent la densité des épines dendritiques dans des cultures de neurones corticaux de rat, de façon 5HT_{2A}-dépendante. Bien que les niveaux de BDNF ne soient pas modifiés significativement, l'effet de ces psychédéliques sur la synaptogénèse peut être aboli par la co-administration d'un antagoniste TrKB ou de rapamycine, suggérant qu'il nécessite l'activation de la voie mTOR par le biais de la signalisation BDNF-TrKB (Ly *et al.*, 2018). En lien avec une étude précédente dans laquelle Cameron *et al.* (2018) montraient les effets antidépresseurs de la DMT, et mettant en parallèle les effets de la kétamine *in vivo* selon le protocole employé par Li *et al.* (2010), la DMT *in vivo* produit des effets comparables sur la densité des épines dendritiques qui persistent au moins 24h, bien au-delà de la demi-vie de la DMT. Les psychédéliques

sérotoninergiques sont également similaires à la kétamine dans leurs effets sur l'inflammation. Il a été montré qu'ils suppriment les effets pro-inflammatoires induits par le *tumor necrosis factor alpha*, notamment son induction de la cytokine IL-6 et du facteur de transcription *nuclear factor- κ B*, qui stimule les voies pro-inflammatoires (Nichols, 2016). En effet, l'action anti-inflammatoire des psychédéliques sérotoninergiques serait si puissante qu'elle permettrait de supprimer l'asthme et autre symptômes allergiques chez la souris (Nau *et al.*, 2015).

L'ibogaïne dans l'addiction

L'ibogaïne de son côté a suscité beaucoup d'attention pour ses effets anti-addictifs. Chez le rongeur, elle diminue l'auto-administration d'éthanol à 24 h, tout en augmentant les transcrits du GDNF dans une région cérébrale incluant l'ATV (He *et al.*, 2005). Les auteurs ont par la suite montré que cet effet peut être mimé par l'infusion de GDNF dans l'ATV, et aboli par l'administration simultanée d'anticorps anti-GDNF dans l'ATV. En effet, l'ibogaïne favoriserait la production de GDNF dans des cellules de type dopaminergique, induisant un mécanisme de rétrocontrôle positif (He et Ron, 2006). Une étude récente a étudié plus en détail les effets de l'ibogaïne sur le BDNF, le GDNF, et le NGF, 3 h et 24 h après une administration intrapéritonéale (Marton *et al.*, 2019). Une dose élevée d'ibogaïne (induisant des effets anti-addictifs) augmente fortement les transcrits du *Gdnf* dans l'ATV et dans la substance noire compacte (SNc) à 24 h, sans effet à 3 h. Les transcrits NGF et BDNF étaient, quant à eux fortement augmentés dans le CPF, le noyau accumbens (NAc), l'ATV, et la SNc 24 h post-administration, allant jusqu'à être multipliés par 400 pour le BDNF dans le NAc. Étonnamment, les modifications des niveaux protéiques étaient beaucoup plus modestes avec une augmentation du GDNF dans l'ATV seulement, et du pro-BDNF dans le NAc. Puisque le BDNF dans le NAc est connu pour favoriser l'addiction et que le pro-BDNF a des effets inverses à la protéine mature, ces observations restent cohérentes avec les théories actuelles sur le rôle du BDNF dans l'addiction. Paradoxalement, les transcrits de BDNF dans le CPF étaient réduits 3 h post-administration et multipliés par 100 à 24 h, sans effet sur la protéine du BDNF. Ly *et al.* (2018), quant à eux, ont montré des effets synaptogéniques en l'absence de modification du BDNF. Ces résultats suggèrent l'implication du BDNF dans les effets de l'ibogaïne, mais sa pharmacologie (5HT_{2A}, SERT, NMDA, et agoniste kappa-opioïde) complique l'élucidation des mécanismes. En effet, les récepteurs 5HT_{2A} semblent être mis en jeu puisque l'infusion intra-ATV de DMT induit des effets anti-addictifs similaires à ceux de l'ibogaïne (Vargas-Perez *et al.*, 2017) et que les effets synaptogéniques de l'ibogaïne peuvent être bloqués par la kétansérine, un antagoniste 5HT_{2A} (Ly *et al.*, 2018). Néanmoins, ses propriétés anti-addictives sont partiellement abolies par la co-administration de NMDA et d'un antagoniste kappa, suggérant aussi l'implication de ces deux récepteurs (Glick *et al.*, 1997).

3,4-méthylènedioxyamphétamine et neurotrophines

Les hallucinations induites par la MDMA sont légères et concernent moins de la moitié de ses usagers, mais son action sur le récepteur 5HT_{2A} lui vaut d'être classée comme psychédélique. En ce qui concerne ses effets de type thérapeutique, la MDMA est principalement considérée pour sa capacité à potentialiser l'extinction de la peur chez des patients ESPT. Brièvement, les patients ESPT présentent une hypermnésie de leurs souvenirs traumatiques, et une capacité réduite à éteindre la peur qui est associée au souvenir traumatique. Il semblerait que l'aptitude de la MDMA à favoriser l'extinction soit médiée par la sérotonine et les récepteurs 5HT_{2A}, car leur inhibition limite son efficacité (Young *et al.*, 2017). Les effets de cette drogue sur les neurotrophines ne sont pas clairement établis du fait de la variabilité des protocoles et des doses, d'autant plus que les fortes doses et/ou l'administration répétée sont neurotoxiques (Dunlap *et al.*, 2018).

La MDMA augmente les transcrits BDNF dans le CPF, le NAc et l'amygdale (Mouri *et al.*, 2017), et les niveaux de BDNF et NT-3 dans le CPF (Hemmerle *et al.*, 2012). L'augmentation du BDNF dans le CPF semble se prolonger jusqu'à 24 et 48 h (Martínez-Turrillas *et al.*, 2006). Dans le striatum, les niveaux de TrKB augmentent à 24 h (Hemmerle *et al.*, 2012), mais ceux du BDNF diminuent 2 à 3 jours post-administration (Edut *et al.*, 2014). L'hippocampe dans son ensemble ne présente pas de modifications du BDNF (Adori *et al.*, 2010) dans les 24 h, mais une analyse plus fine a mis en évidence des effets différents selon les sous-régions et le temps post-administration (Hemmerle *et al.*, 2012). Néanmoins, une diminution du BDNF dans l'hippocampe apparaît à 24 h (Soleimani Asl *et al.*, 2017) et se maintient jusqu'à 7 jours plus tard (Martínez-Turrillas *et al.*, 2006). Des diminutions de TrKB et NT-4 ont également été trouvées 24 h post-administration (Soleimani Asl *et al.*, 2017).

L'administration chronique (5 jours) de MDMA augmente les niveaux de NT-4 dans le cerveau (Hatami *et al.*, 2010). De plus, les consommateurs réguliers présentent une élévation de leur niveau sérique de BDNF, mais pas de NGF (Angelucci *et al.*, 2010). Des études chez le rat ont mis en évidence une augmentation du BDNF dans l'hippocampe après 4 jours d'administration, mais de manière surprenante celle-ci était associée à une diminution de la densité des épines dendritiques (Abad *et al.*, 2014). Un protocole d'administration chronique espacé avec un traitement par semaine a mis en évidence un effet similaire : une augmentation du BDNF hippocampique 3 mois après la fin du traitement, associée à une diminution de la densité neuronale dans la SNc (Abad *et al.*, 2016).

Ly *et al.* (2018) ont trouvé des effets synaptogéniques 5HT_{2A}-dépendants à la MDMA qui semblent un peu moindres que ceux induits par la kétamine ou les psychédéliques sérotoninergiques. Ceci pourrait expliquer que les emplois thérapeutiques proposés pour la MDMA et les autres psychédéliques soient différents.

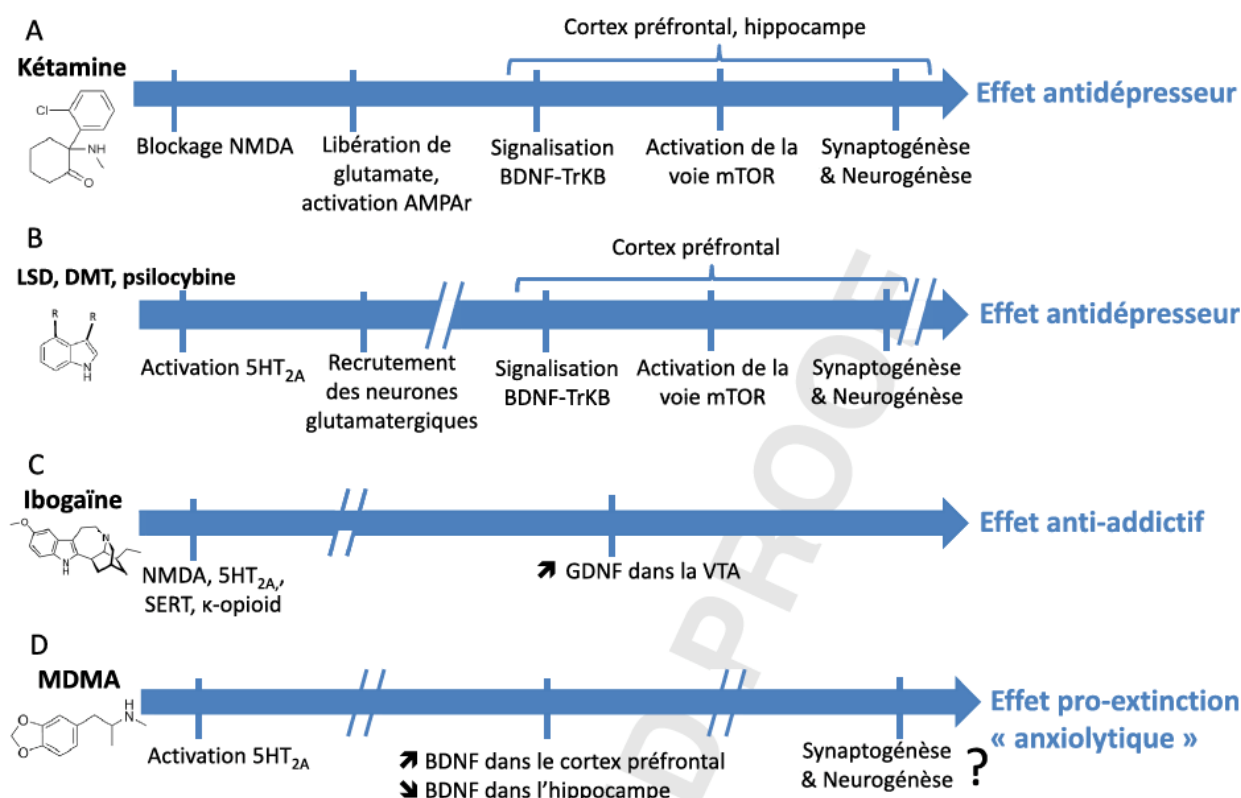


Figure 1. Mécanismes neurotrophiques des psychédéliques.

Conclusions et perspectives

Le premier constat d'importance, à la vue de cette littérature, est que si les psychédéliques sérotoninergiques et la kétamine présentent des profils pharmacologiques très différents, les mécanismes cellulaires menant à leurs effets antidépresseurs sont très similaires. La stimulation des neurones glutamatergiques dans le CPF mène au recrutement de la signalisation BDNF-TrkB, qui induit de la synaptogénèse et la potentialisation à long terme dans le CPF par le biais de la voie mTOR (Fig. 1A et B).

Par contre, en ce qui concerne l'ibogaïne (Fig. 1C), ses effets anti-addictifs mettent en jeu un acteur très différent : le GDNF dans l'ATV, structure cérébrale plus impliquée dans la neurobiologie de l'addiction que de la dépression. Néanmoins, même si l'ibogaïne semble ne pas d'avoir d'effet sur les neurotrophines dans le CPF (Marton *et al.*, 2019), cette région est beaucoup étudiée dans l'addiction (Jadhav et Boutrel, 2018). Étant donné que l'ibogaïne affecte fortement les signalisations dopaminergique et sérotoninergique en lien avec l'addiction dans cette région (Benwell *et al.*, 1996), il serait surprenant qu'elle n'y ait aucun effet trophique. Ceci paraît d'autant plus plausible lorsqu'on met en parallèle l'efficacité thérapeutique, que la kétamine et les psychédéliques sérotoninergiques ont montré dans l'addiction (Dakwar *et al.*, 2014; Johnson *et al.*, 2014), avec leurs effets synaptogéniques dans le CPF.

La MDMA de son côté présente un profil paradoxal (Fig. 1D). Ses effets pro-extinction dans l'ESPT semblent bien passer par le récepteur 5HT_{2A} et la plasticité dans le

CPF, mais contrairement aux psychédéliques classiques, elle semble avoir des effets délétères sur la signalisation neurotrophique dans l'hippocampe. Ceci est associé à des effets disparates sur la plasticité. Quoiqu'il en soit, les résultats obtenus chez l'homme sont très encourageants (Mithoefer *et al.*, 2013). Au vu de la neurobiologie de l'ESPT, on pourrait envisager qu'un « renforcement » du CPF (impliqué dans l'extinction de la peur) associé à un « affaiblissement » de l'hippocampe (impliqué dans la rétention des souvenirs) permettrait de favoriser l'extinction de la peur tout en diminuant la force des souvenirs traumatiques contextuels.

Finalement, si les systèmes neurotrophiques sont clairement impliqués dans la diminution des symptômes dépressifs induite par les psychédéliques, il reste à plus clairement élucider leur rôle pour l'addiction et l'ESPT. Par ailleurs, il faudrait déterminer le lien entre les effets subjectifs aigus induits par ces drogues et le soulagement thérapeutique à long terme. Si certaines lignes d'évidence suggèrent que les effets subjectifs sont corrélés à l'efficacité du traitement (Bogenschutz *et al.*, 2015; Carhart-Harris *et al.*, 2018), les comportements psychotomimétiques induits pourraient poser problème pour l'emploi plus large des psychédéliques et il serait intéressant de voir si les bienfaits peuvent être obtenus sans ces symptômes. Une autre inquiétude à prendre en compte est la toxicité potentielle de certains des psychédéliques (kétamine, MDMA, ibogaïne). Il doit être déterminé si cette toxicité existe aux doses et au long des protocoles employés, car elle pourrait constituer un frein considérable à leur utilisation thérapeutique.

Références

- Abad, S., Fole, A., Del Olmo, N., Pubill, D., Pallàs, M., Junyent, F., Camarasa, J., Camins, A., Escubedo, E. (2014). MDMA enhances hippocampal-dependent learning and memory under restrictive conditions, and modifies hippocampal spine density. *Psychopharmacology*, 231, 863-874.
- Abad, S., Camarasa, J., Pubill, D., Camins, A., Escubedo, E. (2016). Adaptive plasticity in the hippocampus of young mice intermittently exposed to MDMA could be the origin of memory deficits. *Mol Neurobiol*, 53, 7271-7283.
- Adori, C., Andó, R.D., Ferrington, L., Szekeres, M., Vas, S., Kelly, P.A.T., Hunyady, L., Bagdy, G. (2010). Elevated BDNF protein level in cortex but not in hippocampus of MDMA-treated Dark Agouti rats: a potential link to the long-term recovery of serotonergic axons. *Neurosci Lett*, 478, 56-60.
- Angelucci, F., Ricci, V., Martinotti, G., Palladino, I., Spalletta, G., Caltagirone, C., Bria, P. (2010). Ecstasy (MDMA)-addicted subjects show increased serum levels of brain-derived neurotrophic factor, independently from a rise of drug-induced psychotic symptoms. *Addict Biol*, 15, 365-367.
- Autry, A.E., Adachi, M., Nosyreva, E., Na, E.S., Los, M.F., Cheng, P., Kavalali, E.T., Monteggia, L.M. (2011). NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature*, 475, 91-95.
- Baumeister, D., Barnes, G., Giaroli, G., Tracy, D. (2014). Classical hallucinogens as antidepressants? A review of pharmacodynamics and putative clinical roles. *Ther Adv Psychopharmacol*, 4, 156-169.
- Becker, A., Grecksch, G., Schwegler, H., Roskodien, T. (2008). Expression of mRNA of neurotrophic factors and their receptors are significantly altered after subchronic ketamine treatment. *Med Chem Shariqah United Arab Emir*, 4, 256-263.
- Béique, J.-C., Imad, M., Mladenovic, L., Gingrich, J.A., Andrade, R. (2007). Mechanism of the 5-hydroxytryptamine 2A receptor-mediated facilitation of synaptic activity in prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 9870-9875.
- Benwell, M.E., Holtom, P.E., Moran, R.J., Balfour, D.J. (1996). Neurochemical and behavioural interactions between ibogaine and nicotine in the rat. *Br J Pharmacol*, 117, 743-749.
- Berman, R.M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D.A., Heninger, G.R., Charney, D.S., Krystal, J.H. (2000). Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*, 47, 351-354.
- Björkholm, C., Monteggia, L.M. (2016). BDNF – a key transducer of antidepressant effects. *Neuropharmacology*, 102, 72-79.
- Bogenschutz, M.P., Forchimes, A.A., Pommy, J.A., Wilcox, C.E., Barbosa, P.C.R., Strassman, R.J. (2015). Psilocybin-assisted treatment for alcohol dependence: a proof-of-concept study. *J Psychopharmacol*, 29, 289-299.
- Caffino, L., Di Chio, M., Giannotti, G., Venniro, M., Mutti, A., Padovani, L., Cheung, D., Fumagalli, G.F., Yew, D.T., Fumagalli, F., Yew DT, Chiamulera C. (2016). The modulation of BDNF expression and signalling dissects the antidepressant from the reinforcing properties of ketamine: effects of single infusion vs. chronic self-administration in rats. *Pharmacol Res*, 104, 22-30.
- Carhart-Harris, R.L., Bolstridge, M., Day, C.M.J., Rucker, J., Watts, R., Erritzoe, D.E., Kaelen, M., Giribaldi, B., Bloomfield, M., Pilling, S., Rickard J.A., Forbes B., Feilding A., Taylor D., Curran H.V., Nutt D.J. (2018). Psilocybin with psychological support for treatment-resistant depression: six-month follow-up. *Psychopharmacology*, 235, 399-408.
- Castrén, E. (2014). Neurotrophins and psychiatric disorders. *Handb Exp Pharmacol*, 220, 461-479.
- Chaki, S. (2017). Beyond ketamine: new approaches to the development of safer antidepressants. *Curr Neuropharmacol*, 15, 963-976.
- Cui, W., Ning, Y., Hong, W., Wang, J., Liu, Z., Li, M.D. (2018). Crosstalk between inflammation and glutamate system in depression: signaling pathway and molecular biomarkers for ketamine's antidepressant. *Effect Mol Neurobiol*, 56, 3484-3500.
- Dakwar, E., Levin, F., Foltin, R.W., Nunes, E.V., Hart, C.L. (2014). The effects of subanesthetic ketamine infusions on motivation to quit and cue-induced craving in cocaine-dependent research volunteers. *Biol Psychiatry*, 76, 40-46.
- Dakwar, E., Hart, C.L., Levin, F.R., Nunes, E.V., Foltin, R.W. (2017). Cocaine self-administration disrupted by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist ketamine: a randomized, crossover trial. *Mol Psychiatry*, 22, 76-81.
- Duman, R.S., Li, N. (2012). A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367, 2475-2484.
- Duncan, W.C., Sarasso, S., Ferrarelli, F., Selter, J., Riedner, B.A., Hejazi, N.S., Yuan, P., Brutsche, N., Manji, H.K., Tononi, G., Zarate C.A. (2013). Concomitant BDNF and sleep slow wave changes indicate ketamine-induced plasticity in major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*, 16, 301-311.
- Dunlap, L.E., Andrews, A.M., Olson, D.E. (2018). Dark classics in chemical neuroscience: 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *ACS Chem Neurosci*, 9, 2408-2427.
- Edut, S., Rubovitch, V., Rehavi, M., Schreiber, S., Pick, C.G. (2014). A study on the mechanism by which MDMA protects against dopaminergic dysfunction after minimal traumatic brain injury (mTBI) in mice. *J Mol Neurosci*, 54, 684-697.
- Feder, A., Parides, M.K., Murrough, J.W., Perez, A.M., Morgan, J.E., Saxena, S., Kirkwood, K., Aan Het Rot, M., Lapidus, K.A.B., Wan, L.-B., Iosifescu, D.V., Charney, D.S. (2014). Efficacy of intravenous ketamine for treatment of chronic posttraumatic stress disorder: a randomized clinical trial. *JAMA Psychiatry*, 71, 681-688.
- Garcia, L.S.B., Comim, C.M., Valvassori, S.S., Réus, G.Z., Barbosa, L.M., Andreatza, A.C., Stertz, L., Fries, G.R., Gavioli, E.C., Kapczinski, F., Quevedo J. (2008). Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32, 140-144.
- Garcia-Romeu, A., Griffiths, R.R., Johnson, M.W. (2014). Psilocybin-occasioned mystical experiences in the treatment of tobacco addiction. *Curr Drug Abuse Rev*, 7, 157-164.
- Gewirtz, J.C., Chen, A.C., Terwilliger, R., Duman, R.C., Marek, G.J. (2002). Modulation of DOI-induced increases in cortical BDNF expression by group II mGlu receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 73, 317-326.
- Gibon, J., Barker, P.A. (2017). Neurotrophins and proneurotrophins: focus on synaptic activity and plasticity in the brain. *Neuroscientist*, 23, 587-604.
- Glick, S.D., Maisonneuve, I.M., Pearl, S.M. (1997). Evidence for roles of kappa-opioid and NMDA receptors in the mechanism of action of ibogaine. *Brain Res*, 749, 340-343.
- Grob, C.S., Danforth, A.L., Chopra, G.S., Hagerty, M., McKay, C.R., Halberstadt, A.L., Greer, G.R. (2011). Pilot study of psilocybin treatment for anxiety in patients with advanced-stage cancer. *Arch Gen Psychiatry*, 68, 71-78.
- Haile, C.N., Murrough, J.W., Iosifescu, D.V., Chang, L.C., Al Jurdi, R.K., Foulkes, A., Iqbal, S., Mahoney, J.J., De La Garza, R., Charney, D.S., Newton T.F., Mathew S.J. (2014). Plasma brain derived neurotrophic factor (BDNF) and response to ketamine in treatment-resistant depression. *Int J Neuropsychopharmacol*, 17, 331-336.

- Hao, R., Qi, Y., Hou, D.-N., Ji, Y.-Y., Zheng, C.-Y., Li, C.-Y., Yung, W.-H., Lu, B., Huang, Y. (2017). BDNF val66met polymorphism impairs hippocampal long-term depression by down-regulation of 5-HT₃ receptors. *Front Cell Neurosci*, 11, 306-327.
- Hatami, H., Hossainpour-Faizi, M.A., Azarfarin, M., Azarfam, P. (2010). Chronic ecstasy use increases neurotrophin-4 gene expression and protein levels in the rat brain. *Pharmacol Rep PR*, 62, 998-1004.
- He, D.-Y., Ron, D. (2006). Autoregulation of glial cell line-derived neurotrophic factor expression: implications for the long-lasting actions of the anti-addiction drug, Ibogaine. *FASEB J*, 20, 2420-2422.
- He, D.-Y., McGough, N.N.H., Ravindranathan, A., Jeanblanc, J., Logrip, M.L., Phamluong, K., Janak, P.H., Ron, D. (2005). Glial cell line-derived neurotrophic factor mediates the desirahol actions of the anti-addiction drug ibogaine against alcohol consumption. *J Neurosci*, 25, 619-628.
- Hemmerle, A.M., Dickerson, J.W., Herring, N.R., Schaefer, T.L., Vorhees, C.V., Williams, M.T., Seroogy, K.B. (2012). (±)3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") treatment modulates expression of neurotrophins and their receptors in multiple regions of adult rat brain. *J Comp Neurol*, 520, 2459-2474.
- Jadhav, K.S., Boutrel, B. (2018). Prefrontal cortex development and emergence of self-regulatory competence: the two cardinal features of adolescence disrupted in context of alcohol abuse. *Eur J Neurosci*, doi: 10.1111/ejn.14316. [Epub ahead of print].
- Jha, S., Rajendran, R., Fernandes, K.A., Vaidya, V.A. (2008). 5-HT_{2A/2C} receptor blockade regulates progenitor cell proliferation in the adult rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 441, 210-214.
- Johnson, M.W., Garcia-Romeu, A., Cosimano, M.P., Griffiths, R.R. (2014). Pilot study of the 5-HT_{2A} agonist psilocybin in the treatment of tobacco addiction. *J Psychopharmacol*, 28, 983-992.
- Kashyap, M.P., Roberts, C., Waseem, M., Tyagi, P. (2018). Drug targets in neurotrophin signaling in the central and peripheral nervous system. *Mol Neurobiol*, 55, 6939-6955.
- Ke, X., Ding, Y., Xu, K., He, H., Zhang, M., Wang, D., Deng, X., Zhang, X., Zhou, C., Liu, Y., Ning Y., Fan N. (2014). Serum brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor decreased in chronic ketamine abusers. *Drug Alcohol Depend*, 142, 290-294.
- Klein, A.B., Santini, M.A., Aznar, S., Knudsen, G.M., Rios, M. (2010). Changes in 5-HT_{2A}-mediated behavior and 5-HT_{2A}- and 5-HT_{1A} receptor binding and expression in conditional brain-derived neurotrophic factor knock-out mice. *Neuroscience*, 169, 1007-1016.
- Krupitsky, E., Burakov, A., Romanova, T., Dunaevsky, I., Strassman, R., Grinenko, A. (2002). Ketamine psychotherapy for heroin addiction: immediate effects and two-year follow-up. *J Subst Abuse Treat*, 23, 273-283.
- Krupitsky, E.M., Burakov, A.M., Dunaevsky, I.V., Romanova, T. N., Slavina, T.Y., Grinenko, A.Y. (2007). Single versus repeated sessions of ketamine-assisted psychotherapy for people with heroin dependence. *J Psychoactive Drugs*, 39, 13-19.
- Krystal, J.H., Sanacora, G., Duman, R.S. (2013). Rapid-acting glutamatergic antidepressants: the path to ketamine and beyond. *Biol Psychiatry*, 73, 1133-1141.
- Laje, G., Lally, N., Mathews, D., Brutsche, N., Chemerinski, A., Akula, N., Kelmendi, B., Simen, A., McMahon, F.J., Sanacora, G., Zarate C. Jr. (2012). Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and antidepressant efficacy of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*, 72, e27-e28.
- Lepack, A.E., Fuchikami, M., Dwyer, J.M., Banasr, M., Duman, R.S. (2014). BDNF release is required for the behavioral actions of ketamine. *Int J Neuropsychopharmacol*, 18(1), doi: 10.1093/ijnp/pyu033.
- Li, N., Lee, B., Liu, R.-J., Banasr, M., Dwyer, J.M., Iwata, M., Li, X.-Y., Aghajanian, G., Duman, R.S. (2010). mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science*, 329, 959-964.
- Lin, L.F., Doherty, D.H., Lile, J.D., Bektesh, S., Collins, F. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, 260, 1130-1132.
- Liu, R.-J., Lee, F.S., Li, X.-Y., Bambico, F., Duman, R.S., Aghajanian, G.K. (2012). Brain-derived neurotrophic factor Val66Met allele impairs basal and ketamine-stimulated synaptogenesis in prefrontal cortex. *Biol Psychiatry*, 71, 996-1005.
- Ly, C., Greb, A.C., Cameron, L.P., Wong, J.M., Barragan, E.V., Wilson, P.C., Burbach, K.F., Soltanzadeh Zarandi, S., Sood, A., Paddy, M.R., Duim W.C., Dennis M.Y., McAllister A.K., Ori-McKenney K.M, Gray J.A, Olson D.E. (2018). Psychedelics promote structural and functional neural plasticity. *Cell Rep*, 23, 3170-3182.
- Machado-Vieira, R., Yuan, P., Brutsche, N., DiazGranados, N., Luckenbaugh, D., Manji, H.K., Zarate, C.A. (2009). Brain-derived neurotrophic factor and initial antidepressant response to an N-methyl-D-aspartate antagonist. *J Clin Psychiatry*, 70, 1662-1666.
- Marinova, Z., Walitza, S., Grünblatt, E. (2017). The hallucinogen 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride activates neurotrophin receptors in a neuronal cell line and promotes neurites extension. *J Neural Transm*, 124, 749-759.
- Martínez-Turrillas, R., Moyano, S., Del Río, J., Frechilla, D. (2006). Differential effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") on BDNF mRNA expression in rat frontal cortex and hippocampus. *Neurosci Lett*, 402, 126-130.
- Marton, S., González, B., Rodríguez-Bottero, S., Miquel, E., Martínez-Palma, L., Pazos, M., Prieto, J.P., Rodríguez, P., Sames, D., Seoane, G., Scorza C, Cassina P., Carrera I. (2019). Ibogaine administration modifies GDNF and BDNF expression in brain regions involved in mesocorticolimbic and nigral dopaminergic circuits. *Front Pharmacol*, 10, 193. doi: 10.3389.
- Mithoefer, M.C., Wagner, M.T., Mithoefer, A.T., Jerome, L., Doblin, R. (2011). The safety and efficacy of {+/-}3,4-methylenedioxymethamphetamine-assisted psychotherapy in subjects with chronic, treatment-resistant posttraumatic stress disorder: the first randomized controlled pilot study. *J Psychopharmacol*, 25, 439-452.
- Mithoefer, M.C., Wagner, M.T., Mithoefer, A.T., Jerome, L., Martin, S.F., Yazar-Klosinski, B., Michel, Y., Brewerton, T. D., Doblin, R. (2013). Durability of improvement in post-traumatic stress disorder symptoms and absence of harmful effects or drug dependency after 3,4-methylenedioxymethamphetamine-assisted psychotherapy: a prospective long-term follow-up study. *J Psychopharmacol*, 27, 28-39.
- Mouri, A., Noda, Y., Niwa, M., Matsumoto, Y., Mamiya, T., Nitta, A., Yamada, K., Furukawa, S., Iwamura, T., Nabeshima, T. (2017). The involvement of brain-derived neurotrophic factor in 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced place preference and behavioral sensitization. *Behav Brain Res*, 329, 157-165.
- Murrough, J.W., Perez, A.M., Pillemer, S., Stern, J., Parides, M. K., Aan Het Rot, M., Collins, K.A., Mathew, S.J., Charney, D.S., Iosifescu, D.V. (2013). Rapid and longer-term antidepressant effects of repeated ketamine infusions in treatment-resistant major depression. *Biol Psychiatry*, 74, 250-256.

- Nau, F., Miller, J., Saravia, J., Ahlert, T., Yu, B., Happel, K.I., Cormier, S.A., Nichols, C.D. (2015). Serotonin 5-HT₂ receptor activation prevents allergic asthma in a mouse model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 308, L191-L198.
- Nichols, D.E. (2016). Psychedelics. *Pharmacol Rev*, 68, 264-355.
- Park, H., Poo, M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci*, 14, 7-23.
- Rantamäki, T. (2019). TrkB neurotrophin receptor at the core of antidepressant effects, but how? *Cell Tissue Res*, doi: 10.1007/s00441-018-02985-6. [Epub ahead of print].
- Rasmussen, K.G., Lineberry, T.W., Galardy, C.W., Kung, S., Lapid, M.I., Palmer, B.A., Ritter, M.J., Schak, K.M., Sola, C. L., Hanson, A.J., Frye M.A. (2013). Serial infusions of low-dose ketamine for major depression. *J Psychopharmacol*, 27, 444-450.
- Ricci, V., Martinotti, G., Gelfo, F., Tonioni, F., Caltagirone, C., Bria, P., Angelucci, F. (2011). Chronic ketamine use increases serum levels of brain-derived neurotrophic factor. *Psychopharmacology (Berl.)*, 215, 143-148.
- Robertson, O.D., Coronado, N.G., Sethi, R., Berk, M., Dodd, S. (2019). Putative neuroprotective pharmacotherapies to target the staged progression of mental illness. *Early Interv Psychiatry*, doi: 10.1111/eip.12775. [Epub ahead of print].
- Rybakowski, J.K., Permoda-Osip, A., Skibinska, M., Adamski, R., Bartkowska-Sniatkowska, A. (2013). Single ketamine infusion in bipolar depression resistant to antidepressants: are neurotrophins involved? *Hum Psychopharmacol*, 28, 87-90.
- Sanacora, G., Frye, M.A., McDonald, W., Mathew, S.J., Turner, M.S., Schatzberg, A.F., Summergrad, P., Nemeroff, C.B., American Psychiatric Association (APA) Council of Research Task Force on Novel Biomarkers and Treatments. (2017). A consensus statement on the use of ketamine in the treatment of mood disorders. *JAMA Psychiatry*, 74, 399-405.
- Singh, J.B., Fedgchin, M., Daly, E.J., De Boer, P., Cooper, K., Lim, P., Pinter, C., Murrrough, J.W., Sanacora, G., Shelton, R.C., Kurian B., Winokur A., Fava M., Manji H., Drevets WC., Van Nueten L. (2016). A double-blind, randomized, placebo-controlled, dose-frequency study of intravenous ketamine in patients with treatment-resistant depression. *Am J Psychiatry*, 173, 816-826.
- Skaper, S.D. (2018). Neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol Biol*, 1727, 1-17.
- Soleimani Asl, S., Hesam Shariati, M.B., Medizadeh, M., Ahmadpanah, M., Sohrabi, M. (2017). The effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on expression of neurotrophic factors in hippocampus of male rats. *Med J Islam Repub Iran*, 31, 60-71.
- Strasburger, S.E., Bhimani, P.M., Kaabe, J.H., Krysiak, J.T., Nanchanatt, D.L., Nguyen, T.N., Pough, K.A., Prince, T.A., Ramsey, N.S., Savsani, K.H., Scandlen L., Cavaretta M.J., Raffa R.B. (2017). What is the mechanism of ketamine's rapid-onset antidepressant effect? A concise overview of the surprisingly large number of possibilities. *J Clin Pharm Ther*, 42, 147-154.
- Vaidya, V.A., Marek, G.J., Aghajanian, G.K., Duman, R.S. (1997). 5-HT_{2A} receptor-mediated regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus and the neocortex. *J Neurosci*, 17, 2785-2795.
- Vargas-Perez, H., Grieder, T.E., Ting-A-Kee, R., Maal-Bared, G., Chwalek, M., van der Kooy, D. (2017). A single administration of the hallucinogen, 4-acetoxy-dimethyltryptamine, prevents the shift to a drug-dependent state and the expression of withdrawal aversions in rodents. *Eur J Neurosci*, 45, 1410-1417.
- Wilkinson, S.T., Ballard, E.D., Bloch, M.H., Mathew, S.J., Murrrough, J.W., Feder, A., Sos, P., Wang, G., Zarate, C.A., Sanacora, G. (2018). The effect of a single dose of intravenous ketamine on suicidal ideation: a systematic review and individual participant data meta-analysis. *Am J Psychiatry*, 175, 150-158.
- Young, M.B., Norrholm, S.D., Khoury, L.M., Jovanovic, T., Rauch, S.A.M., Reiff, C.M., Dunlop, B.W., Rothbaum, B.O., Howell, L.L. (2017). Inhibition of serotonin transporters disrupts the enhancement of fear memory extinction by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Psychopharmacology (Berl.)*, 234, 2883-2895.

Citation de l'article : Corne, R. et Mongeau, R. (2019). Utilisation des psychédéliques en psychiatrie: lien avec les neurotrophines. *Biologie Aujourd'hui*, Vol