



**HAL**  
open science

# Étude des effets des débris de myéline sur les phénotypes microgliaux : quel rôle pour la poly(ADP-ribose)polymérase ?

Célia Mamma

► **To cite this version:**

Célia Mamma. Étude des effets des débris de myéline sur les phénotypes microgliaux : quel rôle pour la poly(ADP-ribose)polymérase ?. Pharmacologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCB165 . tel-04266829

**HAL Id: tel-04266829**

**<https://theses.hal.science/tel-04266829>**

Submitted on 31 Oct 2023

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

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

**UNIVERSITE PARIS DESCARTES**

**THESE DE DOCTORAT**  
**École Doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries**  
**(ED MTCI)**

Spécialité  
**Pharmacologie**

Présenté par  
**Célia MAMMA**

Pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES**

---

---

**Étude des effets des débris de myéline sur les**  
**phénotypes microgliaux**  
**Quel rôle pour**  
**la poly(ADP-ribose)polymérase ?**

---

---

**Soutenue publiquement le 26 novembre 2018**

Devant le jury composé:

Dr Gérard LIZARD	Rapporteur
Dr Violetta ZUJOVIC	Rapporteur
Pr Carine ALI	Examineur
Dr Pierre GRESSENS	Examineur
Dr Bruno GONZALES	Examineur
Dr Catherine HEURTEAUX	Examineur
Dr Dominique LEROUET	Examineur
Dr Valérie BESSON	Directrice de recherche



UNIVERSITÉ  
**PARIS  
DESCARTES**

MEMBRE DE

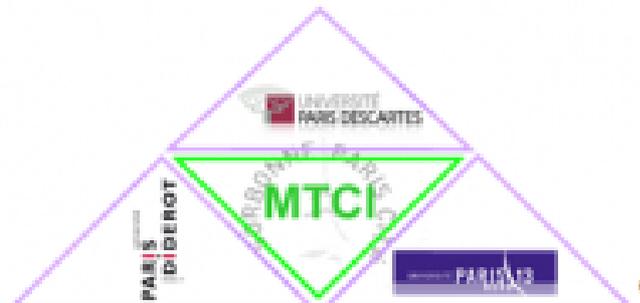
**U<sup>S</sup>PC**

Université Sorbonne  
Paris Cité



**Gueules Cassées**  
*Sourire Quand Même*

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



## REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé, de loin ou de près, à la réalisation de ce travail, depuis son initiation jusqu'à ma soutenance.

✚ À Madame et Monsieur les Docteurs Violetta Zujovic et Gérard Lizard, *pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse.*

✚ À Madame la professeure Carine Ali, Madame et Messieurs les Docteurs Catherine Heurteaux, Pierre Gressens et Bruno Gonzales, *pour avoir accepté de siéger dans ce jury en tant qu'examineurs.*

✚ À Mesdames les Docteurs Dominique Lerouet et Valérie Besson,

✓ *Pour leur encadrement depuis mes débuts dans la recherche,*

✓ *Pour leur disponibilité, leur bonne humeur, leur confiance en moi, leurs encouragements et leurs conseils,*

✓ *Pour m'avoir donné l'opportunité de découvrir le monde de l'enseignement.*

*Je vous exprime ma profonde reconnaissance.*

✚ À Madame le Professeur Catherine Marchand-Leroux,

✓ *Pour m'avoir donné l'opportunité de suivre son master en pharmacologie,*

✓ *Pour m'avoir accueillie dans son laboratoire pour mes stages, puis pour ma thèse,*

✓ *Pour sa gentillesse et ses conseils.*

✚ Aux membres de l'UMR1141: le Docteur Sophie Lebon, *pour la réalisation des RT-qPCR,* et le Docteur Juliette Van Steenwinckel, *pour ses précieux conseils concernant les cultures de microglies. Ces cellules qui m'ont fait tellement galérer, mais qui sont ensuite devenues mes meilleures amies !*

✚ Aux Docteurs Bruno Palmier et Roland Lawson, Paola Cristofari, Anne-Catherine Novak, Aya Ishikawa, *vous avez tous participé à ce travail, chacun à sa manière, et je vous en remercie.*

✚ À tous les membres de l'EA4475 *qui m'ont accompagnée pendant ces 3 années de doctorat:*

- À Monsieur le Docteur Bruno Palmier, *pour sa si grande gentillesse, sa bonne humeur, son soutien permanent et ses précieux conseils scientifiques.*
- À Mesdames les Docteurs Claire Leconte et Virginie Berthat, Madame Nicole Croci; Messieurs le Docteur Raymond Mongeau et Bérard Coqueran et Madame Audrey Lesturgie, *pour leur soutien et leur bonne humeur au quotidien.*
- À Madame et Monsieur les Professeurs Isabelle Margail et Michel Plotkine, *pour leurs conseils.*
- À mes trois compatriotes, les futurs Docteurs Clément Delage, Geoffroy Goujon et Rémi Corne, *pour leur amitié et tous les bons moments passés ensemble. Je vous souhaite bon courage pour la suite de votre aventure.*
- Aux anciens doctorants, les Docteurs Toufik Taib et Kahina Khacef, *pour leur amitié, leur aide et leurs encouragements.*
- À tous les stagiaires que j'ai eu la chance de rencontrer pendant ces années au laboratoire: Marzia, Martina, Valeria, Federica, Albert ...et tant d'autres, *pour leur soutien et tous les bons souvenirs !*

Pour finir, j'aimerais également exprimer mes sincères remerciements à ma famille et mes amis:

- ✚ À mes parents, *que je ne cesserai jamais de remercier; merci pour votre soutien permanent, votre confiance en moi et vos encouragements. Vous êtes ma source de motivation.*
- ✚ À mon frère Mohand et ma sœur Salima, *merci d'être là pour moi!*
- ✚ À ma grand-mère chérie, mes tantes et mon oncle, *merci pour votre soutien.*
- ✚ À Rabia et ses petits anges, Sofiane et Lisa, *merci pour tout ce que vous m'avez apporté.*

# TABLE DES MATIÈRES

## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

## LISTE DES FIGURES

## LISTE DES TABLEAUX

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>3</b>
<b>CHAPITRE I: LE TRAUMATISME CRÂNIEN</b> .....	<b>3</b>
1. Généralités sur la pathologie du traumatisme crânien .....	3
1.1. Définition .....	3
1.2. Epidémiologie et étiologie .....	4
2. Physiopathologie du traumatisme crânien .....	5
2.1. Les lésions post-traumatiques.....	5
2.1.1. Lésions focales <i>versus</i> lésions diffuses .....	5
2.1.2. Lésions primaires <i>versus</i> lésions secondaires.....	6
2.2. Les mécanismes biomécaniques et moléculaires du traumatisme crânien .....	7
2.2.1. Les mécanismes biomécaniques .....	7
2.2.2. Les mécanismes moléculaires .....	9
3. Manifestations cliniques du traumatisme crânien .....	13
3.1. Les symptômes neurologiques et cognitifs .....	13
3.2. Les symptômes comportementaux et psychiatriques .....	14
4. Encéphalopathie traumatique chronique et autres conséquences chroniques du traumatisme crânien.....	15
5. Prise en charge clinique du traumatisme crânien .....	16
5.1. Prise en charge de la phase aiguë .....	17
5.2. Prise en charge des phases subaiguë et chronique .....	17
6. Pharmacologie de la neuroprotection dans le traumatisme crânien.....	20
6.1. Définition du concept de neuroprotection .....	20
6.2. La neuroprotection dans le traumatisme crânien .....	20
6.2.1. Thérapies ciblant l'excitotoxicité .....	21
6.2.2. Thérapies ciblant le dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydant ....	22
6.2.3. Thérapies visant à réduire les lésions axonales .....	22

6.2.4.	Thérapies ciblant la neuro-inflammation .....	23
7.	Raisons de l'échec en clinique des stratégies neuroprotectrices .....	27
7.1.	Discordance entre les modèles précliniques et cliniques .....	27
7.2.	Stratégies neuroprotectrices trop sélectives .....	32

## **CHAPITRE II: LA NEURO-INFLAMMATION POST-TRAUMATIQUE .....**

1.	Généralités .....	34
2.	Initiation de la neuro-inflammation .....	34
2.1.	Libération de motifs moléculaires associés aux dégâts .....	35
2.2.	Excitotoxicité .....	36
2.3.	Dysfonctionnement mitochondrial .....	37
2.4.	Passage d'éléments vasculaires dans le parenchyme cérébral .....	37
3.	Acteurs cellulaires de la neuro-inflammation .....	38
3.1.	Les cellules gliales .....	38
3.1.1.	La microglie .....	39
3.1.2.	Les astrocytes .....	41
3.2.	Les cellules sanguines .....	42
3.2.1.	Les polynucléaires neutrophiles .....	42
3.2.2.	Les monocytes .....	43
4.	Médiateurs moléculaires de la neuro-inflammation .....	44
4.1.	Les cytokines pro-inflammatoires .....	44
4.2.	Les cytokines anti-inflammatoires .....	46
4.3.	Les chimiokines et les molécules d'adhésion .....	46
5.	Rôle de la microglie dans la neuro-inflammation post-traumatique .....	47
5.1.	Origine et fonction de la microglie dans le SNC .....	47
5.2.	Hétérogénéité de l'activation microgliale dans le SNC .....	49
5.3.	Polarisation microgliale après un traumatisme crânien .....	53
5.4.	Conséquences de la polarisation microgliale dans la pathologie du traumatisme crânien .....	56
5.4.1.	Conséquences de l'activation aiguë et subaiguë de la microglie .....	56
5.4.2.	Conséquence de l'activation chronique de la microglie .....	58
6.	Modulation pharmacologique de la polarisation microgliale .....	60

## **CHAPITRE III: LES LÉSIONS DE LA SUBSTANCE BLANCHE ET ROLE DES DÉBRIS DE MYELINE DANS LA NEURO-INFLAMMATION .....**

1.	La substance blanche: organisation et fonctions .....	65
1.1.	La myéline .....	65
1.2.	Les oligodendrocytes .....	67

2.	Les lésions de la substance blanche après un traumatisme crânien.....	70
2.1.	La mort des oligodendrocytes .....	71
2.2.	Les lésions axonales .....	72
2.3.	La démyélinisation .....	74
3.	Conséquences des lésions de la substance blanche sur la polarisation microgliale .....	75
3.1.	Mise en évidence des débris de myéline après un traumatisme crânien .....	76
3.2.	Effets délétères des débris de myélines .....	77
3.2.1.	Inhibition de la régénération axonale et de la remyélinisation.....	77
3.2.2.	Amplification de la neuro-inflammation: action sur la polarisation microgliale .	78
	<b>CHAPITRE IV: LA POLY(ADP-RIBOSE)POLYMÉRISE .....</b>	<b>82</b>
1.	Généralités.....	82
1.1.	Structure de la PARP-1 .....	83
1.2.	Déroulement et régulation physiologique de la PARylation.....	84
1.3.	Conséquences physiologiques de la PARylation.....	86
1.3.1.	Réparation de l'ADN .....	86
1.3.2.	Régulation de la transcription génique .....	88
1.3.3.	Contrôle de la division cellulaire .....	88
2.	Conséquences délétères de l'hyperactivation de la PARP dans le traumatisme crânien	88
2.1.	Hyperactivation de la PARP après un traumatisme crânien.....	88
2.2.	Conséquences délétères de l'hyperactivation de la PARP dans le traumatisme crânien.....	89
2.2.1.	Implication de la PARP dans la mort cellulaire post-traumatique.....	92
2.2.2.	Implication de la PARP dans la neuro-inflammation post-traumatique.....	94
2.2.3.	Hyperactivation de la PARP et polarisation microgliale .....	95
	<b>OBJECTIF DU TRAVAIL .....</b>	<b>97</b>
	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>98</b>
	<b>PREMIÈRE PARTIE: EXPÉRIENCES <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>98</b>
1.	Cultures primaires de cellules gliales.....	98
1.1.	Culture mixte de cellules gliales .....	98
1.2.	Culture primaire de microglies.....	99
1.3.	Culture primaire d'oligodendrocytes matures .....	100
2.	Préparation des débris de myéline de souris .....	101
2.1.	Principe .....	101
2.2.	Protocole expérimental.....	101

3.	Traitement des cultures primaires de microglies.....	104
4.	Evaluation de la viabilité et de la mort cellulaire .....	105
4.1.	Mesure de la viabilité cellulaire par le test du MTT .....	105
4.1.1.	Principe .....	105
4.1.2.	Protocole expérimental.....	106
4.2.	Mesure de la mort cellulaire par dosage de la LDH .....	106
4.2.1.	Principe .....	106
4.2.2.	Protocole.....	106
5.	Evaluation de l'expression génique .....	107
5.1.	Principe .....	107
5.2.	Protocole expérimental.....	107
5.2.1.	Extraction des ARNm .....	107
5.2.2.	RT-qPCR .....	108
6.	Evaluation de l'expression protéique .....	109
6.1.	Immunocytochimie .....	111
6.1.1.	Principe .....	111
6.1.2.	Protocole expérimental.....	111
6.2.	Western blot.....	116
6.2.1.	Principe .....	116
6.2.2.	Protocole expérimental.....	116
7.	Dosage des nitrites.....	120
7.1.	Principe .....	120
7.2.	Protocole expérimental.....	120
8.	Analyse statistique des résultats .....	121
	<b>DEUXIÈME PARTIE: EXPÉRIENCES <i>IN VIVO</i></b> .....	122
1.	Modèle expérimental de traumatisme crânien par impact cortical contrôlé .....	122
2.	Sacrifice des animaux et préparation des coupes de cerveaux .....	123
3.	Immunohistochimie .....	123
3.1.	Principe .....	123
3.2.	Protocole expérimental.....	123
	<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION</b> .....	126
1.	Mise au point des cultures primaires de microglies et d'oligodendrocytes de souris ...	126
1.1.	Optimisation du protocole de la culture primaire de microglies .....	126
1.2.	Vérification de la pureté de la culture primaire de microglies .....	131
1.3.	Mise au point de la culture primaire d'oligodendrocytes .....	132

2. Etude <i>in vitro</i> des effets de débris de myéline sur les phénotypes microgliaux - Conséquences de l'inhibition de la PARP et de la phagocytose .....	140
2.1. Etudes préliminaires.....	142
2.1.1. Comment mimer <i>in vitro</i> l'effet de débris de myéline? .....	142
2.1.2. Choix des concentrations des stimuli pro- et anti-inflammatoires .....	143
2.2. Etude <i>in vitro</i> des effets de débris de myéline sur les phénotypes microgliaux ....	148
2.2.1. Article en préparation .....	149
2.2.2. Autre résultat: Etude des effets de débris de myéline en présence de SVF..	194
2.3. Etude des conséquences de l'inhibition de la PARP sur l'orientation du phénotype microglial induite par les débris de myéline .....	197
2.3.1. Etude des effets du PJ34 sur la mort et de la viabilité cellulaire .....	197
2.3.2. Etude des effets de l'inhibition de la PARP sur le phénotype microglial.....	198
2.3.3. Mise en évidence de l'activation de la PARP.....	200
2.4. Discussion.....	202
3. Mise en évidence <i>in vivo</i> des débris de myéline et caractérisation des phénotypes microgliaux après un traumatisme crânien chez la souris.....	212
3.1. Mise au point des immunohistochimies .....	213
3.2. Caractérisation des phénotypes microgliaux après un traumatisme crânien.....	214
3.3. Mise en évidence des débris de myéline après un traumatisme crânien .....	216
3.4. Discussion.....	217
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>218</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>218</b>

## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### Publication:

---

---

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

### Communication orale

---

---

**Mamma C**, Palmier B, Lebon S, Lawson R, Ishikawa A, Leconte C, Novak AC, Gressens P, Marchand-Leroux C, Besson VC, Lerouet D. The foamy friendly microglia. 22<sup>nd</sup> Annual Meeting of the LARC Neuroscience Network, 19 octobre 2018, Rouen, France.

### Communications affichées:

---

---

**Mamma C**, Palmier B, Lebon S, Lawson R, Ishikawa A, Leconte C, Novak AC, Gressens P, Marchand-Leroux C, Besson VC, Lerouet D. The foamy friendly microglia. 22<sup>nd</sup> Annual Meeting of the LARC Neuroscience Network, 19 octobre 2018, Rouen, France.

**Mamma C**, Palmier B, Lebon S, Lawson R, Ishikawa A, Leconte C, Novak AC, Gressens P, Marchand-Leroux C, Besson VC, Lerouet D. A “greedy” microglia is a “friendly” microglia. XIII *European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, 8-11 juillet 2017, Edimbourg, Royaume-Uni.*

**Mamma C**, Palmier B, Lebon S, Lawson R, Ishikawa A, Leconte C, Novak AC, Gressens P, Marchand-Leroux C, Besson VC, Lerouet D. A “greedy” microglia is a “friendly” microglia. *Journées scientifiques de l'école doctorale médicament chimie toxicologie imagerie*, juin 2017, Paris, France.

**Mamma C**, Palmier B, Lebon S, Lawson R, Ishikawa A, Leconte C, Novak AC, Gressens P, Marchand-Leroux C, Besson VC, Lerouet D. A “greedy” microglia is a “friendly” microglia. *Young Researchers in Life Science Conference (YRLS)*, 15-17 mai 2017, Paris, France.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>3-AB</b>	3-aminobenzamide
<b>A<math>\beta</math></b>	Amyloïde beta
<b>Ac</b>	Anticorps
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADP</b>	Adénosine diphosphate
<b>AIF</b>	Apoptosis inducing factor
<b>Akt</b>	Protéine kinase B (PKB)
<b>AMPA</b>	Alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionate
<b>AMPc</b>	Adénosine monohosphate cyclique
<b>AMPK</b>	Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase
<b>ANOVA</b>	Analyse de variance
<b>AP-1/2</b>	Activator Protein 1/2
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>Arg1</b>	Arginase 1
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BCA</b>	Acide bicinchonique
<b>BDNF</b>	Brain-derived neurotrophic factor
<b>bFGF</b>	Basic fibroblast growth factor
<b>BHE</b>	Barrière hémato-encéphalique
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>CCL</b>	C-C motif Ligand
<b>CCR</b>	C-C chemokine receptor
<b>CD</b>	Cluster of differentiation
<b>CHPG</b>	2-chloro-5-hydroxyphénylglycine
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CNPase</b>	2,3-cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase
<b>COX</b>	Cyclo-oxygénase
<b>CR</b>	Complement receptor
<b>CSF1</b>	Colony stimulating factor 1
<b>CSF1R</b>	Colony stimulating factor 1 receptor
<b>Ct</b>	Cycle threshold

<b>CXCL</b>	C-X-C motif ligand
<b>CX3CR</b>	CX3C chemokine receptor
<b>DAMP</b>	Damage associated molecular pattern
<b>DAPI</b>	4,6-diamidino-2-phenylindole
<b>DMEM HG</b>	Dulbecco's modified eagle's medium high glucose
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DNase</b>	Désoxyribonucléase
<b>DTI</b>	Diffusion tensor imaging
<b>EAAT</b>	Excitatory amino acid transporter
<b>ERN</b>	Espèce réactive nitrée
<b>ERO</b>	Espèce réactive oxygénée
<b>esm</b>	Ecart standard à la moyenne
<b>ESPT</b>	Etat de stress post-traumatique
<b>ETC</b>	Encéphalopathie traumatique chronique
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor
<b>FIH</b>	Factor inhibiting HIF
<b>FIZZ1</b>	Found in inflammatory zone 1
<b>GalC</b>	Galactosylcéramidase
<b>GCS</b>	Glasgow coma scale
<b>GFAP</b>	Glial fibrillary acidic protein
<b>GOS</b>	Glasgow outcome scale
<b>GPR17</b>	G protein-coupled receptor 17
<b>HDAC</b>	Histone désacétylase
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxia-inducible factor 1 alpha
<b>HMGB1</b>	High mobility group box 1
<b>HSP</b>	Heat shock proteins
<b>Iba1</b>	Ionized calcium binding adapter molecule 1
<b>ICAM-1</b>	Intercellular adhesion molecule 1
<b>ICC</b>	Impact cortical contrôlé
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interféron gamma
<b>IGF-1</b>	Insulin growth factor 1

<b>IHC</b>	Immunohistochimie
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IL-R</b>	Interleukine receptor
<b>IL-1Ra</b>	Interleukine 1 receptor antagonist
<b>IL-4R<math>\alpha</math></b>	Interleukine 4 receptor alpha
<b>INO-1001</b>	N-(3-morpholinopropyl)-5-oxo-6,11-dihydro-5hinden[1,2-c]isoquinoline-9-sulfonamide
<b>IRM</b>	Imagerie par résonance magnétique
<b>KO</b>	knock-out
<b>LAD</b>	Lésion axonale diffuse
<b>LCR</b>	Liquide céphalorachidien
<b>LDH</b>	Lactate déshydrogénase
<b>Lgals3</b>	Galectin 3
<b>LOC</b>	Loss of consciousness
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>LRP1</b>	Low density lipoprotein receptor-related protein 1
<b>MAG</b>	Myelin associated glycoprotein
<b>MBP</b>	Myelin basic protein
<b>MCP-1</b>	Monocyte chemoattractant protein 1
<b>mGluR</b>	Récepteur métabotrope du glutamate
<b>MOG</b>	Myelin oligodendrocyte glycoprotein
<b>MPTP</b>	Mitochondrial permeability transition pore
<b>MRC1</b>	Mannose receptor C-type 1
<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin
<b>MTT</b>	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamide adénine dinucléotide
<b>NED</b>	N-(1-naphtyl)éthylènediamine
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor kappa B
<b>NG2</b>	Neural/glial antigen 2
<b>NGF</b>	Nerve growth factor
<b>NLS</b>	Nuclear localisation signal
<b>NMDA</b>	N-méthyl D-aspartate
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote

<b>NOS</b>	NO-synthase
<b>NOX</b>	NADPH-oxydase
<b>NSC</b>	Neural stem cell
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anion superoxyde
<b>Olig1/2</b>	Oligodendrocyte transcription factor 1/2
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Anion peroxydinitrite
<b>OPC</b>	Oligodendrocyte progenitor cell
<b>PAMP</b>	Pathogen-associated molecular pattern
<b>PAR</b>	Poly(ADP-ribose)
<b>PARG</b>	Poly(ADP-ribose)glycohydrolase
<b>PARP</b>	Poly(ADP-ribose)polymérase
<b>PARylation</b>	Poly-(ADP-ribosyl)ation
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PDE</b>	Phosphodiesterase
<b>PDGF</b>	Platelet-derived growth factor
<b>PDGFR<math>\alpha</math></b>	Platelet-derived growth factor receptor alpha
<b>PFA</b>	Paraformaldéhyde
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PJ34</b>	N-(6-oxo-5,6-dihydrophénanthridin-2-yl)-N,N-diméthylacétamide
<b>PLA2</b>	Phospholipase A2
<b>PLP</b>	Proteolipid protein
<b>PMN</b>	Polynucléaire neutrophile
<b>PPAR</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor
<b>PRR</b>	Pattern recognition receptor
<b>PSA-NCAM</b>	Polysialylated-neural cell adhesion molecule
<b>PSM</b>	Poste de sécurité microbiologique
<b>PTA</b>	Post-traumatic amnesia
<b>P-tau</b>	Protéine tau
<b>Ptgs2</b>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 ou COX-2
<b>PVDF</b>	Polyfluorure de vinylidène
<b>RhoA</b>	Ras homolog gene family, member A
<b>Rpl13a</b>	Ribosomal protein L13A
<b>rpm</b>	Rotation par minute

<b>RT-qPCR</b>	Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction
<b>SB</b>	Substance blanche
<b>SDS</b>	Dodécylsulfate de sodium
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>SOCS3</b>	Suppressor of cytokine signaling 3
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>SphK1</b>	Sphingosine kinase 1
<b>STAT</b>	Signal transducer and activator of transcription
<b>SVF</b>	Sérum de veau fœtal
<b>TBS</b>	Tris-buffered saline
<b>TC</b>	Traumatisme crânien
<b>TEP</b>	Tomographie par émission de positons
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor beta
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor alpha
<b>TREM2</b>	Triggering receptor expressed on myeloid cell 2
<b>Tris</b>	2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol hydrochloride
<b>TSPO</b>	Translocator protein
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>WB</b>	Western blot
<b>Ym1</b>	Chitinase-3-like
<b>ZSV</b>	Zone sous-ventriculaire

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Les lésions primaires et secondaires post-TC .....	7
<b>Figure 2:</b> Les trois principaux types de forces mécaniques impliquées dans les lésions primaires post-TC.....	8
<b>Figure 3:</b> Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la formation des lésions post-TC .....	13
<b>Figure 4:</b> Initiation de la neuro-inflammation par les DAMP .....	36
<b>Figure 5:</b> Activation des cellules gliales après un traumatisme crânien (TC).....	39
<b>Figure 6:</b> Origine, développement et fonctions de la microglie.....	48
<b>Figure 7:</b> Conséquences de l'activation aiguë, subaiguë et chronique de la microglie .....	59
<b>Figure 8:</b> Organisation et composition de la gaine de myéline .....	67
<b>Figure 9:</b> Différents stades de maturation des oligodendrocytes.....	69
<b>Figure 10:</b> Evolution des lésions axonales après un TC .....	73
<b>Figure 11:</b> Hypothèse du « cercle vicieux » entre les lésions de la SB et la neuro-inflammation.....	76
<b>Figure 12:</b> Effet des débris de myéline sur la régénération axonale et la remyélinisation....	78
<b>Figure 13:</b> Représentation schématique de la structure de la PARP-1 .....	84
<b>Figure 14:</b> Etapes de synthèse des PAR .....	85
<b>Figure 15:</b> Mécanisme de réparation des cassures simple brin de l'ADN.....	87
<b>Figure 16:</b> Quelques exemples d'inhibiteurs de PARP .....	91
<b>Figure 17:</b> Rôle de la PARP dans la régulation de la survie ou la mort cellulaire .....	94
<b>Figure 18:</b> Modulation de l'activité de HIF-1 $\alpha$ par la PARP .....	96
<b>Figure 19:</b> Préparation d'une culture primaire de microglie de souris.....	100
<b>Figure 20:</b> Préparation des débris de myéline à partir de cerveaux de souris .....	103
<b>Figure 21:</b> Zone de la craniotomie et de l'impact lors de l'ICC .....	123
<b>Figure 22:</b> Photo représentative de microglies activées à l'état basal avec une prédominance de la morphologie hypertrophique .....	129
<b>Figure 23:</b> Mesure de la réactivité microgliale par dosage des nitrites dans les surnageants de cultures microgliales traitées, 2 ou 7 jours après ensemencement, par du LPS pendant 24 heures .....	130
<b>Figure 24:</b> Photos représentatives de cultures de microglies 2 jours .....	131
<b>Figure 25:</b> Photos représentatives de la pureté de la culture de microglies .....	132
<b>Figure 26:</b> Photos représentatives de la pureté et de la différenciation de la culture primaire d'oligodendrocytes, après 21, 25 et 28 jours de culture, par immunocytochimie DAPI/Iba1/NG2 .....	134

<b>Figure 27:</b> Photos représentatives de la pureté et de la différenciation de la culture primaire d'oligodendrocytes, après 21, 25 et 28 jours de culture, par immunocytochimie DAPI/GFAP/MBP .....	135
<b>Figure 28:</b> Photos représentatives de la pureté de la culture primaire d'oligodendrocytes, après 28 jours de culture, par immunocytochimie.....	137
<b>Figure 29:</b> Photos représentatives de la différenciation des cultures primaires d'oligodendrocytes, après 28 jours de culture, par immunocytochimie .....	138
<b>Figure 30:</b> Western blot de l'expression de la protéine MBP dans des échantillons de préparation de débris de myéline, d'homogénats de cerveau (témoin positif) et de foie (témoin négatif) de souris .....	143
<b>Figure 31:</b> Evaluation de l'activation microgliale en phénotype M1 après traitement.....	145
<b>Figure 32:</b> Photos représentatives de la morphologie des cellules microgliales après 24 heures de traitement par le LPS .....	146
<b>Figure 33:</b> Evaluation de l'activation microgliale M1 par le dosage des nitrites .....	147
<b>Figure 34:</b> Photos représentatives de la morphologie des cellules microgliales traitées ...	148
<b>Figure 35:</b> Caractérisation du phénotype microglial M1 après 6 ou 24 heures de traitement par des débris de myéline en présence de SVF dans le milieu de culture .....	195
<b>Figure 36:</b> Caractérisation du phénotype microglial M2 après 6 ou 24 heures de traitement par des débris de myéline en présence de SVF dans le milieu de culture .....	196
<b>Figure 37:</b> Evaluation de la mort (A) et de la viabilité (B) cellulaires après 24 heures de traitement par le PJ34 .....	197
<b>Figure 38:</b> Etude des conséquences de l'inhibition de la PARP par le PJ34 sur le phénotype microglial M2 induit par les débris de myéline après 24 heures de traitement .....	199
<b>Figure 39:</b> Photos représentatives de la translocation d'AIF après 24 heures de traitement par le LPS par immunocytochimie DAPI/AIF/phalloïdine .....	200
<b>Figure 40:</b> Photos représentatives de la translocation d'AIF après 24 heures de traitement par le LPS, en présence ou en absence de PJ34, par immunocytochimie DAPI/AIF .....	201
<b>Figure 41:</b> Photos représentatives de la mise au point de l'immunohistochimie DAPI/Iba1, avec différentes conditions de post-fixation et de blocage des sites non spécifiques.....	214
<b>Figure 42:</b> Photos représentatives de la visualisation des microglies/macrophages de phénotype M1, 3 jours post-TC, par immunohistochimie DAPI/Iba1/NOS2.....	215
<b>Figure 43:</b> Photos représentatives de la visualisation des microglies/macrophages de phénotype M2, 3 jours post-TC, par immunohistochimie DAPI/Iba1/CD206 .....	216
<b>Figure 44:</b> Photos représentatives de la visualisation des débris de myéline, 3 jours post-TC, par immunohistochimie DAPI/Iba1/dMBP .....	217

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I:</b> Liste non exhaustive de médicaments utilisés pour le traitement des séquelles post-TC .....	19
<b>Tableau II:</b> Les différents modèles expérimentaux utilisés pour mimer, in vivo et in vitro, la physiopathologie du TC.....	28
<b>Tableau III:</b> Principaux avantages et limites des modèles in vivo de TC .....	30
<b>Tableau IV:</b> Exemples de marqueurs exprimés par les phénotypes microgliaux M1 et M2 .	52
<b>Tableau V:</b> Exemples d'études de la polarisation microgliale.....	54
<b>Tableau VI:</b> Classification des 17 membres de la famille PARP .....	82
<b>Tableau VII:</b> Tableau VII: Solvants des molécules utilisées .....	105
<b>Tableau VIII:</b> Protéines étudiées par WB ou immunocytochimie sur les cultures primaires de microglies ou d'oligodendrocytes.....	110
<b>Tableau IX:</b> Conditions expérimentales utilisées au cours des immunocytochimies.....	114
<b>Tableau X:</b> Composition des gels de concentration et de migration utilisés pour la réalisation des WB .....	118
<b>Tableau XI:</b> Conditions expérimentales utilisées au cours des WB.....	120
<b>Tableau XII:</b> Conditions expérimentales utilisées lors des immunohistochimies.....	125
<b>Tableau XIII:</b> Principales modifications apportées au protocole de culture primaire de microglies de souris.....	127
<b>Tableau XIV:</b> Principales modifications apportées au protocole de culture primaire d'oligodendrocytes.....	136

## INTRODUCTION

Le traumatisme crânien (TC) est une pathologie complexe et un problème majeur de santé publique. Il constitue l'une des premières causes de décès et de handicap à tout âge dans le monde. Au delà de l'impact économique colossal en matière de soins et de réadaptation des patients, les séquelles motrices, cognitives et psychiques du TC peuvent avoir des répercussions personnelles et sociétales très importantes. Malheureusement, il n'existe, à ce jour, aucun traitement pharmacologique protecteur. Malgré les résultats favorables obtenus chez l'animal, les essais cliniques n'ont montré aucun bénéfice thérapeutique chez les patients traumatisés crâniens, laissant la prise en charge de ces derniers essentiellement symptomatique.

Des lésions primaires, focales et diffuses, apparaissent immédiatement après le TC, puis elles évoluent progressivement en lésions secondaires pouvant persister de nombreuses années après le TC. Contrairement aux lésions primaires irréversibles, la survenue progressive des lésions secondaires offre la possibilité d'une large fenêtre d'intervention thérapeutique.

Parmi les mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces lésions secondaires, la neuro-inflammation, pouvant persister plusieurs années après le TC, semble jouer un rôle primordial. Toutefois, cette réponse inflammatoire n'est pas exclusivement délétère, car elle reste indispensable à la réparation et la régénération tissulaires. La microglie, qui constitue la première ligne de défense dans le cerveau, joue un rôle très complexe dans la neuro-inflammation post-TC. Caractérisée par une très grande hétérogénéité, la microglie activée peut adopter schématiquement, selon son environnement, soit un phénotype pro-inflammatoire (cytotoxique), dit M1, ou un phénotype anti-inflammatoire (régénérateur), appelé M2. Ces deux populations sont observées dans les modèles expérimentaux de TC.

La microglie activée en phénotype M1 participe à l'apparition et l'aggravation des lésions post-TC de la substance blanche (SB). Ces lésions contribuent aux désordres cognitifs et émotionnels observés chez les patients traumatisés crâniens. Malgré leur impact clinique non négligeable, les mécanismes lésionnels de la SB après un TC restent encore peu élucidés. Des études suggèrent que les lésions de la SB pourraient, à leur tour, amplifier la neuro-inflammation post-TC, créant ainsi un cercle vicieux. En effet, les débris de myéline, générés à la suite des lésions axonales et de la mort des oligodendrocytes, pourraient induire une activation microgliale en phénotype M1. Cependant, certaines études remettent en cause cette hypothèse.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a consisté à étudier *in vitro*, sur des cultures primaires de microglies de souris, l'effet des débris de myéline dans l'orientation du phénotype microglial. En effet, une meilleure compréhension des mécanismes endogènes à l'origine des changements phénotypiques microgliaux pourrait permettre le développement de futures stratégies protectrices pour le traitement du TC.

Par ailleurs, il est bien connu que l'hyperactivation de la poly(ADP-ribose)polymérase (PARP) joue un rôle délétère dans les conséquences post-TC, notamment dans la neuro-inflammation et la mort des oligodendrocytes. Ainsi, la PARP, qui contribue à l'activation de la microglie, pourrait également intervenir dans l'orientation phénotypique. Par conséquent, nous avons également étudié l'effet de l'inhibition pharmacologique de la PARP sur l'orientation du phénotype microglial induite par les débris de myéline.

Enfin, une des fonctions de la microglie étant d'éliminer les débris cellulaires par phagocytose et cette dernière pouvant s'accompagner d'une modification de l'état d'activation microgliale, nous avons évalué la contribution de la phagocytose dans les changements phénotypiques microgliaux induits par les débris de myéline.

### CHAPITRE I: LE TRAUMATISME CRÂNIEN

#### 1. Généralités sur la pathologie du traumatisme crânien

##### 1.1. Définition

Le traumatisme crânien (TC) désigne toute altération du fonctionnement cérébral ou autre évidence d'atteinte cérébrale induite par une force extérieure (Maas *et al.*, 2017).

D'après les lignes directrices concernant la prise en charge clinique des TC émanant des départements Américains des anciens combattants et de la Défense (VA/DoD, version 2.0-2016), le TC est caractérisé par la survenue ou l'aggravation, immédiatement après l'impact, d'au moins un des signes cliniques suivants:

- une perte ou une diminution du niveau de conscience,
- une amnésie, concernant des événements précédant ou survenant immédiatement après le TC,
- une altération de l'état mental au moment de l'impact (confusion, désorientation, ralentissement de la pensée...),
- des déficits neurologiques transitoires ou prolongés (troubles de la vision, troubles sensoriels, fatigue, perte de l'équilibre, parésie, plégie...),
- et/ou des lésions intracrâniennes.

Caractérisé par une grande hétérogénéité en termes d'étiologie, de physiopathologie, de sévérité, de symptomatologie et de traitement, le TC est considéré comme la pathologie connue la plus complexe touchant l'organe le plus complexe (Maas *et al.*, 2015). De plus, il est également reconnu comme étant non pas une affection aiguë, mais chronique, pouvant progresser pendant des heures, des jours, des semaines voire des années.

Selon la sévérité, le TC peut être qualifié de léger, modéré ou sévère. En pratique clinique, cette sévérité est évaluée par l'estimation du niveau de conscience des patients en se basant sur le score de l'échelle de Glasgow (Glasgow Coma Scale ou GCS). Cette échelle est basée sur 3 critères cliniques: (1) l'ouverture des yeux, (2) la réponse motrice, et (3) la réponse verbale. Le TC est qualifié de léger lorsque le GCS est compris entre 13 et 15 (Maas *et al.*, 2017). Le TC léger représente 80 à 90% de l'ensemble des TC (Blennow *et al.*, 2016). Le tableau clinique est assez hétérogène et peut inclure des symptômes physiques (nausées, vomissements, maux de tête...), des troubles cognitifs (troubles de la

concentration et de la mémoire) et des troubles psychiatriques (irritabilité et troubles émotionnels). Bien que le rétablissement soit souvent complet après un TC léger, 15 à 30% des patients développent des troubles neurocognitifs et des changements comportementaux à plus long terme (Mckee et Daneshvar, 2015). Dans le cas d'un TC modéré, le GCS est compris entre 9 et 12, et les patients sont souvent léthargiques (Mckee et Daneshvar, 2015; Maas *et al.*, 2017). Enfin, le GCS est compris entre 3 et 8 lorsque le patient est dans le coma (incapacité d'ouverture des yeux, de réponses verbale et motrice). Le TC est alors qualifié de sévère et se caractérise par une forte mortalité de 30 à 40%. Par ailleurs, ce dernier est à l'origine d'importantes séquelles physiques, psychiatriques, cognitives et émotionnelles qui constituent un énorme fardeau sociétal et économique.

Un diagnostic de la sévérité du TC basé uniquement sur le score de GCS reste une approche très simplifiée ne tenant pas compte de la complexité du TC. Toutefois, il existe une autre classification, corrélant davantage avec la pathologie du TC, qui est basée sur les durées de perte de conscience (Loss Of Consciousness ou LOC) et de mémoire (Post-Traumatic Amnesia ou PTA) (Mckee et Daneshvar, 2015). Le TC léger est caractérisé par un LOC inférieur à 1 heure et un PTA inférieur à 24 heures. Le TC modéré est caractérisé par un LOC compris entre 1 et 24 heures et un PTA compris entre 1 à 7 jours. Enfin, le TC sévère est caractérisé par un LOC supérieur à 24 heures et un PTA supérieur à 1 semaine.

## 1.2. Epidémiologie et étiologie

Le TC constitue un problème majeur de santé publique. Plus de 50 millions de cas sont enregistrés chaque année dans le monde et environ la moitié de la population mondiale subira au moins un TC dans sa vie (Maas *et al.*, 2017). En Europe, le TC concerne environ 2,5 millions de personnes chaque année. Parmi elles, 1 million seront hospitalisées et 7 500 décéderont (Maas *et al.*, 2015). Aux Etats-Unis, l'incidence est de 3,5 millions de cas chaque année (Maas *et al.*, 2017). Une méta-analyse de 15 études de prévalence révèle que sur le total des 25 124 participants adultes, au moins 12% auraient subi un TC sévère avec une perte de conscience, et que la prévalence du TC est 2 fois plus importante chez l'homme que chez la femme.

Le TC est la première cause de mortalité chez l'adulte jeune (15 à 25 ans). Dans une étude clinique longitudinale menée sur 1 265 participants, depuis la naissance jusqu'à l'âge de 25 ans, plus de 30% auraient subi au moins un TC ayant nécessité des soins médicaux (Mckinlay *et al.*, 2008; Maas *et al.*, 2017).

Par ailleurs, le TC représente la cause majeure de handicap et de mortalité tout âge confondu à travers le monde. Il est à l'origine de 37% de la mortalité aiguë totale liée aux blessures en Europe et environ 30,5% aux Etats-Unis. Concernant la mortalité à plus long terme, une étude clinique a montré que chez des patients ayant survécu jusqu'à 13 ans

après un TC, la mortalité est environ 6 fois plus importante que chez les témoins volontaires. Il a été estimé que jusqu'en 2030, le TC resterait parmi les 3 premières affections neurologiques à l'origine de séquelles neurologiques.

Au-delà des répercussions sur la vie quotidienne des patients et de leur entourage, le TC a un impact économique colossal en matière de dépenses de santé et de réadaptation. La prise en charge du TC représente un coût d'environ 400 milliards de dollars par an pour l'économie mondiale (Maas *et al.*, 2017). A ces coûts, s'ajoute la diminution de productivité des personnes avec des séquelles neurologiques et physiques très importantes.

Les causes principales de TC sont les accidents de la route et les pratiques sportives chez les jeunes, les chutes chez les personnes âgées, les blessures par balles et les combats chez les militaires (Pearn *et al.*, 2017). Ces dernières années, l'étude des conséquences du TC chez les sportifs, plus particulièrement les boxeurs, les joueurs de football américain ou autres sports de contact, a suscité un intérêt tout particulier en raison du risque de développement d'encéphalopathie traumatique chronique (ETC; Ling *et al.*, 2015; Blennow *et al.*, 2016). Dans les pays en voie de développement, l'utilisation des véhicules motorisés a augmenté considérablement le nombre de TC liés aux accidents de la voie publique (Maas *et al.*, 2017).

## 2. Physiopathologie du traumatisme crânien

Indépendamment de leur sévérité, les TC impliquent les mêmes mécanismes physiopathologiques moléculaires et cellulaires. Seules l'importance et la durée de ces mécanismes varient selon la sévérité du TC.

### 2.1. Les lésions post-traumatiques

Les lésions post-TC sont très hétérogènes, d'une part, par leur localisation et leur étendue, et d'autre part, par le moment de leur apparition. Selon leur étendue, on distingue des lésions focales et des lésions diffuses. En fonction du moment de leur apparition, le TC entraîne des lésions primaires et/ou secondaires.

#### 2.1.1. Lésions focales *versus* lésions diffuses

Les **lésions focales** résultent de phénomènes de déformation au moment de l'impact et elles incluent essentiellement les fractures du crâne, les contusions, les lacérations, les hématomes (sous-duraux et épiduraux) et les hémorragies du parenchyme cérébral (Werner et Engelhard, 2007; Mckee et Daneshvar, 2015).

Les fractures du crâne sont observées en cas de TC avec contact. Elles sont une indication de l'intensité de l'agression mécanique et non pas de la sévérité du TC. En effet,

20 à 30% des TC mortels ne sont pas associés à une fracture du crâne. De plus, on peut souffrir d'une fracture du crâne sans aucune lésion cérébrale ou hématome associé (Mckee et Daneshvar, 2015).

Les contusions hémorragiques, localisées le plus souvent au niveau des lobes frontaux et temporaux, sont le résultat de dommages de la microcirculation et autres composants du parenchyme cérébral à la suite du contact direct de la surface du cerveau avec la face interne de l'os du crâne. Ces contusions peuvent être localisées au niveau du point de l'impact (contusions du « coup ») ou du côté opposé (contusion du « contrecoup ») (Mckee et Daneshvar, 2015; McGinn et Povlishock, 2016). Elles peuvent s'accompagner d'une destruction du parenchyme le long de la surface cérébrale, on parle alors de lacération (Mckee et Daneshvar, 2015).

Les hématomes et les hémorragies sont les conséquences de déformations mécaniques et de ruptures vasculaires. Ils contribuent à la compression cérébrale, la diminution de la perfusion cérébrale, l'ischémie focale et l'œdème vasogénique (McGinn et Povlishock, 2016).

Les lésions focales vasculaires sont facilement diagnostiquées en clinique, grâce aux techniques d'imagerie (McGinn et Povlishock, 2016).

Les **lésions diffuses** regroupent les lésions axonales diffuses (LAD), les lésions vasculaires diffuses, et le gonflement cérébral diffus (Mckee et Daneshvar, 2015).

Parmi ces lésions, les LAD sont celles dont les mécanismes lésionnels sont le plus étudiés et elles seront détaillées dans le « Chapitre III: Lésions de la substance blanche et rôle des débris de myéline dans la neuro-inflammation ».

Les lésions vasculaires diffuses se manifestent sous la forme de pétéchies hémorragiques. Elles résultent d'une rapide accélération/décélération à l'origine d'un étirement voire d'une rupture des capillaires. Ces pétéchies peuvent se regrouper pour former des lésions plus étendues à l'origine d'hémorragies secondaires.

Le gonflement du tissu cérébral, qui résulte de l'œdème et de la congestion vasculaire, joue un rôle prépondérant dans l'hypertension intracrânienne observée après le TC. Chez l'enfant, ce gonflement peut toucher l'ensemble du cerveau, on parle alors de syndrome de TC juvénile (Mckee et Daneshvar, 2015).

### 2.1.2. Lésions primaires *versus* lésions secondaires

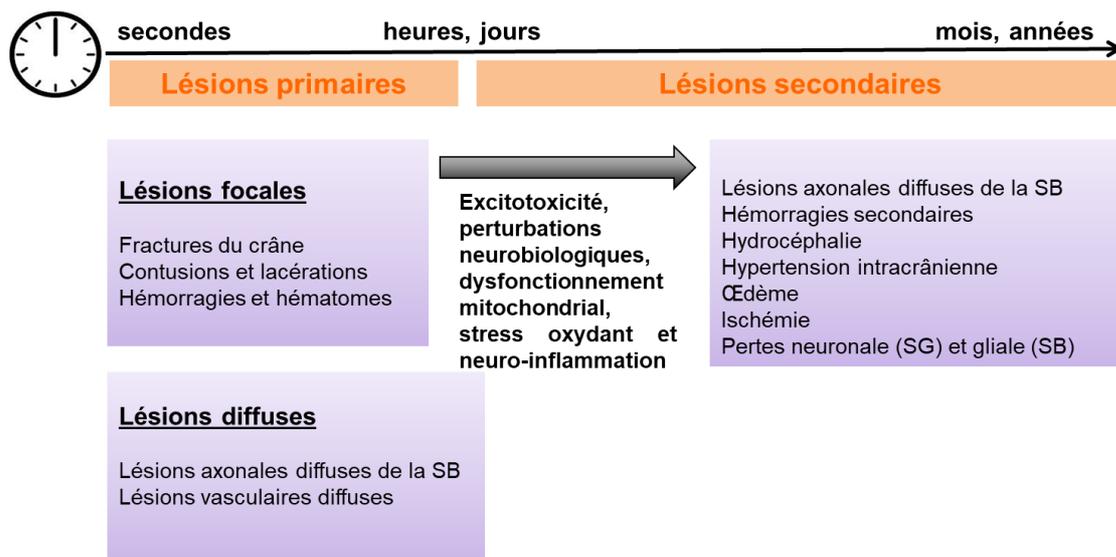
Les **lésions primaires** apparaissent immédiatement après l'impact et résultent directement des forces mécaniques qui altèrent la boîte crânienne, le parenchyme cérébral, ainsi que le compartiment vasculaire. Ces lésions primaires sont irréversibles et leur survenue ne peut être empêchée que par des mesures préventives, telles que le port

d'équipements de protection (Mckee et Daneshvar, 2015). Par ailleurs, ces lésions, pouvant être focales, multifocales ou diffuses, initient des cascades d'événements physiopathologiques moléculaires et cellulaires, incluant notamment une excitotoxicité, des altérations neurobiologiques et métaboliques, un dysfonctionnement mitochondrial, un stress oxydant et une neuro-inflammation.

Ces événements sont à l'origine d'une aggravation des lésions primaires en **lésions secondaires**, telles que l'œdème cérébral, les lésions ischémiques, l'hypertension intracrânienne et l'hydrocéphalie (Figure 1; Mckee et Daneshvar, 2015).

La survenue progressive des lésions secondaires, plus particulièrement celles touchant la substance blanche (SB), offre une large fenêtre d'intervention thérapeutique permettant de s'opposer ou de retarder leur apparition et/ou leur développement.

Les lésions secondaires au niveau du compartiment vasculaire aggravent les lésions tissulaires en accentuant les perturbations métaboliques post-TC, notamment par la diminution des apports glucidiques. Ainsi, l'hypoxie ou l'ischémie cérébrale contribuent considérablement à la morbidité et la mortalité du TC (Mckee et Daneshvar, 2015).



**Figure 1: Les lésions primaires et secondaires post-TC**

*Abréviations: SB, substance blanche; SG, substance grise*

## 2.2. Les mécanismes biomécaniques et moléculaires du traumatisme crânien

### 2.2.1. Les mécanismes biomécaniques

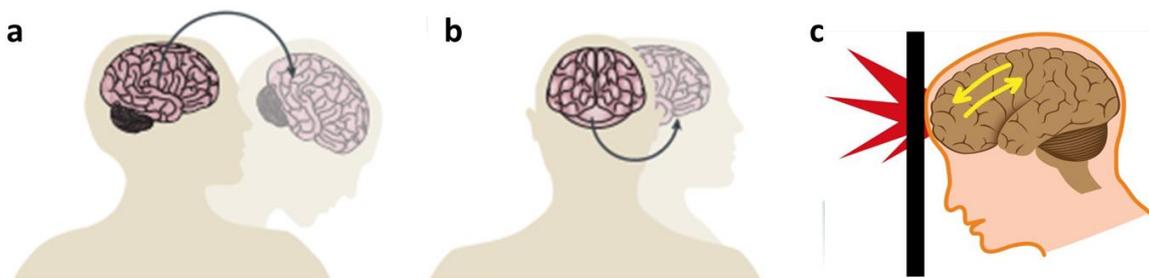
Comprendre comment des forces mécaniques externes, avec ou sans contact direct avec la tête, peuvent endommager le parenchyme cérébral est primordial, étant donné que

les lésions primaires (d'origine mécanique) constituent le point de départ de la cascade physiopathologique du TC (Finnie, 2013).

Les lésions de contact sont observées lorsque la tête est heurtée directement par un objet. Elles sont essentiellement focales et incluent les lacérations du cuir chevelu, les fractures du crâne avec ou sans hématome épidural, les contusions et les hématomes. On distingue les lésions de coup et celles de contrecoup (Finnie, 2013; Blennow *et al.*, 2016).

En l'absence de contact direct avec la tête, il existe 3 types de forces mécaniques pouvant entraîner des lésions cérébrales multifocales et diffuses (Figure 2): (1) une accélération linéaire résultant d'un mouvement de la tête vers l'avant ou l'arrière, (2) une accélération angulaire ou rotative résultant d'un mouvement latéral de la tête, et (3) une décélération résultant de l'immobilisation brutale de la tête en mouvement. Le phénomène d'accélération/décélération peut également survenir lors d'un contact direct avec la tête, si celui-ci est suffisamment fort pour faire bouger la tête et que cette dernière est libre de bouger.

Ces 3 types de forces mécaniques provoquent la propagation à travers le parenchyme cérébral d'un gradient intracrânien de pression à l'origine d'un étirement, puis d'une destruction des constituants vasculaires, cellulaires (neurones et cellules gliales) et axonaux du cerveau (Finnie, 2013; Ling *et al.*, 2015; Blennow *et al.*, 2016). Les axones étant particulièrement vulnérables à l'étirement mécanique, il en résulte souvent l'apparition de LAD (Ling *et al.*, 2015).



**Figure 2: Les trois principaux types de forces mécaniques impliquées dans les lésions primaires post-TC** (adapté de Blennow *et al.*, 2016): (a) accélération linéaire, (b) accélération rotative et (c) décélération

Outre ces agressions mécaniques sur un crâne intact (avec ou sans contact direct avec un objet), il existe une autre catégorie de TC résultant d'objets pénétrants pouvant

endommager directement le parenchyme cérébral. Il s'agit notamment de blessures par balles ou autres projectiles, notamment chez les militaires (Blennow *et al.*, 2016).

### 2.2.2. Les mécanismes moléculaires

Les lésions mécaniques vont déclencher des perturbations biochimiques qui vont participer en retour à leur aggravation et au développement des lésions secondaires.

#### 2.2.2.1. Perturbations neurochimiques et excitotoxicité

L'étirement ou la rupture mécanique des membranes cellulaires induit une perturbation des transports ioniques et du potentiel membranaire (Prins *et al.*, 2013; Pearn *et al.*, 2017). Un influx de sodium, un efflux de potassium et une accumulation de calcium intracellulaire sont ainsi observés après le TC. Ces perturbations ioniques, plus particulièrement calciques, initient des cascades d'événements intracellulaires aboutissant à l'activation d'enzymes calcium-dépendantes, un dysfonctionnement mitochondrial, une perturbation du métabolisme énergétique et une production de radicaux libres. L'élévation du calcium intracellulaire entraîne notamment l'activation de protéases calcium-dépendantes, telles que la calpaïne, une enzyme impliquée dans la dégradation du cytosquelette cellulaire et des axones (McGinn et Povlishock, 2016; Pearn *et al.*, 2017).

Par ailleurs, le calcium intracellulaire stimule la libération de glutamate à l'origine d'une excitotoxicité (Pearn *et al.*, 2017). Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central (SNC). Il agit sur des récepteurs post-synaptiques neuronaux et gliaux appartenant à deux grandes familles: (1) des récepteurs ionotropiques (iGluR) couplés à des canaux ioniques, et (2) des récepteurs métabotropiques (mGluR) couplés à des protéines G (Enriquez et Bullock, 2004). On distingue 3 types de récepteurs ionotropiques: (1) le récepteur NMDA (N-Méthyl D-Aspartate), présent exclusivement sur les neurones, et les récepteurs (2) AMPA (alpha-Amino-3-hydroxy-5-Méthylisoxazole-4-Propionate) et (3) kaïnate (KA) localisés à la fois sur les neurones et les cellules gliales. La stimulation des récepteurs NMDA neuronaux conduit à un influx calcique et contribue à son tour à l'augmentation du calcium intracellulaire (McGinn et Povlishock, 2016).

Une libération excessive de glutamate dans le milieu extracellulaire est rapidement observée à la fois en clinique et dans les modèles expérimentaux après un TC (McGinn et Povlishock, 2016). L'accumulation de glutamate est la conséquence de plusieurs mécanismes, incluant sa libération massive à partir des terminaisons nerveuses et sa fuite à partir des cellules gliales (microglies et astrocytes) et des neurones suite aux atteintes membranaires (Prins *et al.*, 2013; McGinn et Povlishock, 2016). Par ailleurs, l'altération de la recapture du glutamate par les astrocytes, principales cellules gliales impliquées dans la

régulation de l'homéostasie glutamatergique, contribue considérablement au phénomène d'excitotoxicité (McGinn et Povlishock, 2016).

Des corrélations entre le taux de glutamate et les lésions post-TC (contusions, ischémie, hématomes) ont été mises en évidence dans des modèles expérimentaux de TC (Enriquez et Bullock, 2004). De plus, sur des cultures primaires de neurones, le glutamate induit à forte concentration une mort cellulaire par nécrose. Cette toxicité neuronale est la conséquence de plusieurs mécanismes, dont deux sont principalement décrits dans la littérature. Dans un premier temps, une souffrance neuronale peut survenir suite à une stimulation excessive par le glutamate, on parle alors de phénomène d'excitotoxicité. Ce dernier est associé à des perturbations ioniques sodique, chlorique et potassique à l'origine d'un gonflement des neurones. Dans un second temps, les perturbations du flux calcique, résultant de la stimulation des récepteurs NMDA, induisent des dommages cellulaires.

#### **2.2.2.2. Dysfonctionnement mitochondrial**

La mitochondrie joue un rôle important dans l'homéostasie calcique cellulaire. Face à un influx massif de calcium dans la cellule, les capacités de capture par la mitochondrie sont vite dépassées. L'accumulation excessive de calcium dans la mitochondrie est à l'origine d'un gonflement et d'un dysfonctionnement (Cheng *et al.*, 2012; Prins *et al.*, 2013).

Le dysfonctionnement mitochondrial survient suite à l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale ou MPTP (Mitochondrial Permeability Transition Pore) sous l'action du calcium et du stress oxydant (Cheng *et al.*, 2012; McConeghy *et al.*, 2012). L'ouverture des MPTP induit la libération du cytochrome C et d'autres éléments pro-apoptotiques dans le cytosol, déclenchant ainsi une mort cellulaire programmée par apoptose. Par ailleurs, le dysfonctionnement mitochondrial se manifeste par une dépolarisation, une altération de la phosphorylation oxydative et une surproduction d'espèces réactives oxygénées (ERO; Cheng *et al.*, 2012; McConeghy *et al.*, 2012; Pearn *et al.*, 2017). L'altération de la phosphorylation oxydative entraînant un défaut de production d'ATP (Adénosine TriPhosphate), il en résulte une déplétion énergétique à l'origine d'une mort cellulaire par nécrose (Cheng *et al.*, 2012; Pearn *et al.*, 2017).

#### **2.2.2.3. Crise énergétique et perturbation du métabolisme glucidique**

Afin de faire face aux perturbations des transports ioniques et du potentiel membranaire, un besoin croissant en énergie et une augmentation transitoire du métabolisme glucidique (hyperglycolyse) sont observés pendant la phase aiguë du TC (Prins *et al.*, 2013; McGinn et Povlishock, 2016; Morley *et al.*, 2018). Une hyperglycolyse est détectée 30 minutes après un TC chez le rat et persiste pendant les 8 premiers jours chez des patients traumatisés crâniens (Prins *et al.*, 2013; McGinn et Povlishock, 2016). Toutefois, cette hyperglycolyse

transitoire laisse très rapidement place à une diminution prolongée du métabolisme glucidique pouvant persister des semaines voire des mois chez l'Homme (McGinn et Povlishock, 2016). Cette réduction du métabolisme glucidique peut être attribuée à trois mécanismes: (1) une diminution du flux sanguin cérébral, (2) une altération du transport glucidique cellulaire, et/ou (3) une altération du métabolisme glucidique cellulaire (Prins *et al.*, 2013; Morley, 2018).

La diminution du flux sanguin cérébral, pouvant être observée dès les premières minutes après la lésion, entraîne une diminution des apports en glucose et en oxygène, deux éléments indispensables à une production efficace d'ATP par glycolyse aérobie. Le métabolisme glucidique bascule alors vers la voie anaérobie qui, d'une part, ne peut produire que des quantités limitées d'ATP, et d'autre part, génère d'importantes quantités de lactates à l'origine d'une acidose métabolique (Morley *et al.*, 2018).

Une altération de la capture du glucose par les cellules cérébrales, consécutive à une diminution du transporteur neuronal de glucose GLUT1 (GLUCOSE Transporter 1), a été décrite après un TC et pourrait également contribuer à ce ralentissement du métabolisme glucidique (Prins *et al.*, 2013).

Pour résumer, face à une demande croissante en énergie pendant la phase aiguë du TC, la diminution des capacités de synthèse d'ATP est à l'origine d'une crise énergétique. Ce phénomène est accentué par le dysfonctionnement mitochondrial et l'altération des enzymes de la glycolyse pouvant être observés après un TC.

#### **2.2.2.4. Production de radicaux libres**

Les radicaux libres sont des molécules hautement réactives, en raison de la présence d'un nombre impair d'électrons libres dans leur couche externe qui les rend instables (Prins *et al.*, 2013). Ces radicaux libres comprennent les ERO et les espèces réactives nitrées (ERN).

Dans les conditions physiologiques, ils sont générés par la mitochondrie au cours de la phosphorylation oxydative (Enriquez et Bullock, 2004). Ils sont indispensables à certaines réactions enzymatiques, à la transduction de certains signaux, à l'activation de facteurs de transcription, à l'expression génique, au transfert d'électrons à travers la chaîne respiratoire mitochondriale, ainsi qu'à l'action microbicide des polynucléaires neutrophiles et des macrophages. Ces radicaux libres sont neutralisés par des systèmes anti-oxydants endogènes ou exogènes (apportés par l'alimentation), tels que des enzymes (catalase, superoxyde dismutase ou SOD, glutathion peroxydase...) et des vitamines (Margaill *et al.*, 2005).

Le cerveau est particulièrement vulnérable aux stress oxydant et nitrant du fait de son importante activité métabolique oxydative, et de ses faibles capacités anti-oxydantes et de

réparation. Ainsi, dans des conditions pathologiques, telles que le TC, ces systèmes anti-oxydants se trouvent dépassés face à la surproduction de radicaux libres et/ou l'inactivation des systèmes anti-oxydants. Il en résulte des dommages consistant essentiellement en (1) une peroxydation lipidique, se traduisant par une perte de l'intégrité des membranes cellulaires, (2) des atteintes protéiques, et (3) des cassures de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique). De plus, les ERO peuvent perturber le bon fonctionnement mitochondrial et amplifient ainsi le stress oxydant.

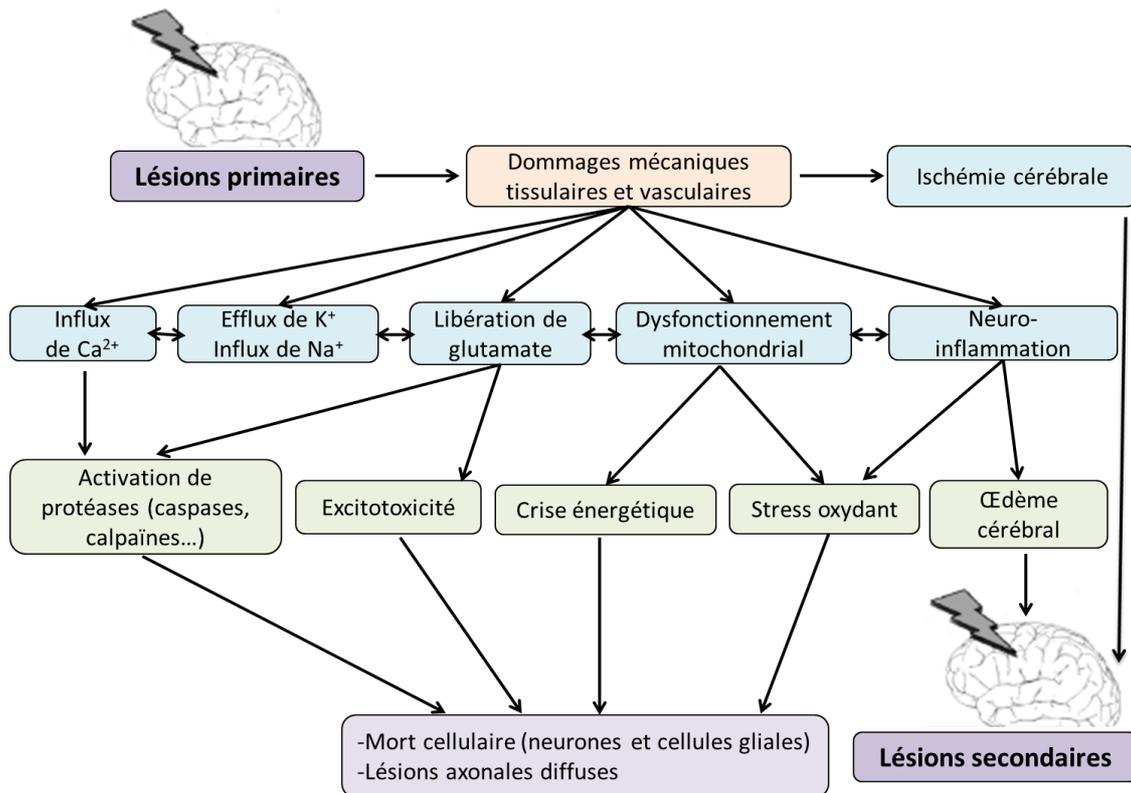
Après un TC, le stress oxydant peut être mis en évidence, soit par des méthodes directes consistant à quantifier les radicaux libres (malgré leur courte durée de vie), soit par l'étude de leurs effets: peroxydation lipidique, nitration protéique ou oxydation de l'ADN (Prins *et al.*, 2013). Une production de radicaux libres apparaît dès les premières minutes suivant le TC. Plusieurs mécanismes moléculaires et cellulaires, décrits précédemment, peuvent être à l'origine de la surproduction de radicaux libres après un TC. Il s'agit notamment du dysfonctionnement mitochondrial, de la libération excessive de glutamate et de l'efflux massif de calcium (Enriquez et Bullock, 2004; Prins *et al.*, 2013). Le dysfonctionnement mitochondrial, pouvant notamment résulter de l'excitotoxicité et de la toxicité calcique (Figure 3), est à l'origine d'une augmentation de la production d'anions superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ). Par ailleurs, le calcium peut activer des enzymes cytosoliques, telles que la xanthine déshydrogénase, la phospholipase A2 (PLA2) et les NO-synthases (NOS), qui vont produire des anions  $O_2^{\cdot-}$  et du monoxyde d'azote (NO) (Prins *et al.*, 2013). L'association de ces deux derniers aboutit à la formation d'un produit hautement réactif, l'anion peroxydinitrite ( $ONOO^{\cdot-}$ ).

#### **2.2.2.5. Neuro-inflammation**

Le cerveau était traditionnellement considéré comme l'un des sites de privilège immun, du fait d'un faible drainage lymphatique et de la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE). De nos jours, cette idée est totalement abandonnée, en raison de nombreuses preuves expérimentales et cliniques du rôle primordial de la neuro-inflammation dans les pathologies neurodégénératives et traumatiques du SNC.

Après un TC, une réponse inflammatoire est très rapidement initiée par les dommages cellulaires et tissulaires. Elle est orchestrée par les cellules gliales résidentes (microglies et astrocytes), les lymphocytes et les macrophages sanguins infiltrants. Ces acteurs cellulaires sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des ERO et des ERN qui contribuent aux lésions secondaires post-TC (mort cellulaire, œdème, hypertension intracrânienne...). Toutefois, la réponse inflammatoire est également indispensable à la réparation et la neurorégénération après un TC. Le rôle de la neuro-inflammation dans le TC,

et plus particulièrement celui de l'activation microgliale, sera détaillé dans le « Chapitre II: La neuro-inflammation post-traumatique ».



**Figure 3: Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la formation des lésions post-TC** (adapté de Beauchamp *et al.*, 2008)

Abréviations:  $Ca^{2+}$ , calcium;  $K^+$ , potassium;  $Na^+$ , sodium

### 3. Manifestations cliniques du traumatisme crânien

Le tableau clinique peut être assez hétérogène et variable selon la sévérité du TC. Il regroupe des déficits neurologiques et cognitifs, des troubles comportementaux et des désordres psychiatriques (Blennow *et al.*, 2012; Lozano *et al.*, 2015). Bien que ces symptômes puissent disparaître au bout de quelques heures, jours ou semaines suivant le TC, il existe des cas où ces symptômes persistent plusieurs années.

#### 3.1. Les symptômes neurologiques et cognitifs

Pendant la phase aiguë du TC, les déficits neurologiques peuvent se manifester par une diminution du niveau de conscience, des troubles de la parole et de l'équilibre. Des manifestations physiques, telles que des maux de tête, des vertiges, des nausées, une fatigue, des troubles de l'audition et de la vision, peuvent être associées (Lozano *et al.*, 2015).

Des symptômes neurologiques plus tardifs incluent l'ataxie, la spasticité, les troubles de la coordination et les symptômes extrapyramidaux avec un ralentissement des mouvements (Blennow *et al.*, 2012).

Les déficits cognitifs sont les symptômes les plus fréquents du TC avec un impact considérable sur la vie sociale et professionnelle des patients. Parmi ces déficits cognitifs, sont décrits essentiellement des troubles des fonctions exécutives (résolution des problèmes, contrôle de soi et des impulsions), de l'attention, de la mémoire courte, de l'apprentissage et du langage (McAllister, 2011; Lozano *et al.*, 2015). Ces symptômes peuvent persister longtemps après le TC. En effet, des études cliniques menées chez des joueurs professionnels de football américain retraités, ayant subi des TC répétés au cours de leur carrière, montrent une augmentation des déficits cognitifs et neuropsychologiques chez ces derniers comparativement aux témoins volontaires. De plus, des corrélations ont été mises en évidence entre les atteintes cognitives et la fréquence des TC (Mckee et Daneshvar, 2015). Dans une autre étude, des anciens joueurs universitaires de hockey et de football américain présentent une réduction significative de la mémoire épisodique et du fonctionnement du lobe frontal (mesurée par électrophysiologie), après avoir subi des commotions cérébrales 30 ans auparavant. Par ailleurs, il a été montré que des vétérans de la seconde guerre mondiale ayant subi un TC présentaient un déclin des performances cognitives, entre 10 à 30 ans suivant le TC, plus important que celui de vétérans n'ayant subi aucun TC. Grâce à des études fonctionnelles par imagerie par résonance magnétique (IRM), une altération de l'activité cérébrale a été visualisée en l'absence de déficits cognitifs associés chez des patients traumatisés crâniens avec néanmoins des symptômes persistants (Ling *et al.*, 2015).

### **3.2. Les symptômes comportementaux et psychiatriques**

Le terme « changement de personnalité » est souvent employé pour désigner les modifications émotionnelles et comportementales pouvant survenir après un TC (McAllister, 2011; Lozano *et al.*, 2015). Ces modifications incluent un manque de perspicacité et de prise de décision, une désinhibition, une euphorie, une impulsivité, une irritabilité, une instabilité affective et une apathie (McAllister, 2011; Blennow *et al.*, 2012). Le début, la durée et l'intensité de ces symptômes sont variables selon la sévérité du TC et les structures cérébrales impactées (McAllister, 2011).

Le TC expose à un risque accru de désordres psychiatriques, tels que les troubles paniques, la dépression, la toxicomanie, l'état de stress post-TC (ESPT) et les syndromes psychotiques. Dans une étude menée sur 60 patients, 48% ont développé des troubles psychiatriques 30 ans après le TC (Koponen *et al.*, 2002; McAllister, 2011).

Durant ces dernières années, un intérêt particulier a été porté au lien entre le TC et l'ESPT. Des études, menées principalement chez des militaires, révèlent un risque accru d'ESPT en cas d'exposition à un TC (McAllister, 2011). A titre d'exemple, 3 à 4 mois après leur retour de zone de combat, des symptômes d'ESPT sont observés chez des soldats américains déployés en Irak (pendant 1 année) et présentant des antécédents de TC (Hoge *et al.*, 2008). L'incidence d'ESPT est plus importante chez ceux ayant subi une perte de conscience au moment du TC par rapport à ceux n'ayant présenté que des troubles mentaux ou autres, suggérant que la sévérité du TC joue un rôle dans l'apparition de l'ESPT.

#### **4. Encéphalopathie traumatique chronique et autres conséquences chroniques du traumatisme crânien**

L'encéphalopathie traumatique chronique (ETC) est un syndrome de type neurodégénératif diagnostiqué *post-mortem* chez des individus ayant subi des commotions cérébrales ou des TC répétitifs, tels que les boxeurs, les joueurs de football américain et les militaires (Blennow *et al.*, 2012, 2016; Montenigro *et al.*, 2015).

Décrites depuis longtemps chez les boxeurs, les conséquences irréversibles à long terme des TC ont d'abord été désignées sous le terme de « punch-drunk syndrome », puis d'encéphalite traumatique des pugilistes ou démence pugilistique, avant d'être finalement regroupées sous la dénomination d'ETC (Ling *et al.*, 2015; Montenigro *et al.*, 2015; Blennow *et al.*, 2016). Environ un tiers des boxeurs professionnels retraités présenterait des symptômes d'ETC (Blennow *et al.*, 2012). Cette pathologie est caractérisée par une accumulation irrégulière de la protéine tau hyperphosphorylée (P-tau). A la différence des autres maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer, cette accumulation est essentiellement périvasculaire et subcorticale, à proximité des lésions axonales, des hémorragies microvasculaires, et des microglies et astrocytes activés (Ling *et al.*, 2015; Montenigro *et al.*, 2015; Blennow *et al.*, 2016). De plus, des dépôts du peptide amyloïde bêta (A $\beta$ ) et une accumulation de la protéine TDP-43 (Tau DNA-binding Protein-43) sont également observés chez les patients (Montenigro *et al.*, 2015; Blennow *et al.*, 2016). D'autres anomalies structurelles, telles qu'une atrophie cérébrale, un élargissement des ventricules, une atrophie du corps calleux, une dégénérescence neurofibrillaire de la substance noire et du cortex, ainsi qu'une mort des neurones dans le cervelet, sont associées à l'ETC (Mckee et Daneshvar, 2015).

Les symptômes cliniques de l'ETC se développent progressivement et incluent des modifications de l'humeur, des troubles cognitifs et des désordres psychiatriques. Des troubles moteurs de type parkinsonien, tels que des tremblements et une hypertonie (rigidité), peuvent également être observés (Montenigro *et al.*, 2015).

En dehors de ces manifestations cliniques assez hétérogènes et non spécifiques, il n'existe malheureusement pas de symptômes spécifiques ou biomarqueurs permettant un diagnostic précis de l'ETC chez les sportifs (Mckee et Daneshvar, 2015; Montenegro *et al.*, 2015; Blennow *et al.*, 2016).

Le TC expose à un risque accru de développement d'autres maladies neurodégénératives, telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson ou encore la sclérose latérale amyotrophique. De nombreuses études cliniques révèlent une augmentation de l'incidence de ces pathologies chez les personnes victimes de TC, corrélée à la sévérité des lésions (Mckee et Daneshvar, 2015; Maas *et al.*, 2017).

Les pathologies neurodégénératives sont souvent caractérisées par des dépôts ou l'accumulation de protéines anormales dans le cerveau. Il s'agit notamment de dépôts du peptide A $\beta$  et de l'accumulation de protéine tau dans la maladie d'Alzheimer, et de l'accumulation de l' $\alpha$ -synucléine dans la maladie de Parkinson. Or, des analyses physiopathologiques *post-mortem* révèlent une association entre les lésions axonales post-TC et l'accumulation du peptide A $\beta$ , de la protéine tau et/ou de l' $\alpha$ -synucléine (Mckee et Daneshvar, 2015). Ainsi, des dépôts intra-axonaux du peptide A $\beta$  sont décrits pendant les phases aiguë et chronique du TC. La protéine tau s'accumule essentiellement dans les axones et les corps cellulaires neuronaux.

Les mécanismes moléculaires et cellulaires pouvant expliquer ce lien ne sont pas encore totalement élucidés. Toutefois, les lésions axonales, les atteintes vasculaires et de la BHE, ainsi que la neuro-inflammation chronique, sont autant de phénomènes pouvant survenir après un TC et être à l'origine de cette neurodégénérescence chronique.

## **5. Prise en charge clinique du traumatisme crânien**

La prise en charge du TC a pour objectif la prévention des lésions secondaires. L'ischémie cérébrale étant l'un des mécanismes de la cascade physiopathologique post-TC à l'origine des lésions secondaires, les recommandations internationales actuelles, concernant la prise en charge en urgence des patients traumatisés crâniens, visent essentiellement à assurer une meilleure perfusion et oxygénation cérébrale par le contrôle de certains paramètres physiologiques, comme les pressions sanguine et intracrânienne (Van den bergh, 2016; Stocchetti *et al.*, 2017).

Cette prise en charge débute par le traitement de la phase aiguë (dans les minutes ou les heures qui suivent le TC), puis se poursuit par le traitement des séquelles subaiguës et chroniques pouvant durer jusqu'à des années après le TC. Elle combine des procédures médicales et chirurgicales, auxquelles se rajoute une réhabilitation, afin de favoriser la récupération et la réintégration sociale des patients (Maas *et al.*, 2017).

## 5.1. Prise en charge de la phase aiguë

Les premières heures suivant le TC sont qualifiées d'heures « en or », car leur prise en charge est très importante et pourrait conditionner le reste de la cascade physiopathologique du TC (Maas *et al.*, 2017).

En cas de TC sévère, la prise en charge initiale a pour objectif la stabilisation de l'état général du patient, ainsi que la détection et le traitement chirurgical des hémorragies intracrâniennes.

La réanimation et la stabilisation de l'état général du patient consiste à (1) restaurer le volume vasculaire, en vue d'assurer une meilleure perfusion cérébrale, (2) lutter contre l'hypertension intracrânienne, afin de maintenir la perfusion cérébrale, et (3) limiter l'hypoxie (Van den Bergh, 2016).

Les approches médicales et pharmacologiques sont très variées et incluent (1) une sédation (anesthésiques, morphine, benzodiazépines...), (2) une osmothérapie (mannitol et solutions salines hypertoniques), afin de diminuer l'œdème cérébral, (3) une hypoventilation, afin de réduire le volume intracrânien (vasoconstriction cérébrale induite par l'hypocapnie), et (4) une hypothermie (32 à 34°C) pour une éventuelle neuroprotection (Van den Bergh, 2016; Maas *et al.*, 2017; Stocchetti *et al.*, 2017).

Une intervention chirurgicale pendant la phase aiguë du TC peut avoir un intérêt direct ou indirect. Un exemple d'approche directe consiste à éliminer les hématomes intracrâniens pouvant être à l'origine d'une compression cérébrale. L'approche indirecte consiste, par exemple, à réduire les dommages cérébraux en diminuant la pression intracrânienne, grâce à une craniotomie décompressive ou un drainage du liquide céphalorachidien (LCR) (Maas *et al.*, 2017).

## 5.2. Prise en charge des phases subaiguë et chronique

La prise en charge des phases subaiguë et chronique du TC consiste à traiter les séquelles post-TC par pharmacothérapie, afin de permettre la réhabilitation sociale et professionnelle des patients. Comme décrit précédemment, les séquelles subaiguës et chroniques post-TC sont très hétérogènes et peuvent être de type neurocognitif, neurocomportemental ou neuropsychiatrique. Ainsi, selon les symptômes diagnostiqués, les médicaments prescrits sont essentiellement des psychostimulants, des antidépresseurs, des neuroleptiques, des anxiolytiques, des antiparkinsoniens ou des anticonvulsivants. D'autres classes de médicaments se sont également révélées efficaces dans le traitement de certaines séquelles du TC, telles que les  $\beta$ -bloquants, les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et les anti-androgènes (estrogène et médroxyprogestérone) (Talsky *et al.*, 2011; Bhatnagar *et al.*, 2016).

Dans l'ensemble, ces pharmacothérapies, administrées pendant la phase subaiguë du TC, visent essentiellement à restaurer les transmissions dopaminergique, sérotoninergique, noradrénergique, cholinergique ou glutamatergique perturbées.

Dans le tableau I sont cités des exemples de molécules prescrites pour le traitement de diverses manifestations cliniques subaiguës du TC.

Les preuves d'efficacité de certaines de ces pharmacothérapies restent toutefois à confirmer par des études cliniques de plus grande envergure (Diaz-Arrastia *et al.*, 2014). En effet, la prise en charge symptomatique des patients traumatisés crâniens repose le plus souvent sur des recommandations utilisées dans d'autres pathologies avec des symptômes similaires. Ainsi, il n'existe malheureusement pas de recommandations standard spécifiques pour la prise en charge pharmacologique des séquelles post-TC. Le choix de la stratégie pharmacologique optimale doit faire l'objet d'une réflexion multidisciplinaire et tenir compte de la sévérité des atteintes neurologiques, de la nature des lésions, ainsi que du temps écoulé depuis le TC (Tasky *et al.*, 2011).

**Tableau I: Liste non exhaustive de médicaments utilisés pour le traitement des séquelles post-TC (Bhatnagar *et al.*, 2016)**

<b>Manifestations cliniques</b>	<b>Médicaments</b>
<b>Excitation/agitation (irritabilité, agressivité...)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Propranolol et pindolol (<math>\beta</math> bloquants non sélectifs)</li> <li>- Buspirone et benzodiazépines (anxiolytiques)</li> <li>- Amantadine (antiparkinsonien)</li> <li>- Lamotrigine (antiépileptique)</li> </ul>
<b>Altération de la conscience</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Amantadine, bromocriptine, lévodopa/carbidopa et pramipexol (antiparkinsoniens)</li> <li>- Sertraline (antidépresseur)</li> <li>- Modafinil (psychostimulant)</li> </ul>
<b>Troubles de l'attention</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Méthylphénidate (psychostimulant)</li> <li>- Donépézil (inhibiteur de l'acétylcholinestérase)</li> <li>- Bromocriptine (antiparkinsonien)</li> </ul>
<b>Troubles de la mémoire</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Donépézil et rivastigmine (inhibiteurs de l'acétylcholinestérase)</li> </ul>
<b>Troubles du sommeil</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mélatonine</li> <li>- Benzodiazépines</li> <li>- Prazosine (antagoniste adrénergique <math>\alpha_1</math>)</li> </ul>
<b>Dépression</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sertraline et citalopram (antidépresseurs)</li> </ul>
<b>Maux de têtes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Paracétamol (antalgique)</li> <li>- Triptans (antimigraineux)</li> <li>- Traitements prophylactiques: <math>\beta</math> bloquants, antiépileptiques, antidépresseurs...</li> </ul>
<b>Spasticité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Baclofène, dantrolène... (myorelaxants)</li> </ul>

## 6. Pharmacologie de la neuroprotection dans le traumatisme crânien

### 6.1. Définition du concept de neuroprotection

La neuroprotection, qui vise à préserver l'intégrité structurelle et le fonctionnement neuronal, est l'objectif thérapeutique recherché dans le traitement de nombreuses pathologies neurologiques, telles que les maladies de Parkinson et d'Alzheimer, la sclérose en plaques, l'ischémie cérébrale et le TC. Cette définition reste néanmoins assez large et le concept de neuroprotection est souvent mal ou sur-utilisé. Une définition plus pragmatique est proposée par les cliniciens et consiste au maintien des dommages neuronaux et gliaux à un seuil asymptomatique (Casson *et al.*, 2012; Wiendl *et al.*, 2015).

Les stratégies neuroprotectrices sont multiples. Ainsi, on distingue des stratégies visant à prévenir, à limiter les dommages neuronaux, et/ou à stimuler les mécanismes de réparation endogènes (Wiendl *et al.*, 2015). De plus, ces stratégies peuvent être directes ou indirectes. Ainsi, inhiber des mécanismes cytotoxiques directs, tels que le stress oxydant, l'excitotoxicité ou le dysfonctionnement mitochondrial, assure une neuroprotection directe, alors que cibler des phénomènes plus complexes, tels que la neuro-inflammation, à l'origine de ces mécanismes cytotoxiques, fournit une neuroprotection indirecte (Wiendl *et al.*, 2015).

En dépit d'un effort considérable de la recherche préclinique pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de la neurodégénérescence, la transposition des résultats précliniques en clinique reste très limitée. Le grand défi actuel du concept de neuroprotection est de trouver la fenêtre thérapeutique appropriée, en vue d'une intervention pharmacologique efficace en fonction de la progression de la pathologie.

### 6.2. La neuroprotection dans le traumatisme crânien

La physiopathologie multifacette du TC laisse place à un large panel de cibles pharmacologiques en vue d'une éventuelle neuroprotection. Toutefois, à ce jour, la majorité des stratégies neuroprotectrices, ne visant qu'une seule de ces cibles, ont échoué en clinique malgré des résultats très encourageants dans les modèles expérimentaux. Ces échecs témoignent de la discordance entre les modèles expérimentaux de TC et les essais cliniques.

Les thérapies neuroprotectrices émergentes dans le domaine du TC peuvent être répertoriées en plusieurs catégories selon le mécanisme physiopathologique ciblé (Kochanek *et al.*, 2015). En raison de la très grande diversité des molécules, ne seront abordés dans cette partie que des exemples de molécules visant à moduler (1) l'excitotoxicité et la mort neuronale, (2) le dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydant, (3) les lésions axonales, et (4) la neuro-inflammation.

D'autres mécanismes physiopathologiques du TC, tels que l'œdème ou l'ischémie cérébrale, contribuant également à la mort neuronale et gliale, constituent des cibles thérapeutiques tout aussi intéressantes en vue d'une neuroprotection post-TC.

### 6.2.1. Thérapies ciblant l'excitotoxicité

L'objectif des thérapies ciblant le phénomène d'excitotoxicité est d'empêcher l'accumulation de calcium intracellulaire et/ou les cascades de signalisation intracellulaire pro-apoptotiques ou pro-nécrotiques qui en résultent.

Le récepteur NMDA a longtemps été la cible de stratégies thérapeutiques, mais, malgré une efficacité largement démontrée dans les modèles expérimentaux de TC, les antagonistes du récepteurs NMDA (MK801, topiramate, selfotel...) ont tous échoué en clinique (McConeghy *et al.*, 2012; Kochanek *et al.*, 2015; Stein *et al.*, 2015). Le dexanabinol, un agoniste des récepteurs cannabinoïdes possédant des propriétés antagonistes du récepteur NMDA, a également été testé dans un essai clinique de phase II, mais n'a entraîné aucune amélioration clinique (McConeghy *et al.*, 2012; Stein *et al.*, 2015).

Une meilleure connaissance de la transmission glutamatergique et de la structure du récepteur NMDA a permis de développer des molécules plus sélectives. En effet, le récepteur NMDA est un hétérodimère constitué des sous-unités NR1 (présente au niveau synaptique et extra-synaptique) et NR2A (prédomine au niveau synaptique), et NR2B (prédomine au niveau extra-synaptique). L'activation des récepteurs NMDA synaptiques entraîne une augmentation du calcium intranucléaire à l'origine d'un effet neuroprotecteur, en augmentant l'expression de gènes impliqués dans la survie neuronale, comme le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), ou dans l'effet anti-oxydant. A l'inverse, la stimulation des récepteurs NMDA extra-synaptiques entraîne une augmentation du calcium cytosolique à l'origine d'une mort cellulaire (Kochanek *et al.*, 2015). Les antagonistes sélectifs de la sous-unité NR2B, tels que la mémantine, ont montré des effets neuroprotecteurs dans les modèles animaux de TC (Kochanek *et al.*, 2015; Stein *et al.*, 2015). Une autre molécule ayant également échouée en clinique est le magnésium, qui inhibe indirectement les récepteurs NMDA en empêchant l'influx de calcium (McConeghy *et al.*, 2012; Stein *et al.*, 2015).

Une des limites du blocage des récepteurs NMDA réside dans l'inhibition de la régénération neuronale à long terme. Il serait donc intéressant d'envisager une approche thérapeutique visant à bloquer l'excitotoxicité pendant la phase aiguë du TC, puis au contraire de favoriser l'activité glutamatergique pendant la phase de réparation (Kochanek *et al.*, 2015).

### 6.2.2. Thérapies ciblant le dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydant

Le dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydant sont deux phénomènes indissociables qui s'amplifient mutuellement, créant ainsi davantage de dommages post-TC.

Afin de réduire le dysfonctionnement mitochondrial, des molécules capables d'inhiber l'ouverture des MPTP ont été testées en préclinique, puis en clinique. Des résultats encourageants ont ainsi été obtenus avec la cyclosporine dans un essai clinique de phase II (McConeghy *et al.*, 2012; Kochanek *et al.*, 2015). Une autre molécule ciblant plus spécifiquement la mitochondrie, l'hémigramicidine-nitroxyde (GS-nitroxyde), a montré des effets neuroprotecteurs dans des modèles animaux de TC (Kochanek *et al.*, 2015).

Bien que la simple inhibition du stress oxydant puisse conférer des effets neuroprotecteurs dans les modèles expérimentaux de TC, la transposition de ce résultat en clinique a également été un échec. De nombreuses stratégies thérapeutiques ont ainsi été explorées (McConeghy *et al.*, 2012; Kochanek *et al.*, 2015; Stein *et al.*, 2015) avec par exemple:

- des inhibiteurs de la peroxydation lipidique, comme le tirilazad.
- la superoxyde dismutase conjuguée au polyéthylène glycol (PEG-SOD), comme la pegorgotéine.
- des agents anti-oxydants visant à neutraliser les ERO et les ERN, comme la N-acétylcysteine (NAC).

### 6.2.3. Thérapies visant à réduire les lésions axonales

Dans cette partie sont regroupées les thérapies visant à stabiliser le cytosquelette, à rétablir l'homéostasie ionique, à inhiber les protéases, ainsi que l'hypothermie.

La stabilisation du cytosquelette axonal peut se faire grâce à des chimiothérapies capables d'inhiber la dépolymérisation des microtubules survenant au moment de l'étirement mécanique (Kochanek *et al.*, 2015). Le taxol, ayant démontré un effet bénéfique après une lésion de la moelle épinière chez le rat, pourrait constituer une thérapie potentielle pour réduire les lésions mécaniques axonales survenant pendant la phase aiguë du TC.

Peu d'études ont directement ciblé l'influx calcique. Toutefois, des antagonistes des canaux calciques, la nimodipine et la nicadipine, ont fait l'objet d'essais cliniques, mais sans succès. Une méta-analyse de 6 essais cliniques à différentes phases (I à IV) montre que seuls les patients avec des hémorragies sous-arachnoïdiennes présentent une amélioration de la survie et/ou une réduction de la sévérité des lésions après traitement avec les antagonistes calciques (Langham *et al.*, 2003). Toutefois, ces antagonistes calciques

pourraient par leur effet hypotenseur aggraver les dommages cérébraux pendant la phase aiguë du TC (McConeghy *et al.*, 2012; Kochanek *et al.*, 2015).

Les recherches se sont donc focalisées sur l'inhibition des cascades cellulaires initiées par l'influx calcique, en particulier l'activation de protéases calcium-dépendantes. Les inhibiteurs de la calpaïne (MDL28170, AK29, SJA-6017 et citicoline) réduisent les LAD dans des modèles expérimentaux de TC (Kochanek *et al.*, 2015). Néanmoins, l'échec en clinique de la citicoline démontre encore une fois l'inefficacité des thérapies ne ciblant qu'un seul mécanisme physiopathologique post-TC.

Enfin, une hypothermie modérée a permis de diminuer les lésions axonales dans les modèles expérimentaux, mais ne présente réellement pas d'avantages en clinique (Kochanek *et al.*, 2015).

#### **6.2.4. Thérapies ciblant la neuro-inflammation**

Souvent associée aux séquelles neurologiques et psychiatriques du TC, la neuro-inflammation constitue actuellement l'une des cibles thérapeutiques les plus étudiées en vue d'un effet neuroprotecteur. En effet, les molécules anti-inflammatoires contribuent à la préservation neuronale et gliale en inhibant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, des radicaux libres et autres substances cytotoxiques libérées au cours de l'inflammation.

Parmi les molécules ayant démontré un effet anti-inflammatoire dans les modèles expérimentaux de TC, on retrouve les immunosuppresseurs, les inhibiteurs du cycle cellulaire, ainsi que diverses molécules pléiotropes. Beaucoup de ces molécules ont fait l'objet d'essais cliniques (Kabadi et Faden, 2014; Stein *et al.*, 2015; Hellewell *et al.*, 2016).

##### **6.2.4.1. Les immunosuppresseurs**

La suppression totale de la réponse inflammatoire post-TC est toutefois délétère. En effet, il a été montré que des corticothérapies immunosuppressives à forte dose (méthylprednisolone) augmentent la mortalité chez des patients traumatisés crâniens (Hellewell *et al.*, 2016), témoignant ainsi du rôle bénéfique de la neuro-inflammation dans la neurorégénération après un TC.

De nombreuses molécules anti-inflammatoires visant à inhiber certains acteurs moléculaires, comme les cytokines pro-inflammatoires et les chimiokines, ou cellulaires, tels que les microglies, astrocytes, macrophages ou neutrophiles, de la réponse inflammatoire ont également été testées dans des modèles de TC (Hellewell *et al.*, 2016). Certaines de ces stratégies seront détaillées dans le « Chapitre II: La neuro-inflammation post-traumatique ».

#### 6.2.4.2. *Les inhibiteurs du cycle cellulaire*

Le TC induit une activation du cycle cellulaire dans les neurones et les cellules gliales. Lorsque cela concerne des cellules post-mitotiques, c'est-à-dire ayant perdu la capacité de se diviser, comme les neurones et les oligodendrocytes matures, ce phénomène conduit à une mort cellulaire programmée par apoptose (Kabadi et Faden, 2014). A l'inverse, une prolifération cellulaire est observée lorsque ce phénomène concerne des cellules mitotiques, telles que les microglies et les astrocytes. L'inhibition du cycle cellulaire présente donc un double avantage, d'une part, la mort neuronale est empêchée, et d'autre part, la neuro-inflammation est diminuée.

Dans des modèles expérimentaux de TC, il a été montré que le flavopiridol, un inhibiteur non sélectif des kinases dépendantes des cyclines (jouant un rôle majeur dans la régulation du cycle cellulaire), réduit le volume de la lésion, améliore la récupération cognitive et sensorimotrice à long terme, inhibe la mort neuronale par apoptose et réduit la prolifération des microglies et des astrocytes au niveau du site de la lésion (Kumar et Loane, 2012; Kabadi et Faden, 2014). Une réduction du volume de la lésion est également observée lorsque le traitement est administré tardivement, 24 heures après le TC. La roscovitine, un inhibiteur plus sélectif des kinases dépendantes des cyclines, présente des effets protecteurs similaires et s'oppose à la neurodégénérescence et l'inflammation chronique post-TC.

Ces inhibiteurs du cycle cellulaire sont très étudiés pour le traitement des cancers. Ils sont hautement toxiques lors d'une administration chronique et seule une administration à court terme pourrait être envisagée en vue d'une neuroprotection post-TC (Kabadi et Faden, 2014).

#### 6.2.4.3. *Les molécules à propriétés pléiotropes*

L'érythropoïétine, la minocycline, les statines, les agonistes des récepteurs PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) et la progestérone sont des exemples de molécules multifonctionnelles, possédant des propriétés anti-inflammatoires, ayant permis de diminuer les séquelles post-TC dans des modèles expérimentaux de TC.

- **L'érythropoïétine** est une glycoprotéine impliquée dans l'érythrogenèse. Elle est synthétisée naturellement dans le cerveau par les neurones et les astrocytes. Elle se fixe sur des récepteurs spécifiques exprimés par les neurones, les astrocytes et les microglies (Hellewell *et al.*, 2016). Cette molécule a été très décrite pour ses propriétés neuroprotectrices dans des modèles d'ischémie cérébrale, de sclérose en plaques, de maladie de Parkinson, d'épilepsie, ainsi que de TC. Cette neuroprotection résulte à la fois

d'une diminution de la neuro-inflammation et de la perte neuronale par apoptose, mais également des effets pro-angiogénique, neurotrophique et anti-oxydant de l'érythropoïétine (Hellewell *et al.*, 2016; Pearn *et al.*, 2017). Malheureusement, les nombreux essais cliniques menés avec cette molécule n'ont pas donné de résultats favorables (Hellewell *et al.*, 2016; Pearn *et al.*, 2017). Toutefois, un essai clinique de phase III, visant à étudier les effets à long terme de l'érythropoïétine sur la survie, les déficits neurologiques et la qualité de vie des patients, est actuellement en cours (recrutement des patients) en Australie et en Nouvelle-Zélande (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03061565>).

- **La minocycline** est une tétracycline de deuxième génération qui possède des propriétés neuroprotectrices indépendantes de son activité antimicrobienne (Kumar et Loane, 2012). Elle s'oppose à l'activation microgliale, la production de cytokines pro-inflammatoires et la mort neuronale dans des modèles expérimentaux de TC et de sclérose en plaques (Kumar et Loane, 2012; Pearn *et al.*, 2017). Des résultats encourageants ont été obtenus en clinique dans le traitement de la sclérose en plaques (Hellewell *et al.*, 2016; Pearn *et al.*, 2017).

- **Les agonistes des récepteurs PPAR:**

Les PPAR sont des récepteurs nucléaires qui modulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, la reproduction, le développement et la réponse immunitaire. Après liaison du ligand, le récepteur PPAR forme un hétérodimère avec le récepteur X des rétinoïdes, qui va permettre de moduler l'expression de nombreux gènes (Kumar et Loane, 2012). Il a été montré que l'activation du récepteur PPAR est associée à une diminution des médiateurs pro-inflammatoires, tels que la NOS2 et la cyclo-oxygénase de type 2 (COX2) (Kumar et Loane, 2012; Pearn *et al.*, 2017). Dans des modèles expérimentaux de TC, le fénofibrate, un agoniste du récepteur PPAR $\alpha$ , a permis de diminuer l'inflammation, le stress oxydant et l'œdème cérébral, ainsi que les déficits neurologiques (Besson *et al.*, 2005a; Chen *et al.*, 2007). De façon similaire, les agonistes du récepteur PPAR $\gamma$ , pioglitazone et rosiglitazone, réduisent l'activation microgliale et augmentent l'expression de protéines chaperonnes anti-oxydantes (Mn-SOD) et neuroprotectrices (Heat Shock Proteins ou HSP27/70) à l'origine d'une amélioration histologique et fonctionnelle (Kumar et Loane, 2012; Pearn *et al.*, 2017).

- **Les statines** sont des hypolipémiants qui inhibent l'HMG-CoA (3-Hydroxy-3-MéthylGlutaryl-Coenzyme A) réductase, l'enzyme catalysant la synthèse du mévalonate qui conduit ensuite à la production de cholestérol. Les statines possèdent d'autres effets,

notamment au niveau vasculaire. En effet, elles augmentent la production de NO au niveau de l'endothélium vasculaire et réduisent l'inflammation vasculaire (Kumar et Loane, 2012; Pearn *et al.*, 2017). Expérimentalement, il a été montré que les statines améliorent les séquelles fonctionnelles du TC, en s'opposant à la production de cytokines pro-inflammatoires, la formation de l'œdème cérébral, l'activation microgliale et la rupture de la BHE. L'effet anti-inflammatoire est en partie lié à l'inhibition des récepteurs TLR-4 (Toll Like Receptor-4) et de la voie de signalisation intracellulaire pro-inflammatoire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B) (Kumar et Loane, 2012; Kabadi et Faden, 2014). L'avantage des statines réside dans leur fenêtre thérapeutique assez large, puisqu'une amélioration des performances neurologiques et une diminution de la mort neuronale sont observées même après une administration réalisée 24 heures après le TC dans un modèle expérimental (Lu *et al.*, 2004). De plus, les statines étant largement utilisées en clinique dans le traitement des pathologies cardiovasculaires, on sait qu'elles sont bien tolérées chez l'Homme. Ceci a encouragé l'étude de leur efficacité dans le traitement du TC. Une petite étude clinique menée avec la rosuvastatine a ainsi révélé une amélioration de l'amnésie et des troubles d'orientation chez les patients (Kumar et Loane, 2012; McConeghy *et al.*, 2012; Kabadi et Faden, 2014). Un essai clinique de phase II, visant à évaluer l'efficacité d'une administration orale de l'atorvastatine dès les premières 24 heures jusqu'à 7 jours suivant le TC, est actuellement en cours de réalisation aux Etats-Unis (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01013870>).

- **La progestérone** est une hormone stéroïdienne dont l'effet neuroprotecteur a été mis en évidence suite à l'observation d'une influence du sexe et du cycle menstruel sur les conséquences du TC chez l'animal. Ainsi, une meilleure performance cognitive est observée chez des rattes comparativement aux rats mâles (McConeghy *et al.*, 2012; Hellewell *et al.*, 2016). De plus, l'administration de progestérone chez des rats mâles améliore leurs performances cognitives (Kumar et Loane, 2012). Dans des modèles expérimentaux de TC, la progestérone diminue la production de cytokines pro-inflammatoires, réduit l'œdème cérébral, prévient la mort neuronale et les lésions axonales, et améliore les performances cognitives (Hellewell *et al.*, 2016). Après les résultats encourageants de deux études cliniques de phase II, ayant montré une réduction de la mortalité et une amélioration de la récupération fonctionnelle chez les patients traumatisés crâniens traités par la progestérone, deux études multicentriques de phase III ont été réalisées en 2010. Toutefois, l'une des études (ProTECT III) n'a pu être menée à terme en raison du nombre insuffisant de patients recrutés et les résultats de la seconde (SyNAPs) ne montrent aucune différence de score neurologique entre le groupe traité et celui ayant reçu le placebo (Hellewell *et al.*, 2016).

## **7. Raisons de l'échec en clinique des stratégies neuroprotectrices**

### **7.1. Discordance entre les modèles précliniques et cliniques**

Le développement de modèles expérimentaux de TC a permis d'accroître considérablement la compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine des lésions post-TC.

Les principaux modèles expérimentaux utilisés pour mimer le TC, ainsi que leurs avantages et limites sont résumés dans les tableaux II et III.

**Tableau II: Les différents modèles expérimentaux utilisés pour mimer, *in vivo et in vitro*, la physiopathologie du TC**

<u><b>Modèles expérimentaux <i>in vivo</i></b></u>	
(Xiong <i>et al.</i> , 2013; Lerouet <i>et al.</i> , 2014; Davidsson et Risling, 2016)	
<b>Avantage:</b> Mécanismes lésionnels proches de ceux observés chez l'Homme.	
<b>Inconvénient:</b> Ne reproduisent que certains aspects du TC.	
<b>Modèle</b>	<b>Type de force appliquée</b>
<p align="center"><u><b>Modèles à crâne ouvert</b></u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nécessitent une craniotomie.</li> <li>- Délivrance d'un impact calibré et dont les paramètres (pression, vitesse, diamètre, localisation...) peuvent être modulés en vue de déterminer la sévérité du TC (légère, moyenne ou sévère).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Impact cortical contrôlé (ICC):</b> percussion de la dure-mère intacte et exposée avec un impacteur rigide selon des paramètres de déformation bien contrôlés (localisation, vitesse, distance, durée et profondeur). Il s'agit du modèle le plus utilisé.</li> <li>- <b>Percussion de fluide</b> sous pression à la surface de la dure-mère intacte et exposée.</li> <li>- <b>Lâcher de poids:</b> chute libre et guidée d'un poids calibré sur la tête de l'animal.</li> </ul>
<p align="center"><u><b>Modèles à crâne fermé</b></u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Délivrance d'un impact direct sur le crâne ou exposition à des forces d'accélération/décélération.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Lâcher de poids</b></li> <li>- <b>Impact/accélération:</b> chute libre guidée d'un poids sur la tête de l'animal protégée contre les fractures à l'aide d'un disque en acier qui permet une distribution diffuse de la force de l'impact. L'animal est placé sans contention, afin de permettre le mouvement après l'impact.</li> </ul> <p>Autres forces:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Inertie d'accélération/décélération rotationnelle.</li> <li>- Explosion et détonation.</li> </ul>
<p align="center"><u><b>Modèles à répétition</b></u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Visent à mimer les TC répétitifs.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Lâcher de poids.</b></li> <li>- <b>Percussion de fluide.</b></li> </ul>

**Tableau II (suite): Les différents modèles expérimentaux utilisés pour mimer, *in vivo* et *in vitro*, la physiopathologie du TC**

<b><u>Modèles expérimentaux <i>in vitro</i></u></b> (Morrison <i>et al.</i> , 2011)	
<p><b><u>Avantage:</u></b> Description précise des mécanismes physiopathologiques moléculaires et cellulaires à l'origine de la mort cellulaire.</p> <p><b><u>Inconvénient:</u></b> Problème de transposition des résultats à l'Homme.</p>	
<b>Modèle</b>	<b>Type de force appliquée</b>
<b><u>Cultures cellulaires</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Transsection ou lacération:</b> les cellules sont raclées à l'aide de stylets en plastique, de lames ou de faisceaux laser.</li> <li>- <b>Compression par</b> un lâcher de poids ou un impacteur.</li> <li>- <b>Pression hydrostatique:</b> ce modèle utilise une chambre fermée dans laquelle les cellules subissent une pression hydrostatique.</li> <li>- <b>Contrainte de cisaillement:</b> à l'aide d'un disque rotatif placé au-dessus d'une monocouche de cellules (vitesse et distance contrôlées), ou d'une projection d'air ou de milieu avec une micropipette.</li> </ul>
<b><u>Culture organotypique (ou coupes de cerveaux)</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Compression</b> par un lâcher de poids.</li> </ul>

**Tableau III: Principaux avantages et limites des modèles *in vivo* de TC**

(Xiong *et al.*, 2013)

<b>Modèle</b>	<b>Lésions</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>	<b>Espèces</b>
<b><u>Impact cortical contrôlé (ICC)</u></b>	Focale et diffuse	Haute reproductibilité	Nécessité d'une craniotomie	Souris, rat, furet, porc et singe
<b><u>Percussion de fluide</u></b>	Focale et diffuse	Haute reproductibilité	Nécessité d'une craniotomie; forte mortalité	Souris, rat, lapin, chien, mouton et porc
<b><u>Lâcher de poids</u></b>	Focale et diffuse	Mécanismes lésionnels proches de ceux du TC chez l'Homme; facilité de réalisation	Manque de reproductibilité; haute mortalité	Souris et rat
<b><u>Explosion</u></b>	Diffuse	Mécanismes lésionnels proches de ceux du TC chez les militaires	Manque de standardisation	Souris, rat et porc

Malgré le succès en préclinique de nombreuses molécules neuroprotectrices, dont certains exemples ont été décrits précédemment, la transposition de ces résultats en clinique reste très limitée. Ainsi, plus de 40 essais cliniques menés avec des agents neuroprotecteurs potentiels ont échoué pendant les phases II ou III, et l'équipe médicale ne dispose actuellement d'aucune stratégie neuroprotectrice efficace pour le traitement du TC (Stein *et al.*, 2015).

Les raisons de ces échecs sont nombreuses et attribuées à la fois aux modèles expérimentaux, qui sont parfois très simplistes et ne miment que certains aspects du TC, et à la méthodologie parfois inappropriée des essais cliniques. Parmi les arguments les plus rapportés dans la littérature (McConeghy *et al.*, 2012; Kabadi et Faden, 2014; Wiendl *et al.*, 2015), on peut citer:

- le manque de pertinence et la difficulté de standardisation des modèles expérimentaux.
- la diversité et la complexité des mécanismes lésionnels du TC.
- la difficulté de choix de la fenêtre optimale pour une intervention thérapeutique en clinique.
- l'absence de prise en considération de certains paramètres pouvant influencer l'effet des molécules, tels que l'espèce, le sexe et l'âge.
- l'utilisation, dans les modèles expérimentaux, d'anesthésiques ayant des propriétés neuroprotectrices ou interférant avec les mécanismes d'action des molécules étudiées.
- l'incapacité de certaines molécules à traverser la BHE et à atteindre la concentration thérapeutique souhaitée dans le cerveau.
- le recrutement inapproprié des patients qui, le plus souvent, est basé sur des critères cliniques et non pas biologiques.
- l'absence de prise en considération de la variabilité pharmacogénétique et épigénétique.
- le manque de biomarqueurs prédictifs.
- le choix inapproprié de l'échelle du devenir neurologique (Glasgow Outcome Scale ou GOS).
- la méthodologie traditionnelle et non adaptative des essais cliniques.

Afin de pallier au manque de pertinence des modèles expérimentaux, des travaux visent à définir les critères devant être pris en considération pour améliorer ces modèles. L'objectif est d'augmenter la probabilité d'obtenir des résultats plus pertinents et plus convaincants pour encourager les études de preuve de concept chez l'Homme (Wiendl *et al.*, 2015). Ce manque de pertinence se manifeste notamment par la grande variabilité des lésions et des résultats obtenus au sein d'un même modèle expérimental de TC (Kabadi et Faden, 2014). Par ailleurs, la majorité des études expérimentales sont réalisées sur des rongeurs, dont le cerveau est différent de celui de l'Homme, notamment par sa taille et la proportion de SB. En effet, caractérisé par son petit volume et sa teneur moins importante en SB (10%

versus 50% chez l'Homme par rapport à la substance grise; Zhang et Sejnowski, 2000), le cerveau des rongeurs est moins susceptible aux LAD comparé à celui de l'homme (Kabadi et Faden, 2014). L'utilisation d'autres espèces animales, plus proches phylogénétiquement de l'Homme, présente des contraintes éthique, pratique et économique. Toutefois, il serait intéressant s'envisager de tester les molécules neuroprotectrices chez ces espèces avant de passer à l'Homme.

De nombreuses autres recommandations sont suggérées en vue de renforcer le support préclinique dans le développement des stratégies neuroprotectrices (Kabadi et Faden, 2014). Actuellement, il est donc nécessaire:

- de démontrer des effets importants et reproductibles sur plusieurs modèles expérimentaux, voire sur différentes espèces.
- d'évaluer l'efficacité de ces effets sur les déficits comportementaux.
- de réaliser des études pharmacodynamiques de dose-réponse et des études pharmacocinétiques pour le choix de la dose optimale.
- de choisir une fenêtre thérapeutique pouvant être transposée chez l'Homme, c'est-à-dire au minimum entre 6 à 8 heures après le TC.

Concernant la méthodologie des essais cliniques, un groupe de travail, IMPACT (International Mission on Prognosis and Clinical Trial Design), s'est déjà penché sur la question, afin d'émettre des recommandations en vue d'une optimisation tenant compte de l'hétérogénéité des patients (Maas *et al.*, 2010). Plus récemment, une méthodologie plus adaptative a été introduite en vue d'une meilleure flexibilité et efficacité de la recherche clinique. Ce principe permet une possible adaptation de la méthodologie et des analyses statistiques pendant la réalisation de l'essai clinique. Néanmoins, ces modifications ne doivent en aucun cas compromettre la validité et l'intégrité de l'essai clinique (Kabadi et Faden, 2014).

## **7.2. Stratégies neuroprotectrices trop sélectives**

La majorité des stratégies neuroprotectrices ayant échoué en clinique ne visait qu'un seul mécanisme lésionnel. Or, les lésions post-TC résultent le plus souvent de l'interaction entre plusieurs mécanismes cellulaires et moléculaires. Pour ces raisons, la recherche actuelle s'oriente vers le développement de stratégies pharmacologiques permettant de cibler plusieurs mécanismes physiopathologiques en même temps. Il s'agit notamment de l'utilisation de molécules à effets pléiotropes, telles que la progestérone ou l'érythropoïétine, pouvant agir simultanément sur différents mécanismes.

***En conclusion, le TC continue de représenter un lourd fardeau, à la fois sociétal et personnel, en raison de l'absence de pharmacothérapies efficaces pour la prise en charge des patients. Face à une pathologie très complexe, des modèles expérimentaux parfois trop simplistes et une méthodologie inadaptée des essais cliniques, aucune stratégie pharmacologique neuroprotectrice n'est actuellement disponible en pratique hospitalière. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques est donc indispensable pour la conception de meilleures stratégies neuroprotectrices et la détermination du moment optimal en vue d'une intervention thérapeutique adaptée.***

## **CHAPITRE II: LA NEURO-INFLAMMATION POST-TRAUMATIQUE**

### **1. Généralités**

Parmi la cascade physiopathologique déclenchée à la suite d'un TC, la neuro-inflammation se révèle comme un acteur crucial contribuant aux lésions secondaires. Cette neuro-inflammation apparaît précocement après l'impact et peut persister jusqu'à plusieurs années chez les patients traumatisés crâniens (Johnson *et al.*, 2013a).

La neuro-inflammation met en jeu un panel d'acteurs cellulaires et moléculaires. Après avoir été longtemps considérée comme étant exclusivement orchestrée par les cellules immunitaires infiltrant le parenchyme cérébral, il est maintenant clairement établi que les cellules gliales résidentes jouent un rôle particulièrement important dans les réponses inflammatoires précoce et tardive (Kou et Vandevord, 2014; Burda *et al.*, 2016; Karve *et al.*, 2016; Donat *et al.*, 2017). Ainsi, la neuro-inflammation se caractérise par une cascade d'évènements consécutifs à l'activation des cellules gliales et à l'infiltration des cellules sanguines, la libération massive de cytokines pro- et anti-inflammatoires et l'expression de molécules d'adhésion (Helmy *et al.*, 2011a; Nizamutdinov et Shapiro, 2017). L'ampleur du phénomène dépend non seulement de la sévérité de l'impact mécanique, mais également de facteurs propres aux patients (âge, sexe, variabilité génétique...) (Simon *et al.*, 2017).

La neuro-inflammation est un phénomène complexe agissant comme une véritable « épée à double tranchant » (Morganti-Kossmann *et al.*, 2002). En effet, la réponse inflammatoire est à la fois bénéfique, indispensable à la clairance des débris et à la réparation tissulaire, et délétère en amplifiant les dégâts et pertes tissulaires. L'échec en clinique des stratégies anti-inflammatoires visant à abolir totalement la réponse inflammatoire témoigne de la complexité de ce processus et la nécessité de la moduler plutôt que de l'inhiber (Russo et McGavern, 2016). Le défi actuel de la recherche consiste donc à trouver des stratégies thérapeutiques permettant de limiter les effets délétères tout en conservant les effets bénéfiques de cette réponse inflammatoire.

### **2. Initiation de la neuro-inflammation**

La collision entre le cerveau et la boîte crânienne, survenant au moment de l'impact, entraîne une destruction vasculaire, neuronale, axonale et gliale. Ces lésions primaires s'accompagnent d'une libération massive de motifs moléculaires associés aux dégâts ou DAMP (Damage Associated Molecular Pattern), d'un phénomène d'excitotoxicité, d'un dysfonctionnement mitochondrial, ainsi que de l'infiltration dans le parenchyme cérébral de constituants vasculaires inflammatoires, tels que les facteurs du complément et l'hémoglobine libre. Tous ces phénomènes sont capables d'initier une réponse inflammatoire

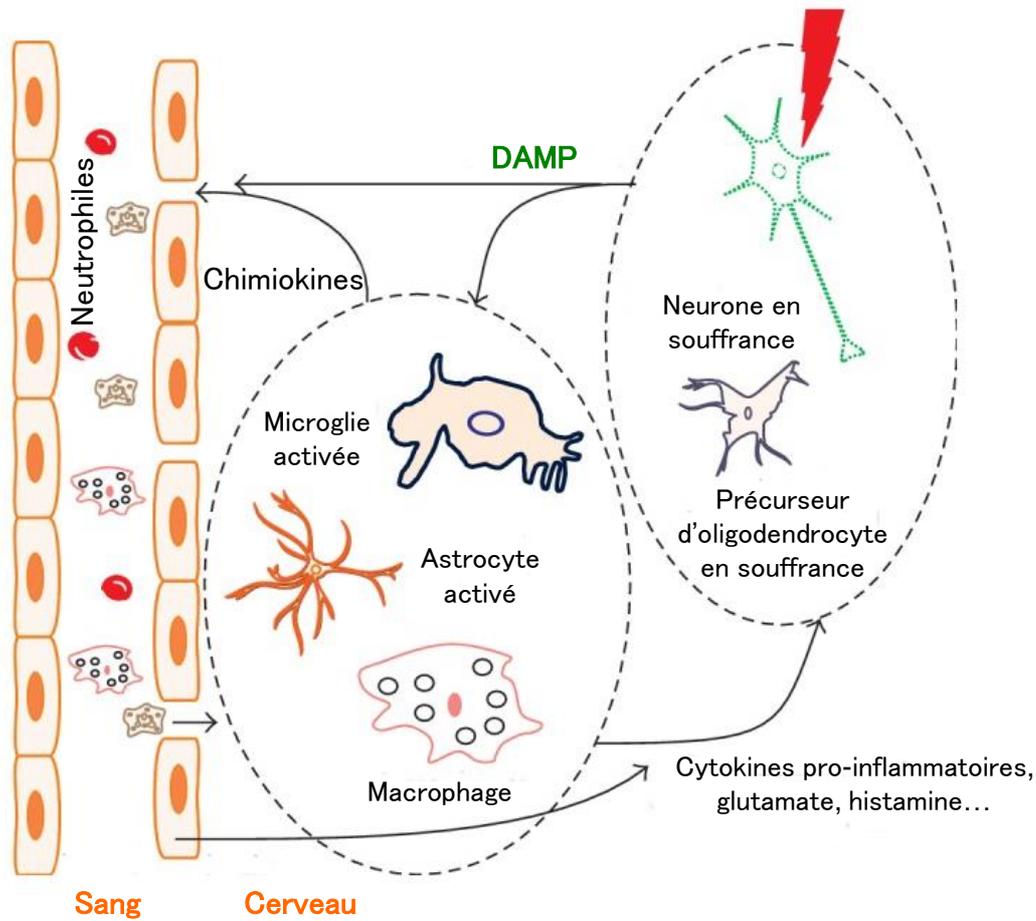
dite « stérile », c'est-à-dire non provoquée par des agents pathogènes (Nizamutdinov et Shapiro, 2017; Simon *et al.*, 2017).

## 2.1. Libération de motifs moléculaires associés aux dégâts

L'atteinte tissulaire entraîne une libération passive par les cellules nécrotiques de molécules endogènes, les DAMP (Figure 4), appelées également alarmines, telles que HMGB1 (High Mobility Group Box 1), les protéines S-100, les protéines HSP, l'ATP, l'acide urique et l'ADN. Ces molécules, pouvant par ailleurs être sécrétées de manière active par les cellules immunitaires, sont capables d'initier une réponse inflammatoire en stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires *via* l'interaction avec des récepteurs membranaires, tels que les récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor) (Manson *et al.*, 2012; Banjara et Ghosh, 2017).

Le rôle des DAMP dans la neuro-inflammation est bien connu (Banjara et Ghosh, 2017). HMGB1, une protéine ubiquitaire nucléaire de liaison à l'ADN, a été particulièrement étudiée. Il a ainsi été montré qu'HMGB1 est sécrétée par les neurones nécrotiques et qu'elle contribue à la formation de l'œdème cérébral dans un modèle expérimental de TC (Laird *et al.*, 2014). En clinique, une corrélation a été mise en évidence entre l'augmentation précoce des taux circulants d'HMGB1 et la sévérité des lésions chez les patients traumatisés crâniens (Cohen *et al.*, 2009).

Le rôle des autres DAMP, telles que l'ATP et les protéines S-100, dans l'initiation et la progression des lésions post-traumatiques est détaillé dans des revues de la littérature (Manson *et al.*, 2012; Braun *et al.*, 2017).



**Figure 4: Initiation de la neuro-inflammation par les DAMP**

(adapté de Banjara et Ghosh, 2017)

Abréviation: DAMP, damage associated molecular pattern

## 2.2. Excitotoxicité

Des liens entre les phénomènes d'excitotoxicité et de neuro-inflammation dans le SNC ont été mis en évidence (Viviani *et al.*, 2014). Ainsi, des études ont montré que l'injection intracérébrale de NMDA stimule la production d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis alpha) (Hagan *et al.*, 1996; Pearson *et al.*, 1999; Viviani *et al.*, 2014). A l'inverse, l'inhibition pharmacologique des récepteurs NMDA par le MK-801 s'accompagne d'une diminution de l'expression des deux cytokines et d'une neuroprotection, dans des modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale et de TC (Jander *et al.*, 2000; Kochanek *et al.*, 2015). Par ailleurs, on sait que l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  contribuent à leur tour à l'amplification des phénomènes d'excitotoxicité (Viviani *et al.*, 2014), créant ainsi un cercle vicieux.

Un rôle particulièrement important est attribué aux astrocytes dans cette interaction cytokine-glutamate. En effet, les astrocytes expriment un grand nombre de

récepteurs/transporteurs du glutamate, GLAST/EAAT1 (Glutamate Aspartate Transporter/Excitatory Amino Acid Transporter 1) et GLT1/EAAT2 (Glutamate Transporter 1/Excitatory Amino Acid Transporter 2), et participent activement à la régulation de l'activité synaptique en éliminant l'excès de glutamate. En cas de neuro-inflammation, l'expression de ces récepteurs est fortement diminuée (Viviani *et al.*, 2014). Par conséquent, les capacités astrocytaires de recapture du glutamate sont fortement altérées, ce qui amplifie l'excitotoxicité et les dommages neuronaux.

### 2.3. Dysfonctionnement mitochondrial

Le dysfonctionnement mitochondrial s'accompagne d'une libération de DAMP spécifiques, tels que l'ADN mitochondrial et des peptides possédant un reste formyl N-terminal, capables d'activer les cellules de l'inflammation *via* une interaction directe avec des PRR. L'ADN mitochondrial a notamment été détecté dans le LCR de jeunes enfants ayant subi un TC (Walko *et al.*, 2014).

Par ailleurs, le dysfonctionnement mitochondrial semble jouer un rôle important dans l'activation de l'inflammasome *via* la cardiolipine (Lyer *et al.*, 2013). Dans les conditions physiologiques, la cardiolipine est exprimée sur la membrane interne des mitochondries. En cas de dysfonctionnement, elle est externalisée et interagit directement avec le récepteur NLRP3 (NOD ou Nucleotide-binding Oligomerization Domain-Like Receptor P3) de l'inflammasome. Il en résulte une activation de la caspase 1, puis une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  et IL-8).

### 2.4. Passage d'éléments vasculaires dans le parenchyme cérébral

Les lésions vasculaires entraînent un passage vers le parenchyme cérébral d'éléments figurés du sang et de composés sanguins potentiellement pro-inflammatoires, tels que les facteurs du complément ou l'hémoglobine libre (Simon *et al.*, 2017).

La présence de facteurs de la voie du complément au niveau cérébral est détectée dans les heures qui suivent le TC (Bellander *et al.*, 2001; Walko *et al.*, 2014). Dans un modèle expérimental de TC chez la souris, une réduction de l'activation microgliale et de la perte neuronale a été observée après l'administration d'un inhibiteur de la voie du complément (Rich *et al.*, 2016), démontrant le rôle délétère de cette voie.

L'hémoglobine libre forme un complexe avec l'haptoglobine, qui est ensuite phagocyté par les microglies/macrophages. Toutefois, lorsque les capacités phagocytaires de ces cellules sont dépassées, l'accumulation de l'hémoglobine libre dans le parenchyme cérébral génère un stress oxydant à l'origine d'une neurotoxicité (Simon *et al.*, 2017).

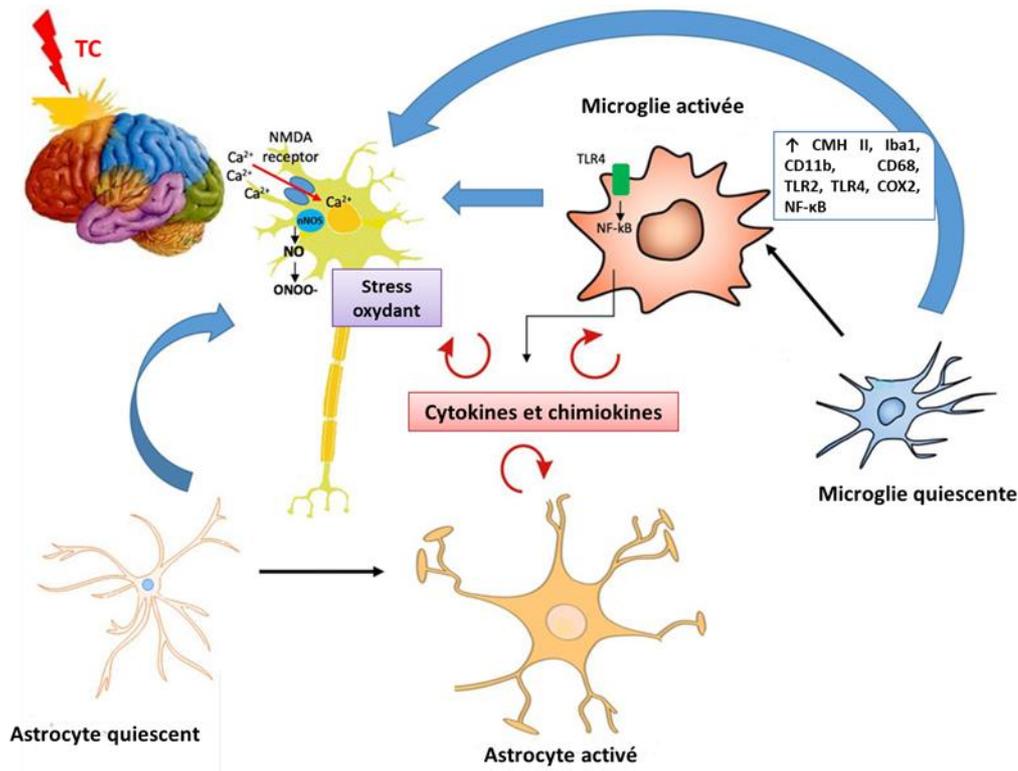
### **3. Acteurs cellulaires de la neuro-inflammation**

La neuro-inflammation se caractérise par une accumulation dans les sites lésionnels et péri-lésionnels de cellules inflammatoires locales, constituées par les cellules gliales, et de leucocytes sanguins infiltrant le cerveau.

#### **3.1. Les cellules gliales**

Les microglies et les astrocytes sont les premiers acteurs cellulaires impliqués dans l'initiation de la neuro-inflammation après une lésion cérébrale (Figure 5). Ces cellules expriment une grande variété de récepteurs PRR, dont la stimulation par les débris cellulaires ou les DAMP est à l'origine du déclenchement de la réponse inflammatoire.

Une fois activées, ces cellules sécrètent des cytokines, ainsi que des facteurs trophiques. Elles phagocytent les débris cellulaires et modulent la réponse des autres cellules immunitaires. Par ailleurs, ces cellules subissent des changements morphologiques et forment une barrière physique qui sépare la zone de lésion des autres structures cérébrales saines; on parle de cicatrice gliale (Karve *et al.*, 2016).



**Figure 5: Activation des cellules gliales après un traumatisme crânien (TC)**

(adapté de Chiu et al., 2016)

*Abréviations:  $Ca^{2+}$ , calcium; CD, cluster of differentiation; CMH II, complexe majeur d'histocompatibilité de type II; COX-2, cyclo-oxygénase de type 2; Iba1, ionized calcium binding adapter molecule 1; NF- $\kappa$ B, nuclear factor kappa B; NMDA, N-méthyl D-aspartate; NO, monoxyde d'azote; nNOS, NO-synthase neuronale; ONOO-, anion peroxydinitrite; TLR, toll-like receptor*

### 3.1.1. La microglie

La microglie est le macrophage résident du SNC avec des capacités de phagocytose et de présentation d'antigène.

Après un TC, la microglie a initialement comme fonction l'élimination des débris moléculaires et cellulaires, afin de rétablir l'homéostasie dans le SNC. La microglie activée sécrète par ailleurs des facteurs trophiques, nécessaires aux processus de régénération et de réparation tissulaire. Néanmoins, une microglie activée produit également des substances potentiellement délétères et cytotoxiques, telles que des cytokines pro-inflammatoires, du glutamate, des ERO et des ERN. La microglie pourrait ainsi aggraver les dommages tissulaires et son activation prolongée a d'ailleurs été associée à une neurodégénérescence (Faden et Loane, 2015).

Ce double rôle de la microglie est lié à l'hétérogénéité de son activation et celui-ci sera discuté plus en détails dans le paragraphe « 5. Rôle de la microglie dans la neuro-inflammation post-traumatique » de ce chapitre.

Dans les modèles expérimentaux et chez l'Homme, l'activation microgliale apparaît précocement et peut persister longtemps après un TC (Jonhson *et al.*, 2013a; Smith *et al.*, 2013; Loane *et al.*, 2014b; Faden *et al.*, 2016; Donat *et al.*, 2017). Sa mise en évidence est essentiellement basée sur la visualisation des changements morphologiques subis au cours de l'activation microgliale (passage d'une morphologie ramifiée à une morphologie hypertrophique), l'augmentation de l'expression de certaines protéines membranaires, telles que Iba1 (Ionized calcium Binding Adapter molecule 1), CMHII (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II), CD68 (Cluster of Differentiation 68; présentation d'antigènes) et TSPO (Translocator Protein), ainsi que sur les capacités prolifératives de la microglie activée. Plus récemment, le développement de techniques d'imageries, telles que la tomographie par émission de positons (TEP), a rendu possible la visualisation *in vivo* de l'activation microgliale chez l'Homme et l'animal, grâce à des radiotraceurs dirigés contre TSPO (Donat *et al.*, 2017).

Chez l'Homme, une activation microgliale a ainsi été décrite dès 72 heures après le TC (Engel *et al.*, 2000). L'étude *post-mortem* réalisée par Jonhson et collaborateurs (2013a) décrit la présence de microglies immunoréactives, mises en évidence grâce à un examen morphologique et des immunomarquages CR3/43 (Complement Receptor 3/43) et CD68, 18 ans après un TC. De plus, cette activation microgliale chronique est associée à une dégénérescence de la SB. L'activation chronique de la microglie est confirmée par imagerie (TEP) chez les patients traumatisés crâniens, grâce à la mise en évidence d'une augmentation de l'expression de TSPO de 11 mois jusqu'à 17 ans après le TC (Ramlackhansingh *et al.*, 2011). Une autre étude clinique, menée chez des joueurs de football américain toujours en activité ou ayant récemment arrêté, révèle une augmentation de l'expression du TSPO (visualisé par la TEP) par rapport au groupe témoin (Coughlin *et al.*, 2017).

Expérimentalement, il a été montré de manière similaire une activation microgliale précoce dès 4 heures chez le rat (Csuka *et al.*, 2000) et tardive jusqu'à un an après l'impact chez la souris (Loane *et al.*, 2014b). Par ailleurs, ces derniers ont montré que l'activation microgliale est associée à une aggravation des lésions avec une perte neuronale et une démyélinisation. La visualisation *in vivo* par imagerie de TSPO chez le rat montre une augmentation de son expression dès 6 heures, qui persiste jusqu'à 28 jours dans un modèle d'ICC (Donat *et al.*, 2016).

Bien que la microglie activée soit associée aux dommages post-TC, sa déplétion dans les modèles expérimentaux de TC ne semble pas toujours induire d'effets protecteurs.

Une étude a ainsi montré que la déplétion de la microglie ne réduit pas les lésions axonales pendant les phases aiguë (J7) et subaiguë (J21) dans un modèle de TC chez la souris (Bennet et Brody, 2014). Par contre, une autre étude montre que les souris knock-out (KO) n'exprimant pas le récepteur CX3CR1 (CX3C chemokine Receptor 1; indispensable à l'activation de la microglie après interaction avec son ligand, la chimiokine CX3CL1) présentent moins de perte neuronale et de déficits moteurs comparées aux souris sauvages pendant la phase aiguë (24 heures jusqu'à 15 jours) après ICC (Febinger *et al.*, 2015). Néanmoins, à plus long terme (30 jours), les souris KO présentent davantage de déficits cognitifs et de perte neuronale.

Bien que sa déplétion puisse être bénéfique pendant les phases aiguë et subaiguë, la microglie semble aussi indispensable à la régénération tissulaire et la récupération fonctionnelle à plus long terme. Toutefois, des études suggèrent également un lien entre l'activation microgliale chronique et la neurodégénérescence. L'ensemble de ces données montre ainsi la complexité du rôle de la microglie dans la neuro-inflammation post-TC.

### 3.1.2. Les astrocytes

Les astrocytes sont caractérisés par une grande hétérogénéité morphologique et fonctionnelle (Pekny et Pekna, 2014). Ce sont des cellules essentielles au maintien de l'homéostasie du SNC et au bon fonctionnement neuronal. Leur intérêt résulte notamment de leur localisation anatomique stratégique, en juxtaposition à la fois des neurones et des vaisseaux. Les astrocytes régulent les taux ionique, hydrique et de glutamate extracellulaire, et veillent à la bonne plasticité synaptique. Ils participent également au maintien de l'intégrité de la BHE par la formation de pieds astrocytaires autour des cellules endothéliales (Karve *et al.*, 2016; Burda *et al.*, 2016).

L'activation astrocytaire, consécutive à une atteinte cérébrale, est désignée par le terme d'« astroglie ». Les astrocytes activés sont caractérisés par une morphologie hypertrophique et une augmentation de l'expression des protéines des filaments intermédiaires, tels que le GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) et la vimentine (Pekny et Pekna, 2014). Une fois activés, les astrocytes prolifèrent, migrent vers le site lésionnel, forment la cicatrice gliale et sécrètent des facteurs pro-inflammatoires et trophiques (Pekny et Pekna, 2014; Karve *et al.*, 2016). La cicatrice gliale empêche la diffusion des molécules pro-inflammatoires et cytotoxiques vers les tissus sains à proximité et permet ainsi de limiter l'extension du processus inflammatoire en dehors de la zone de lésion (Burda *et al.*, 2016). Néanmoins, la cicatrice gliale peut altérer la régénération axonale (Karve *et al.*, 2016).

Dans des modèles expérimentaux de TC, l'astrogliose apparaît dans les heures qui suivent l'impact et peut persister jusqu'à 2 semaines après (Csuka *et al.*, 2000; Morganti-Kossmann *et al.*, 2007; Susarla *et al.*, 2014).

Tout comme l'activation microgliale, l'astrogliose s'est révélée complexe puisqu'à la fois bénéfique et délétère après un TC. D'une part, l'inhibition de la prolifération des astrocytes diminue la mort neuronale, le volume de la lésion, la cicatrice gliale et l'activation microgliale, ainsi que les séquelles motrices et cognitives dans un modèle de TC par percussion de fluide (Di Giovanni *et al.*, 2005; Karve *et al.*, 2016). D'autre part, il a également été montré que la déplétion sélective des astrocytes aggrave l'inflammation et les dommages neuronaux après un impact cortical modéré (Myer *et al.*, 2006).

### **3.2. Les cellules sanguines**

A la suite d'une lésion cérébrale, les leucocytes sont recrutés grâce à des molécules chimiotactiques, appartenant essentiellement à deux familles de chimiokines: CXCL (C-X-C motif Ligand) et CCL (C-C motif Ligand). Les leucocytes roulent le long de l'endothélium, adhèrent à ce dernier grâce à des molécules d'adhésion, puis passent au travers de la BHE *via* les jonctions intercellulaires (Rhodes, 2011). Une altération de la BHE, telle que celle observée à la suite d'un TC, facilite le passage des cellules sanguines dans le parenchyme cérébral. Bien que la déplétion des leucocytes ou l'inhibition de leur capacité d'adhésion à l'endothélium se soit avérée bénéfique dans des modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale, l'effet est moins clair dans le TC.

Parmi les cellules sanguines infiltrant le parenchyme cérébral, les polynucléaires neutrophiles (PMN) et les monocytes semblent jouer un rôle particulièrement important dans la réponse inflammatoire.

#### **3.2.1. Les polynucléaires neutrophiles**

Les PMN constituent une large population de leucocytes circulants recrutés en première ligne à la suite d'un dommage tissulaire.

Un recrutement précoce des PMN, *via* la BHE et les plexus choroïdes, est observé dans des modèles expérimentaux de TC (Corps *et al.*, 2015). Les PMN sont présents dans le réseau vasculaire péri-lésionnel quelques heures après l'impact, puis infiltrent rapidement le parenchyme cérébral pour atteindre un pic au bout de 2 jours (Rhodes, 2011). Cette rapide infiltration du parenchyme cérébral est également observée chez l'Homme et persiste jusqu'à 4 semaines après le TC (Hausmann *et al.*, 1999).

Les PMN contribuent aux lésions secondaires par divers mécanismes, incluant la sécrétion de médiateurs cytotoxiques (myéloperoxydase, métalloprotéinases, élastases...), la production de radicaux libres et l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Nizamutdinov et Shapiro, 2017). Après ICC, la déplétion pharmacologique des PMN s'accompagne d'une diminution de l'œdème cérébral et de la perte tissulaire (Kenne *et al.*, 2012). Dans un modèle expérimental d'ischémie cérébrale, il a également été montré que le blocage des capacités d'adhésion et de migration des PMN réduit les dommages neuronaux (Clark *et al.*, 1991).

### 3.2.2. Les monocytes

Suite à un TC, les monocytes sont recrutés dans les heures suivant l'impact pour atteindre un pic au niveau du site de la lésion au bout de 3 à 6 jours (Rhodes, 2011). Parmi les médiateurs chimiotactiques impliqués dans le recrutement des monocytes, CCL2 (C-C Chemokine Ligand 2) semble jouer un rôle important après le TC. Une élévation de son taux a été observée dans le LCR de patients ayant subi un TC sévère (Semple *et al.*, 2010). De plus, la délétion du gène codant pour cette protéine chez la souris (CCL2<sup>-/-</sup>) entraîne une récupération fonctionnelle à long terme après le TC (au bout de 2 à 4 semaines).

Après invasion tissulaire, les monocytes circulants se différencient en macrophages ou en cellules dendritiques. Le rôle spécifique de ces macrophages d'origine périphérique dans les pathologies du SNC reste encore mal élucidé. En effet, pendant longtemps, il était impossible de distinguer les macrophages infiltrants de la population locale microgliale. Les deux populations cellulaires, issues de la lignée monocyttaire, expriment quasiment les mêmes marqueurs d'activation. Actuellement, il est possible de distinguer ces deux populations grâce à un double marquage CD45 et CD11b. Les macrophages périphériques sont CD45<sup>High</sup>/CD11b<sup>Low</sup>, tandis que la microglie est CD45<sup>Low</sup>/CD11b<sup>High</sup> (Karve *et al.*, 2016). Des souris génétiquement modifiées ont été obtenues en croisant des souris CCR2-RFP (C-C Chemokine Receptor 2 - Red Fluorescent Protein) knock-in (CCR2-RFP+/+) avec des souris CX3CR1-GFP (Green Fluorescent Protein) knock-in (CX3CR1-GFP+/+). Les macrophages périphériques sont ainsi marqués en rouge et les microglies, exprimant fortement le récepteur CX3CR1, apparaissent en vert. Contrairement à l'activation microgliale pouvant persister à long terme, il a été montré que le nombre de macrophages CD45<sup>High</sup>/CD11b<sup>Low</sup> commence à diminuer au bout de quelques jours après le TC chez la souris (Jin *et al.*, 2012).

La divergence des données expérimentales renforce l'idée d'un double rôle, à la fois bénéfique et délétère, de l'ensemble des acteurs cellulaires de la neuro-inflammation. Les cellules gliales, constituant la première ligne de défense innée dans le SNC, semblent

orchestrer cette neuro-inflammation post-traumatique. Plus particulièrement, la microglie, caractérisée par l'hétérogénéité et la chronicité de son activation, joue un rôle très complexe et semble contribuer à la neurodégénérescence post-traumatique.

#### 4. Médiateurs moléculaires de la neuro-inflammation

La neuro-inflammation est caractérisée par l'augmentation de l'expression ou de la sécrétion d'un panel de molécules, incluant des cytokines, des molécules d'adhésion, des enzymes (protéases, NOS et COX) et des médiateurs lipidiques (prostaglandines). Ces molécules véhiculent des signaux intercellulaires, attirent par chimiotactisme et stimulent les cellules immunitaires (Mayer *et al.*, 2013). Tous ces effets sont indispensables à la mise en place, la propagation, mais également au contrôle de la neuro-inflammation.

Les cytokines sont des médiateurs protéiques pro- et/ou anti-inflammatoires pouvant être sécrétés par l'ensemble des acteurs cellulaires de l'inflammation, ainsi que par les neurones. Toutefois, la microglie reste la principale source au niveau du SNC (Kumar et Loane, 2012). Outre leur rôle dans l'inflammation, les cytokines sont indispensables au développement et au fonctionnement du SNC (Morganti-Kossmann *et al.*, 2007).

A la suite d'une lésion cérébrale, les cytokines activent et recrutent les cellules immunitaires pendant la phase aiguë de la neuro-inflammation. A plus long terme, elles participent à la régénération et la réparation tissulaire. Détectées dans le parenchyme cérébral, le sang et le LCR, elles sont des biomarqueurs pratiques pour l'étude de la neuro-inflammation (Woodcock et Morganti-Kossmann, 2013). Une étude clinique a ainsi caractérisé 42 cytokines pro- et anti-inflammatoires dans le cerveau (par microdialyse) et le LCR de patients durant les 5 premiers jours suivant un TC, dont 16 ont augmenté (Helmy *et al.*, 2011b).

##### 4.1. Les cytokines pro-inflammatoires

Parmi les cytokines pro-inflammatoires, les interleukines IL-1 $\beta$ , 6 et 18, ainsi que le TNF $\alpha$  jouent un rôle particulièrement important dans la physiopathologie du TC.

La famille des **IL-1**, représentée essentiellement par les agonistes IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , ainsi que par l'antagoniste IL-1Ra (IL-1 Receptor Antagonist), est sans doute celle dont le rôle a été le plus décrit dans le TC (Woodcock et Morganti-Kossmann, 2013). Ces cytokines agissent sur un récepteur spécifique, IL-1R, exprimé essentiellement sur les microglies, les astrocytes et les neurones (Morganti-Kossmann *et al.*, 2007; Kumar et Loane, 2012). Une augmentation précoce du taux d'IL-1 $\beta$ , dans le LCR et le parenchyme cérébral, est décrite chez l'Homme de manière corrélée à la sévérité clinique, ainsi que dans de

nombreux modèles expérimentaux de TC (Morganti-Kossmann *et al.*, 2007; Ziebell et Morganti-Kossmann, 2010; Kumar et Loane, 2012). L'IL-1 $\beta$  participe aux dommages post-TC par son effet propre pro-inflammatoire, mais surtout par stimulation de la production d'autres cytokines, telles que le TNF $\alpha$ , ou d'enzymes, telles que la COX2 ou la PLA2 (Morganti-Kossmann *et al.*, 2007; Kumar et Loane, 2012). L'inhibition d'IL-1 $\beta$ , par l'administration d'anticorps (Ac) anti-IL-1 $\beta$  ou d'antagonistes du récepteur IL-1R, s'est révélée neuroprotectrice dans des modèles expérimentaux de TC. Bien que ses effets délétères prédominent, l'IL-1 $\beta$  induit également la sécrétion de NGF (Nerve Growth Factor), indispensable à la régénération neuronale, par les astrocytes (Morganti-Kossmann *et al.*, 2007).

Ce double rôle est également décrit avec l'**IL-6** pour laquelle des résultats contradictoires ont été obtenus en clinique concernant la corrélation de son taux avec l'état neurologique des patients traumatisés crâniens (Morganti-Kossmann *et al.*, 2007). En effet, cette cytokine, d'une part, favorise le recrutement des leucocytes et les dommages neuronaux qui en découlent, et d'autre part, exerce des propriétés anti-inflammatoires qui résultent de plusieurs mécanismes, incluant la stimulation de la production de l'IL-1Ra et la diminution de la synthèse du TNF $\alpha$ , de l'excitotoxicité et du stress oxydant. L'IL-6 favorise, par ailleurs, la survie et la différenciation neuronale, notamment en stimulant la production du NGF (Morganti-Kossmann *et al.*, 2002). Expérimentalement, l'IL-6 est détectée dès la première heure après le TC et atteint un pic entre 2 à 8 heures post-TC.

Concernant l'**IL-18**, une augmentation de son taux cérébral est décrite entre 7 et 10 jours suivant un TC chez l'Homme et la souris (Yatsiv *et al.*, 2002). De plus, l'administration de son inhibiteur, IL-18 Binding Protein, permet une récupération neurologique dans un modèle expérimental de TC.

Le rôle du **TNF $\alpha$**  dans la neuro-inflammation post-TC semble également complexe. Immédiatement après l'impact, cette cytokine agit comme un puissant médiateur pro-inflammatoire accentuant les déficits neurologiques. Le TNF $\alpha$  contribue à l'activation microgliale, au recrutement des leucocytes sanguins et à la rupture de la BHE, et inhibe la régénération neuronale (Morganti-Kossmann *et al.*, 2007). A l'inverse, à plus long terme, il semble être nécessaire à la régénération neuronale (Morganti-Kossmann *et al.*, 2002; Kumar et Loane, 2012). Tout comme l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  est rapidement détecté dans le sérum et LCR de patients traumatisés crâniens. De même, dans des modèles expérimentaux, il augmente, dans le parenchyme cérébral et le LCR, dès la première heure suivant le TC chez des rongeurs, puis diminue dans les 24 heures (Kumar et Loane, 2012). Les stratégies

visant à s'opposer à l'action du TNF $\alpha$  entraînent une réduction des déficits neurologiques, de la rupture de la BHE et de l'œdème cérébral. Toutefois, alors que la délétion du gène codant pour le TNF $\alpha$  chez la souris est bénéfique pendant la phase aiguë après le TC, elle devient délétère à plus long terme (Morganti-Kossmann *et al.*, 2002; Kumar et Loane, 2012).

#### 4.2. Les cytokines anti-inflammatoires

L'**IL-10** et le **TGF $\beta$ 1** (Transforming Growth Factor beta 1), deux cytokines anti-inflammatoires, augmentent précocement après un TC chez l'Homme et l'animal (Morganti-Kossmann *et al.*, 2007; Kumar et Loane, 2012). Leur effet bénéfique est largement démontré dans des modèles expérimentaux de TC. A titre d'exemple, l'administration intraveineuse d'IL-10 chez le rat diminue significativement les taux de TNF $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  dans le cortex et l'hippocampe, et permet une récupération fonctionnelle (Kumar et Loane, 2012). Par ailleurs, le TGF $\beta$ 1 diminue la taille de la lésion et améliore la récupération fonctionnelle dans des modèles expérimentaux (Kumar et Loane, 2012).

L'**IL-1Ra** en s'opposant aux effets de IL-1 $\beta$  exerce également un effet anti-inflammatoire. Ainsi, son administration intracérébrale réduit le volume de la lésion et les dommages neuronaux post-TC chez la souris (Helmy *et al.*, 2011a; Kumar et Loane, 2012).

#### 4.3. Les chimiokines et les molécules d'adhésion

Les **chimiokines** sont des cytokines capables de réguler l'activation et la migration des leucocytes (Ziebell et Morganti-Kossmann, 2010). On en distingue deux grandes familles: les chimiokines CXCL, qui exercent des propriétés chimiotactiques vis-à-vis des PMN et des lymphocytes, et les chimiokines CCL, qui recrutent les monocytes, les macrophages et les lymphocytes T (Ziebell et Morganti-Kossmann, 2010; Nizamutdinov et Shapiro, 2017). L'augmentation des chimiokines, leur rôle dans le recrutement des leucocytes à travers la BHE, ainsi que leur contribution aux dommages cérébraux sont bien décrits après un TC (Morganti-Kossmann *et al.*, 2007). La déplétion du récepteur CXCR2 des chimiokines CXCL2 (ou MIP-2 = Macrophage Inflammatory Protein-2) et CXCL1 s'accompagne d'une diminution de l'infiltration des neutrophiles, de la mort cellulaire et du volume de la lésion (Rhodes, 2011). De plus, des souris KO CCL2<sup>-/-</sup> (ou MCP-1 = Monocyte Chemoattractant Protein-1) présentent moins de déficits neurologiques que les souris sauvages après un TC.

Au cours de la neuro-inflammation, les leucocytes et les cellules endothéliales vasculaires expriment des **molécules d'adhésion** qui assurent la migration et le passage des leucocytes à travers la BHE. Ainsi, une augmentation d'ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) est associée à une aggravation du volume de la lésion et des atteintes de la

BHE chez l'Homme (Morganti-Kossmann *et al.*, 2002). Toutefois, dans les modèles expérimentaux de TC, l'expression d'ICAM-1 atteint un pic au bout de 4 jours, bien après le recrutement des neutrophiles (Morganti-Kossmann *et al.*, 2002). De plus, la délétion génique de cette intégrine n'induit pas de diminution de l'infiltration leucocytaire, du volume de la lésion, ni des déficits neurologiques après ICC (Rhodes, 2011).

Ainsi, souvent délétères pendant la phase aiguë du TC, les cytokines semblent également nécessaires à la régénération tissulaire et la récupération fonctionnelle à plus long terme. Par conséquent, bien que classiquement et schématiquement répertoriées pro- ou anti-inflammatoires, les cytokines jouent un rôle beaucoup plus complexe dans la neuro-inflammation post-TC.

## **5. Rôle de la microglie dans la neuro-inflammation post-traumatique**

### **5.1. Origine et fonction de la microglie dans le SNC**

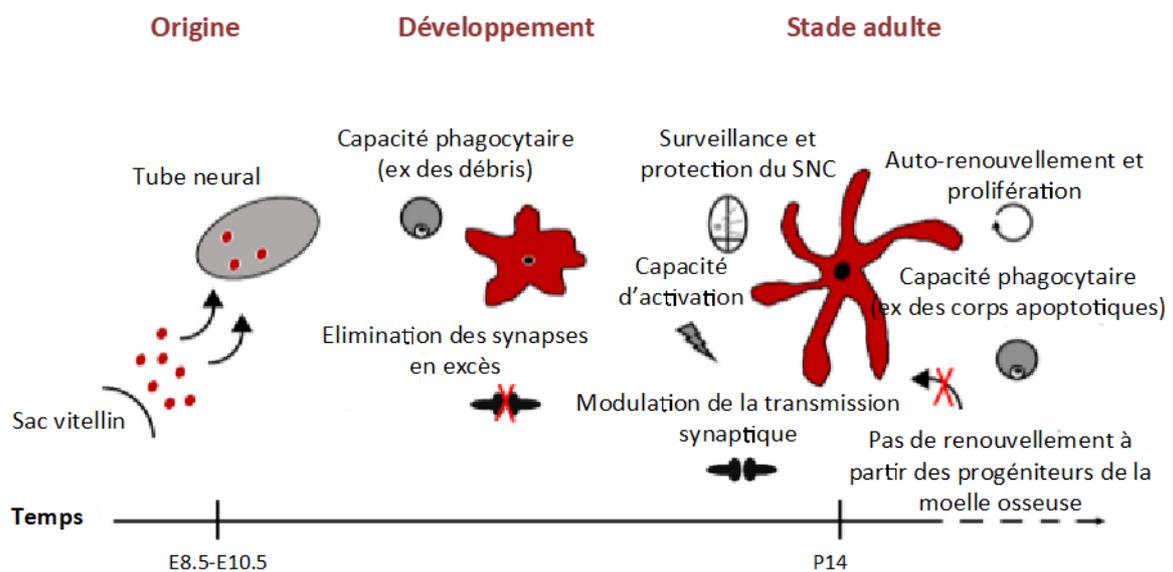
La microglie est le phagocyte mononucléé le plus abondant du SNC et elle représente environ 10% de la population cellulaire totale du SNC chez l'adulte (Colonna et Butovsky, 2017). Longtemps assimilées aux macrophages dérivant des monocytes sanguins, les microglies sont maintenant reconnues comme une population de phagocytes à part entière, à la fois par leur origine et leur signature moléculaire (Loane et Kumar, 2016).

L'origine embryonnaire de la microglie remonte aux progéniteurs érythromyéloïdes qui migrent et séjournent dans le tube neural où ils prolifèrent et se différencient en microglies matures (Loane et Kumar, 2016; Colonna et Butovsky, 2017). La microglie prolifère et assure son propre renouvellement dans le SNC, indépendamment des précurseurs myéloïdes (Loane et Kumar, 2016). La prolifération et la survie de la microglie dépendent de l'activation du récepteur CSF1R (Colony Stimulating Factor 1 Receptor) par ses deux principaux ligands, CSF1 et IL-34 (Loane et Kumar, 2016; Colonna et Butovsky, 2017). L'IL-34 est sécrétée par les neurones alors que le CSF1 est sécrété par les neurones et les cellules gliales, dont la microglie (Colonna et Butovsky, 2017). L'inhibition pharmacologique ou la délétion génétique du récepteur CSF1R entraîne une réduction importante du nombre de microglies dans le SNC. De même, la suppression de l'un ou des deux facteurs de croissance, CSF1 et IL-34, s'accompagne d'une diminution partielle du nombre de microglies.

A l'état physiologique, les techniques d'imagerie *in vivo* montrent une microglie ramifiée très dynamique veillant constamment à l'homéostasie de son environnement (Loane et Kumar, 2016; Colonna et Butovsky, 2017). Ses ramifications surveillent l'ensemble du parenchyme cérébral, afin d'éliminer par phagocytose les débris tissulaires, l'excès de

métabolites ou tout autre composant susceptible de perturber l'homéostasie du SNC. Par ailleurs, la microglie est indispensable au développement et au bon fonctionnement neuronal (Figure 6). Elle participe non seulement au contrôle de la mort cellulaire et à l'élimination des synapses défectueuses, mais contribue également à la neurogenèse, la transmission et la plasticité synaptique (Loane et Kumar, 2016).

Face à une agression cérébrale, comme le TC, la microglie est très rapidement activée. Elle initie et régule une réponse immunitaire visant à rétablir l'homéostasie dans le parenchyme cérébral. La microglie activée subit alors des changements morphologiques et des modifications de l'expression de nombreux gènes. Un raccourcissement des ramifications avec un élargissement du corps cellulaire est ainsi observé. On parle de morphologie hypertrophique de la microglie activée (Colonna et Butovsky, 2017).



**Figure 6: Origine, développement et fonctions de la microglie chez les rongeurs**

(Sousa *et al.*, 2017)

*Abréviations: E, embryonnaire; P, post-natal; SNC, système nerveux central*

La microglie exprime un grand nombre de récepteurs lui permettant d'assurer ses multiples fonctions physiologiques et immunitaires:

- Pour assurer son rôle de surveillance, la microglie possède des récepteurs PRR, tels que les récepteurs TLR et NLR (NOD like Receptor). Ces derniers reconnaissent des motifs PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern), tels que le lipopolysaccharide (LPS), présents sur les agents pathogènes ou des motifs DAMP endogènes libérés par les neurones ou autres cellules endommagées. La microglie exprime également des récepteurs

purinergiques et de nombreux récepteurs aux neurotransmetteurs (glutamate...) (Loane et Kumar, 2016).

- Pour ses capacités d'endocytose ou de phagocytose, la microglie présente à sa surface des récepteurs spécifiques des corps apoptotiques ou des débris protéiques et lipoprotéiques, tels que la famille des récepteurs aux lipoprotéines de faible densité LDLR (Low Density Lipoprotein Receptor) (Colonna et Butovsky, 2017).

- Pour assurer ses fonctions de présentatrice d'antigènes, la microglie activée doit exprimer des molécules CMH II, le CD68, des récepteurs de la voie du complément, ainsi que des molécules d'adhésion (Loane et Kumar, 2016).

- Pour contrôler son état d'activation, la microglie possède un large panel de récepteurs, incluant des récepteurs aux cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et 10, interféron gamma ou IFN $\gamma$  et TGF- $\beta$ ) et aux chimiokines (CX3CR1 et CXCR4), des intégrines (CD11b et CD11c) et des immunoglobulines (TREM2 ou Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cell 2) (Colonna et Butovsky, 2017).

En l'absence de lésion cérébrale, la microglie est maintenue à l'état « quiescent », grâce à des signaux « off » provenant essentiellement des neurones. En effet, les neurones expriment des protéines immunosuppressives, telles que la fractalkine (CX3CL1), le CD200 et le CD47, interagissant avec les récepteurs microgliaux (CX3CR1, CD200R et Signal Regulatory Protein SIRP $\alpha$ ) et permettant ainsi de maintenir la microglie à l'état « quiescent » ou inactif (Orihuela *et al.*, 2016; Loane et Kumar, 2016).

## 5.2. Hétérogénéité de l'activation microgliale dans le SNC

L'hétérogénéité de l'activation microgliale est décrite dans un grand nombre de pathologies du SNC (David et Kroner, 2011; Loane et Kumar, 2016; Song et Suk, 2017). Ce concept consiste en l'existence d'un continuum d'états d'activation transitoires avec des signatures moléculaires et fonctionnelles différentes selon les signaux environnementaux. On parle de phénotypes microgliaux ou de la notion de polarisation microgliale (Orihuela *et al.*, 2016; Loane et Kumar, 2016). De façon similaire à la nomenclature adoptée pour les phénotypes macrophagiques, une classification simplifiée en phénotypes pro-inflammatoire M1 et anti-inflammatoire M2 est utilisée pour la microglie.

Ainsi, en présence de motifs moléculaires associés aux dangers (PAMP et DAMP) ou de molécules pro-inflammatoires endogènes (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ...), la microglie est classiquement activée en un **phénotype pro-inflammatoire appelé M1**. Ce dernier sécrète des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , 6, 12 et 23; TNF $\alpha$ ), des chimiokines (CCL2, 5 et 20; CXCL1, 9 et

10), ainsi que des ERO. Cet état d'activation s'accompagne de l'augmentation de l'expression d'un grand nombre de récepteurs, associés notamment aux fonctions de phagocytose ou de présentation d'antigènes, tels que CD16, 32 et 86, et CMH II, ainsi que d'enzymes intracellulaires, comme la NOS2, la COX2 et la NADPH-oxydase (NOX) (Cherry *et al.*, 2014; Orihuela *et al.*, 2016; Loane et Kumar, 2016). Malgré ses effets pro-inflammatoires, ce phénotype M1 est nécessaire à l'élimination des pathogènes et des débris tissulaires générés par la lésion. Néanmoins, une activation microgliale M1 prolongée ou excessive pourrait être à l'origine d'une neurodégénérescence (voir le paragraphe « 5.4.2. Conséquences de l'activation chronique de la microglie » de ce chapitre). Cette activation microgliale M1 est observée dans des modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale, de TC et d'autres maladies neurodégénératives (Orihuela *et al.*, 2016; Song et Suk, 2017).

En revanche, en réponse à des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, 10 et 13; TGF $\beta$ ), la microglie adopte un **phénotype d'activation alternative désigné M2**. Ce phénotype possède des propriétés anti-inflammatoires, et participe à la réparation et la régénération tissulaire. Des effets dans l'immunomodulation, l'angiogenèse et la promotion des tumeurs sont également décrits avec cette activation alternative (Orihuela *et al.*, 2016). Trois phénotypes M2 ont ainsi été distingués: M2a alternatif, M2b intermédiaire et M2c désactivé (Colton, 2009).

Le phénotype M2a alternatif, induit par l'IL-4 et l'IL-13, sécrète des facteurs de croissance, tels que IGF-1 (Insulin Growth Factor 1), FGF (Fibroblast Growth Factor), CSF1, NGF, BDNF et GDNF (Glial cell-Derived Neurotrophic Factor), et des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF $\beta$ ...). Il se distingue par l'expression de marqueurs spécifiques, tels que le récepteur au mannose (MRC1 ou Mannose Receptor C-type 1) ou CD206, la chitinase-3-like (Ym1), FIZZ1 (Found in Inflammatory Zone 1; une protéine riche en cystéine exprimée dans la zone de la lésion) et l'arginase 1 (Colton, 2009; Orihuela *et al.*, 2016; Loane et Kumar, 2016). La liaison du récepteur piègeur CD206 à son ligand est suivie de la phagocytose et de l'activation d'une cascade de signaux anti-inflammatoires aboutissant à une diminution de la synthèse d'IL-12 et de TNF $\alpha$ , et à une augmentation de la synthèse d'IL-10 et d'IL-1Ra (Colton, 2009; Cherry *et al.*, 2014). FIZZ1 et YM1 sont quant à eux impliqués dans la reconstruction de la matrice extracellulaire (Colton, 2009). Concernant l'arginase, il en existe 2 isoformes, l'arginase 1 cytoplasmique et inductible et l'arginase 2 mitochondriale et constitutive. L'arginase est une enzyme intracellulaire qui assure la conversion de l'arginine en ornithine. Dans le SNC, l'arginase est en compétition avec la NOS pour leur substrat commun, l'arginine. Les produits de l'action enzymatique de la NOS sont la citrulline et le NO. A l'inverse, l'ornithine, produite par l'arginase, intervient dans la

synthèse de l'hydroxyproline, un composant majeur du collagène de la matrice extracellulaire. Par ailleurs, l'ornithine entraîne une augmentation des polyamines essentielles à la prolifération et à la différenciation cellulaire, notamment des progéniteurs neuronaux. La balance entre l'expression de la NOS2 et de l'arginase 1 constitue un outil très intéressant pour caractériser l'état d'activation microgliale.

Le phénotype M2b intermédiaire, induit par les complexes immuns et les ligands des récepteurs TLR, reste le moins connu. Ce phénotype se rapproche du phénotype M1 en raison de l'absence de marqueurs spécifiques M2 et d'une augmentation de l'expression de CMHII et CD86 (Cherry *et al.*, 2014; Loane et Kumar., 2016). Néanmoins, il présente un profil de sécrétion plus proche du phénotype M2 (IL-10<sup>High</sup> - IL-12<sup>Low</sup>; Cherry *et al.*, 2014). On lui attribue un rôle plutôt régulateur de la réponse immune Th2 (Cherry *et al.*, 2014; Loane et Kumar, 2016).

Enfin, le phénotype M2c désactivé est induit par l'IL-10, le TGFβ, les glucocorticoïdes, ainsi que par la phagocytose des corps apoptotiques. Il s'agit d'un phénotype immunosuppresseur intervenant dans la résolution de la réponse inflammatoire et le remodelage tissulaire. Il exprime des marqueurs, tels le récepteur de l'IL-4 (IL-4Rα) et la sphingosine kinase 1, et sécrète des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGFβ) (Colton, 2009; Loane et Kumar, 2016). La sphingosine kinase 1 (SphK1) phosphoryle la sphingosine en sphingosine-1-phosphate (S1P), qui à son tour est capable d'induire le phénotype M2c désactivé (Colton, 2009).

Il est important également de signaler que les microglies, étant avec les astrocytes les principales sources de cytokines pro- ou anti-inflammatoires, sont capables de contrôler leur propre polarisation de manière autocrine et paracrine (Cherry *et al.*, 2014).

Dans le tableau IV sont regroupés les principaux marqueurs utilisés dans les études expérimentales pour la caractérisation des différents phénotypes microgliaux M1, M2a, M2b et M2c. Toutefois, il est possible que les deux phénotypes M2b et M2c soient regroupés en un seul phénotype dit M2b (immunorégulateur; Chhor *et al.*, 2013; Taib *et al.*, 2017), et c'est sur cette classification simplifiée que nous sommes basée pour la caractérisation des phénotypes microgliaux dans nos conditions expérimentales.

**Tableau IV: Exemples de marqueurs exprimés par les phénotypes microgliaux M1 et M2** (Colton, 2009; Chhor *et al.*, 2013; Cherry *et al.*, 2014; Loane et Kumar, 2016; Donat *et al.*, 2017; Song et Suk, 2017)

Phénotype	Marqueurs
<b>Classique M1</b> (pro-inflammatoire)	- TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ et $\alpha$ , IL-2, 6, 12, 23 - CXCL1, 2, 3, 9, 10, 16 - CCL2, 3, 4, 6, 7, 9, 12, 19, 25 - ERO, ERN - NOS2, NOX - CD86, 16/32, 68
<b>Alternatif M2a</b> (réparateur et régénérateur)	- IL-4, 10 et 13, TGF $\beta$ , IGF1, FGF, NGF, BDNF, CSF1, CCL22 - FIZZ1, YM1 - CD206
<b>Intermédiaire M2b</b> (immuno-régulateur)	- IL-10 - CD86 - CMH II
<b>Désactivé M2c</b> (immuno-suppresseur)	- TGF $\beta$ , IL-1Ra - Gal-3 - SphK1/2 - SOCS3 - IL-4R $\alpha$ , CD163

*Abréviations: BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CCL, C-C motif Ligand; CD, cluster of differentiation; CMH II, complexe majeur d'histocompatibilité de classe II; COX2, cyclo-oxygénase 2; CSF1, colony stimulating factor; CXCL, C-X-C motif ligand; ERN, espèce réactive nitrée; ERO, espèce réactive oxygénée; FGF, basic fibroblast growth factor; FIZZ1, found in inflammatory zone 1; Gal-3, galectin-3; IGF-1, insulin growth factor 1; IL, interleukine; IL-1Ra, IL-1 receptor antagonist; IL-4R $\alpha$ , IL-4 receptor; IFN $\gamma$ , interféron gamma; NGF, nerve growth factor; NOS2, NO-synthase 2; NOX2, NADPH-oxydase 2; SOCS3, suppressor of cytokine signaling 3; SphK, sphingosine kinase; TGF $\beta$ , transforming growth factor beta; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha; YM, chitinase-3-like.*

Bien que cette polarisation microgliale soit bien décrite dans des modèles *in vitro*, le principe de l'existence *in vivo* de deux populations distinctes M1 et M2 fait actuellement débat (Ransohoff, 2016). En effet, l'environnement simplifié dans les expériences *in vitro* est

loin de ressembler à celui que l'on peut observer *in vivo* après une lésion cérébrale. Ainsi, face à des signaux tissulaires très complexes, les microglies peuvent adopter un phénotype mixte, dit «Mtrans», exprimant à la fois des marqueurs M1 et M2 (Kumar *et al.*, 2016a; Morganti *et al.*, 2016).

### 5.3. Polarisation microgliale après un traumatisme crânien

Des études visant à caractériser l'état d'activation microgliale ont été menées dans de nombreux modèles expérimentaux de TC (Cherry *et al.*, 2014; Loane et Kumar, 2016; Xu *et al.*, 2017). L'ensemble des études décrit une expression microgliale et macrophagique simultanée des deux catégories de marqueurs M1 et M2, de quelques heures jusqu'à 5 semaines après le TC (Tableau V). Ces résultats montrent donc la présence d'une population mixte après le TC.

Concernant la cinétique d'apparition de ces deux phénotypes, certaines études décrivent une activation M2 essentiellement transitoire, à l'inverse de l'activation M1 qui peut persister longtemps et contribuer à la neurodégénérescence. Wang et collaborateurs (2013) ont ainsi montré une augmentation précoce et transitoire de l'expression génique cérébrale de la majorité des marqueurs M2 étudiés entre 3 et 7 jours suivant le TC. L'expression génique des marqueurs M1 augmente également à partir de 3 jours, mais persiste jusqu'à 14 jours après le TC. Ces résultats sont confirmés grâce à des immunomarquages *in situ* des microglies/macrophages des deux phénotypes. Une autre étude rapporte une prédominance du phénotype M2 à 7 jours après le TC, puis un changement vers le phénotype M1 qui prédomine à 28 jours (Jin *et al.*, 2012).

Plus récemment, l'existence de microglies «Mtrans», co-exprimant les deux types de marqueurs, a été rapportée. En effet, une étude réalisée par Kumar et collaborateurs (2016a) montre une prédominance de l'expression des marqueurs M1 (CD16/32 ou NOS2) à 7 jours, mais également la présence de microglies «Mtrans», co-exprimant les marqueurs TGF $\beta$ /CD16/32 et arginase 1/NOS2 à 1 et 7 jours après un TC (Kumar *et al.*, 2016a). Une autre étude confirme l'existence de microglies «Mtrans» à 1, 3 et 7 jours après un TC (Morganti *et al.*, 2016).

Dans le tableau V sont résumées quelques études expérimentales avec les principaux résultats obtenus.

**Tableau V: Exemples d'études de la polarisation microgliale**  
après un ICC chez la souris (adapté de Donat *et al.*, 2017)

Marqueurs	Cinétique	Résultats	Référence
<b>M1:</b> CD86, NOS2 CD16/32, <b>M2:</b> CD206, IL-10, Ym1/2, TGFβ, CCL22, Arg-1  <i>(expression génique et protéique)</i>	J1, 3, 5, 7 et 14	Expression mixte de marqueurs M1 et M2 de J3 à J14. <b>M1:</b> ↑ de J3 à J14 <b>M2:</b> ↑ de J3 à J7, sauf CCL2 et TGFβ qui persistent jusqu'à J14.	Wang <i>et al.</i> , 2013
<b>M1:</b> NOS2, COX2 <b>M2:</b> Arg-1  <i>(expression protéique)</i>	J3, 7 et 21	<b>M1:</b> ↑ à J3 et J7	Tchantchou et Zhang, 2013
<b>M1:</b> CMHII <b>M2:</b> Ym1  <i>(expression protéique)</i>	S1, 5, 12 et 52	Expression mixte de marqueurs M1 et M2 de S1 à S5. <b>M1:</b> ↑ de S1 à S52 <b>M2:</b> ↑ de S1 à S5	Loane <i>et al.</i> , 2014b
<b>M1:</b> NOS2 <b>M2:</b> Arg-1  <i>(expression protéique)</i>	J28	Expression mixte de marqueurs M1 et M2.	Loane <i>et al.</i> , 2014a
<b>M1:</b> CD16, NOS2 <b>M2:</b> CD206, IL-10  <i>(expression protéique)</i>	J7	Expression mixte de marqueurs M1 et M2.	Wang <i>et al.</i> , 2015a
<b>M1:</b> IL-1β, 6 et 12, TNFα, NOS2, CD16/32 <b>M2a:</b> Arg-1, Ym1, CD206, Fizz-1, TGFβ <b>M2c:</b> IL-4Rα, IL- 1Ra, Socs3 <i>(expression génique et protéique)</i>	1 et 6h, et J1, 3 et 7	Expression mixte de marqueurs M1 et M2 de 6h à J3. <b>M1:</b> 6h → ↑ IL-1β, NOS2 J1 → ↑ IL-1β et 12, TNFα J3 → ↑ IL-1β et 6, NOS2 <b>M2:</b> 6h → ↑ CD206, Fizz-1, TGFβ J3 → ↑ IL-1Ra, Arg-1, SOCS3, IL-4Rα <b>Mtrans:</b> co-expression de TGFβ/ CD16/32 et de Arg-1/NOS2 à J1 et J7	Kumar <i>et al.</i> , 2016a

**Tableau V (suite): Exemples d'études de la polarisation microgliale  
après un ICC chez la souris (adapté de Donat *et al.*, 2017)**

Marqueurs	Cinétique	Résultats	Référence
<b>M1:</b> TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CD86, CD32, Ptgs2 <b>M2a:</b> IGF1, Lgals3, CD206, L-10 <b>M2c (b):</b> IL1Ra, IL4R $\alpha$ , Socs3  <i>(expression génique)</i>	6h, J1, 2, 3 et 7	Expression mixte de marqueurs M1 et M2 de 6h à J3. <b>M1:</b> 6h $\rightarrow$ $\uparrow$ IL-1 $\beta$ J1-J3 $\rightarrow$ $\uparrow$ TNF $\alpha$ J1 et J3 $\rightarrow$ $\uparrow$ Ptgs2 J3 $\rightarrow$ $\uparrow$ CD32 <b>M2a:</b> J1-J3 $\rightarrow$ $\uparrow$ Lgals3 J3 $\rightarrow$ $\uparrow$ IGF1 <b>M2c (b):</b> 6h-J3 $\rightarrow$ $\uparrow$ IL1Ra J3 $\rightarrow$ $\uparrow$ IL4Ra	Taib <i>et al.</i> , 2017

*Abréviations: Arg-1, arginase 1; CCL, C-C motif Ligand; CD, cluster of differentiation; CMH II, complexe majeur d'histocompatibilité de classe II; COX2, cyclo-oxygénase de type 2; FIZZ1, found in inflammatory zone 1; J, jour; Lgals3, Galectin-3; IGF-1, insulin growth factor 1; IL, interleukine; IL-1Ra, IL-1 receptor antagonist; IL-4R $\alpha$ , IL-4 receptor; NOS2, NO-synthase de type 2; Ptgs2, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (ou COX2); S, semaine; Socs3, suppressor of cytokine signaling 3; SphK, sphingosine kinase; TGF $\beta$ , transforming growth factor beta; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha; YM, chitinase-3-like*

D'autres études expérimentales ont tenté de caractériser les phénotypes microgliaux post-TC, en mesurant l'expression génique de marqueurs spécifiques directement sur des homogénats de cerveaux (Cao *et al.*, 2012; Bachstetter *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Turtzo *et al.*, 2014; Morganti *et al.*, 2016; Truettner *et al.*, 2017). Or, ces marqueurs n'étant pas exprimés exclusivement par les microglies et/ou macrophages, les résultats de ces études doivent être interprétés avec précautions.

A l'heure actuelle, la méthode la plus utilisée pour identifier les phénotypes microgliaux/macrophagiques dans des modèles animaux de TC consiste à isoler les microglies/macrophages par tri cellulaire immunomagnétique, à l'aide d'un Ac anti-CD11b. En résumé, ces études expérimentales montrent la présence simultanée des deux phénotypes microgliaux M1 et M2, voire même, l'existence de microglies «Mtrans» co-exprimant des marqueurs M1 et M2. Toutefois l'importance des séquelles post-traumatiques chez les patients témoigne de l'incapacité de l'activation microgliale M2 à réparer les tissus lésés et à restaurer l'homéostasie cérébrale.

## 5.4. Conséquences de la polarisation microgliale dans la pathologie du traumatisme crânien

### 5.4.1. Conséquences de l'activation aiguë et subaiguë de la microglie

Pendant les phases aiguë et subaiguë après le TC, l'activation microgliale M1 est classiquement associée à des effets délétères, tandis que l'activation microgliale M2 est associée à des effets bénéfiques.

#### 5.4.1.1. Conséquences délétères de l'activation microgliale

La microglie activée en phénotype M1 crée un environnement pro-inflammatoire et cytotoxique contribuant fortement à la perte neuronale et oligodendrocytaire, ainsi qu'à la démyélinisation post-TC.

- **La mort des oligodendrocytes et la démyélinisation**

En raison de la complexité des modèles *in vivo*, l'implication directe de la microglie dans la mort des oligodendrocytes a surtout été étudiée grâce à des modèles *in vitro* de co-culture de microglies/oligodendrocytes ou à l'utilisation de milieux conditionnés provenant de culture de microglies.

Wang et collaborateurs (2013, 2015a) ont ainsi montré que l'utilisation d'un milieu de culture conditionné M1 (obtenu à partir de cultures de microglies polarisées en phénotype M1) aggrave la mort des oligodendrocytes suite à une privation en glucose et en oxygène. Des résultats similaires sont obtenus dans un modèle de co-culture de microglies M1 et d'oligodendrocytes soumis à une privation en glucose et en oxygène (Wang *et al.*, 2015a).

En plus de cette toxicité directe sur les oligodendrocytes, la microglie M1 semble altérer le processus d'oligodendrogenèse. En effet, il a été montré *in vitro* que la différenciation de progéniteurs neuronaux NPC (Neural Progenitor stem Cell) en oligodendrocytes matures est inhibée en cas de co-culture avec des microglies polarisées en phénotype M1 (Butovsky *et al.*, 2006a). Ce résultat a été confirmé *in vivo* dans un modèle de sclérose en plaques chez le rat (Butovsky *et al.*, 2006b).

Dans un modèle expérimental de TC chez la souris, une corrélation a été mise en évidence entre le nombre de microglies/macrophages M1 et la sévérité de la démyélinisation et des dommages axonaux (Wang *et al.*, 2013). Par ailleurs, la diminution de l'activation M1 a été associée à la préservation de l'intégrité de la SB et à une diminution de la démyélinisation axonale (Wang *et al.*, 2015a).

- **La toxicité neuronale**

La toxicité neuronale due aux microglies activées en phénotype M1 est bien connue dans les pathologies du SNC. Dans des modèles expérimentaux de TC, les stratégies thérapeutiques visant à diminuer cette activation microgliale s'opposent ainsi à la mort neuronale (d'Avila *et al.*, 2012; Stoica *et al.*, 2014; Bu *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2016b). De plus, l'induction *in vitro* ou *in vivo* du phénotype M1 est associée à une neurotoxicité et/ou une altération de la neurogenèse. *In vitro*, l'ajout de microglies préalablement polarisées en phénotype M1 sur des coupes organotypiques d'hippocampe, soumises à une privation en oxygène et glucose, exacerbe la mort neuronale (Girard *et al.*, 2013). De manière similaire, la co-culture de neurones avec des microglies M1 ou l'addition d'un milieu de culture conditionné M1 sur ces cultures de neurones amplifie la mort neuronale induite par une privation en oxygène et glucose (Hu *et al.*, 2012). *In vivo*, l'injection de LPS, capable d'induire une activation microgliale M1, altère fortement la neurogenèse au niveau de l'hippocampe chez le rat adulte (Loane et Kumar, 2016).

En plus de ces effets sur la survie neuronale et la neurogenèse, il a été montré que des macrophages orientés en phénotype M1 inhibent la régénération axonale en augmentant l'expression d'inhibiteurs de la croissance axonale, tels que le chondroïtine sulfate protéoglycane (Loane et Kumar, 2016).

#### 5.4.1.2. **Conséquences bénéfiques de l'activation microgliale**

La microglie activée en phénotype M2 sécrète des facteurs de croissance indispensables à la régénération oligodendrocytaire, axonale, neuronale et vasculaire. Cela implique respectivement des processus d'oligodendrogenèse, de remyélinisation, de neurogenèse et d'angiogenèse.

- **Oligodendrogenèse et remyélinisation**

La contribution des microglies/macrophages M2 à la remyélinisation post-lésionnelle a été démontrée essentiellement dans des modèles expérimentaux de sclérose en plaques. Il a ainsi été montré que le début de la remyélinisation coïncide avec une transition du phénotype M1 vers le phénotype M2 (Miron *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'injection dans les ventricules cérébraux de microglies, préalablement polarisées en phénotype M2 par l'IL-4, augmente l'oligodendrogenèse dans la moelle épinière et réduit la sévérité de la sclérose en plaques chez le rat (Butovsky *et al.*, 2006b).

Ces données suggèrent que les microglies/macrophages de phénotype M2 contribuent à la remyélinisation en favorisant la différenciation des OPC (Oligodendrocyte Progenitor Cell).

Dans un modèle expérimental d'ICC, l'augmentation du phénotype M2 est associée à la préservation de l'intégrité de la SB, une diminution de la démyélinisation des axones

(évaluée par la mesure de la Myelin Basic Protein ou MBP, et par microscopie électronique), ainsi qu'à une amélioration de la transmission nerveuse (Wang *et al.*, 2015a). Cette même étude décrit un effet protecteur *in vitro* des microglies polarisées en phénotype M2 sur des oligodendrocytes soumis à une privation en oxygène et en glucose.

- **Neurogenèse**

La microglie est un constituant important de la niche neurogénique de la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe. Elle contribue, *via* la sécrétion de facteurs neurogéniques, à la migration et à la différenciation des cellules souches et des progéniteurs neuronaux (Loane et Kumar, 2016).

Après un TC, les microglies/macrophages polarisés en phénotype M2 sont les principales sources d'IGF-1, d'IL-10 et de BDNF, qui sont indispensables à la neurogenèse (Loane et Kumar, 2016). De plus, il a été montré *in vitro* que la microglie activée en phénotype M2 favorise la différenciation des progéniteurs neuronaux (Butovsky *et al.*, 2006a; Loane et Kumar, 2016). Ces données suggèrent donc que l'activation microgliale en phénotype M2 pourrait favoriser la neurogenèse post-TC en stimulant la différenciation des progéniteurs neuronaux.

- **Angiogenèse**

Les microglies/macrophages M2 participent à l'angiogenèse en sécrétant des facteurs pro-angiogéniques, tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ou le FGF-2 (Loane et Kumar, 2016). L'administration intraventriculaire de ces deux facteurs de croissance, seul ou en association, améliore la neurogenèse et l'angiogenèse, et réduit le volume de la lésion après un TC chez la souris (Thau-Zuchman *et al.*, 2012).

Dans un modèle d'ischémie cérébrale chez la souris, la polarisation microgliale/macrophagique M2 est associée à une augmentation de l'angiogenèse et de la neurogenèse (Jin *et al.*, 2014). Par ailleurs, le traitement *in vitro* de cellules endothéliales cérébrales avec un milieu conditionné de microglies M2 favorise l'angiogenèse.

#### 5.4.2. Conséquence de l'activation chronique de la microglie

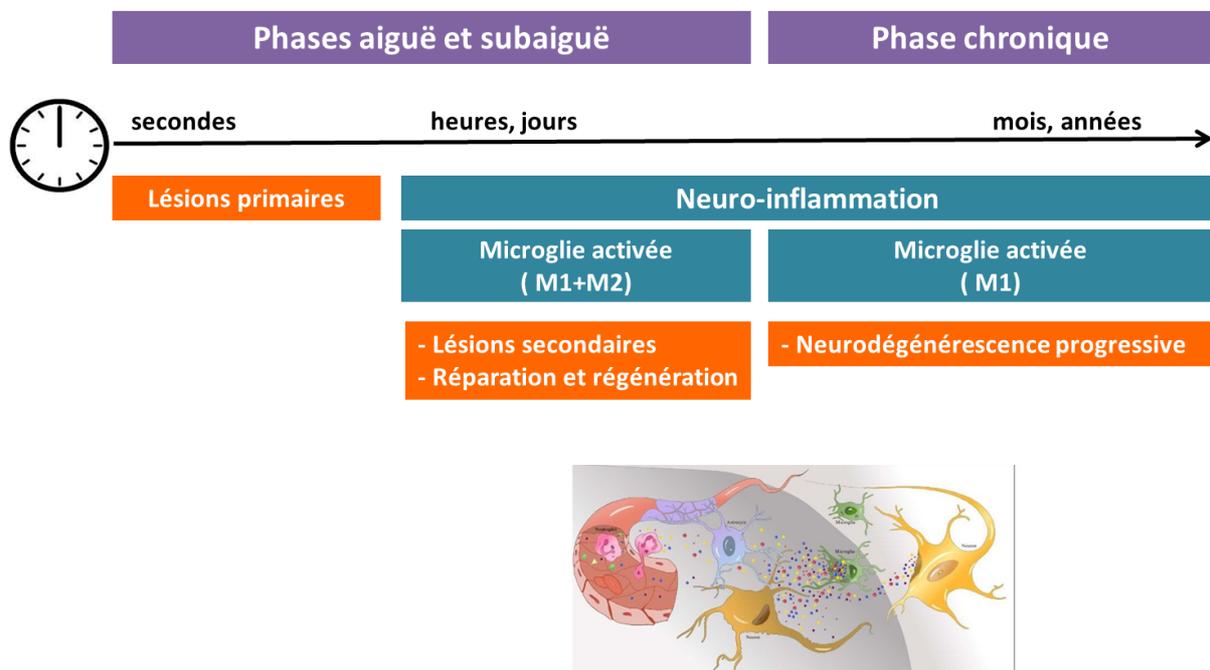
Des études expérimentales et cliniques suggèrent un lien entre l'exposition à des TC d'intensité modérée à sévère et le développement progressif d'une neurodégénérescence chronique (Johnson *et al.*, 2013a; Loane *et al.*, 2014b; Faden et Loane, 2015; Faden *et al.*, 2016).

Expérimentalement, une atrophie cérébrale progressive et une mort neuronale sont visualisées jusqu'à un an après un TC sévère chez le rat (Smith *et al.*, 1997). Une augmentation progressive de la lésion, une neurodégénérescence au niveau de

l'hippocampe et une démyélinisation sont observées jusqu'à un an après un TC modéré chez la souris (Loane *et al.*, 2014b). En clinique, des changements sont visualisés à la fois dans la SB et la substance grise, dans les mois voire les années suivant le TC (Jonson *et al.*, 2013a; Faden et Loane, 2015).

La neuro-inflammation chronique, pouvant persister jusqu'à plusieurs années après le TC (Johnson *et al.*, 2013a; Smith *et al.*, 2013, Loane *et al.*, 2014b), semble contribuer à ce phénomène de neurodégénérescence (Faden et Loane, 2015; Faden *et al.*, 2016). En effet, dans la majorité des études expérimentales et cliniques, la dégénérescence de la SB et de la substance grise est souvent associée à une activation microgliale chronique (Johnson *et al.*, 2013a; Aungst *et al.*, 2014; Loane *et al.*, 2014b; Faden et Loane, 2015). De plus, les microglies activées semblent plutôt exprimer des molécules caractéristiques de l'état d'activation M1, telles que CMHII, CD68 et NOX (Loane *et al.*, 2014b).

L'ensemble de ces données semble donc en faveur de l'implication du phénotype microglial cytotoxique M1 dans la dégénérescence progressive à la suite d'un TC (Figure 7). Cette hypothèse est d'autant plus confortée par les données expérimentales décrivant une activation M2 transitoire, qui est rapidement remplacée par une activation M1 prédominante et persistante dans le site de la lésion (Wang *et al.*, 2013).



**Figure 7: Conséquences de l'activation aiguë, subaiguë et chronique de la microglie**

## 6. Modulation pharmacologique de la polarisation microgliale

La modulation pharmacologique des phénotypes microgliaux constitue une approche thérapeutique potentielle pour le traitement des lésions cérébrales dans les pathologies neurodégénératives. Durant ces dernières années, un intérêt particulier a porté sur la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de cette polarisation microgliale (Orihuela *et al.*, 2016), dans le but de développer des stratégies thérapeutiques permettant de favoriser le phénotype protecteur et régénérateur M2.

Les signaux extracellulaires provenant de l'environnement jouent un rôle primordial dans les changements phénotypiques microgliaux. En dehors des médiateurs pro-inflammatoires, tels que le  $TNF\alpha$  ou l' $IFN\gamma$ , des facteurs libérés par les cellules lésées (DAMP) peuvent également moduler cette polarisation (Loane et Kumar, 2016). *In vitro*, un milieu conditionné provenant de cultures de neurones ischémiés (privation en oxygène et glucose) est ainsi capable de polariser les microglies en phénotype pro-inflammatoire M1 (Hu *et al.*, 2012).

Au niveau cellulaire, cette polarisation microgliale est orchestrée par différents mécanismes incluant des modifications du métabolisme énergétique, la mise en jeu de certaines voies de signalisation, et des modifications transcriptionnelles et épigénétiques (Orihuela *et al.*, 2016; Loane et Kumar, 2016). Il a été montré que des agonistes des récepteurs TLR (capables d'induire une activation microgliale M1), tels que le LPS, diminuent le métabolisme oxydatif en faveur de la glycolyse (Orihuela *et al.*, 2016). Cette modification métabolique pourrait donc participer à la polarisation microgliale M1.

Concernant les signaux intracellulaires pouvant être impliqués dans la polarisation microgliale M1/M2, plusieurs molécules ont été identifiées. Ces molécules incluent notamment certains récepteurs nucléaires (PPAR; Retinoid X Receptor ou RXR), des molécules de la voie d'oxydoréduction (NOX2; Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha ou HIF-1 $\alpha$ ), des molécules de la voie NF- $\kappa$ B et des molécules de la voie JAK/STAT/SOCS (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription/Suppressor Of Cytokine Signalling) (Loane et Kumar, 2016; Song et Suk, 2017).

La polarisation microgliale semble donc être contrôlée à la fois par des facteurs environnementaux et intracellulaires, dont la diversité ouvre la voie à un large panel d'approches thérapeutiques allant des thérapies géniques aux petites molécules.

Concernant les thérapies géniques, comme la surexpression de l'IL-4 ou l'administration de protéines recombinantes, telles que l'IL-4, 10, 13 ou le TGF- $\beta$ , des études expérimentales ne mettent en évidence qu'une efficacité médiocre dans les pathologies neurodégénératives, en raison d'un faible passage à travers la BHE (Song et Suk, 2017).

Face au manque d'efficacité des thérapies géniques, de nombreuses études expérimentales se sont focalisées sur le développement de petites molécules capables de moduler la polarisation microgliale. Il s'agit principalement de molécules agissant sur les voies métaboliques ou d'autres cascades intracellulaires intervenant dans la polarisation microgliale (Song et Suk, 2017).

- **Action sur les récepteurs nucléaires**

Les récepteurs nucléaires PPAR semblent jouer un rôle clé dans la polarisation microgliale et macrophagique M2 (Chawla, 2010; Loane et Kumar, 2016; Song et Suk, 2017). Les agonistes des récepteurs PPAR exercent des effets neuroprotecteurs et leur utilisation a donné des résultats encourageants dans des modèles expérimentaux de neurodégénérescence et de TC. Ainsi, le fénofibrate, un agoniste du récepteur PPAR $\alpha$ , réduit la neuro-inflammation, le stress oxydant, l'œdème cérébral et améliore la récupération fonctionnelle après un TC (Besson *et al.*, 2005a). Des agonistes du récepteur PPAR $\gamma$  (pioglitazone et rosiglitazone) exercent également des effets anti-inflammatoires et neuroprotecteurs liés à une polarisation des microglies/macrophages en phénotype M2 (Loane et Kumar, 2016).

- **Action sur le métabolisme cellulaire énergétique**

Des études suggèrent un lien entre le métabolisme cellulaire, plus particulièrement mitochondrial, et la modulation des phénotypes microgliaux M1 et M2 (Orihuela *et al.*, 2016).

En condition de normoxie, l'ATP est produit par phosphorylation oxydative. A l'inverse, en condition hypoxique, l'énergie cellulaire est produite par glycolyse anaérobie: le pyruvate est transformé en lactate. Une modification du métabolisme énergétique par passage de la phosphorylation oxydative à la glycolyse anaérobie pourrait favoriser la polarisation microgliale M1 (Song et Suk, 2017). Ce changement métabolique est favorisé par la voie PI3K (Phospholinositide 3-Kinase)/Akt ou PKB (Protéine Kinase B), et inhibé par l'IL-10 et la protéine kinase AMPK (Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase). Ainsi, la metformine, un activateur de l'AMPK, induit une polarisation microgliale M2 et exerce des effets neuroprotecteurs dans des modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale (Jin *et al.*, 2014; Song et Suk, 2017).

Le rôle d'autres molécules du métabolisme énergétique, telles que la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK) ou l'aldose réductase (AR), dans la promotion de la polarisation microgliale M1 a également été décrit *in vitro*, ainsi que dans des modèles expérimentaux de pathologies neurodégénératives et de lésion de la moelle épinière (Song et Suk, 2017).

- **Action sur l'AMPC**

Le rôle anti-inflammatoire de l'AMPC (Adénosine MonoPhosphate cyclique) sur l'activation microgliale est bien connu et son effet protecteur dans des modèles expérimentaux de sclérose en plaques et d'ischémie cérébrale a également été démontré (Song et Suk, 2017). De plus, l'inhibition pharmacologique de la PDE4 (PhosphoDiestérase E4), responsable de l'hydrolyse de l'AMPC, est à l'origine d'effets anti-inflammatoire et neuroprotecteur dans des modèles expérimentaux de sclérose en plaques (Dinter, 2000). Le sildénafil, un inhibiteur de la PDE5, a également été proposé comme un agent thérapeutique potentiel, visant à réduire la neuro-inflammation et la neurodégénérescence qui en résulte (Song et Suk, 2017). Ainsi, dans un modèle d'ischémie néonatale chez les souris, l'administration de sildénafil a permis d'induire une polarisation microgliale M2 capable de s'opposer aux lésions post-ischémiques (Moretti *et al.*, 2016). De même, *in vitro*, le sildénafil s'est opposé à la polarisation microgliale M1 induite par le LPS (Zhao *et al.*, 2016).

- **Action sur la voie d'oxydoréduction**

Face à un stress oxydant, la microglie adopte un phénotype classique M1 par différents mécanismes, impliquant notamment la NOS2 et la NOX2 (Song et Suk, 2017).

Après un TC, la NOX2 est fortement exprimée par les microglies/macrophages M1 et faiblement exprimée par les microglies/macrophages M2 (Kumar *et al.*, 2016a,b). Il a été montré que la délétion génique de la NOX2 réduit l'activation M1, la perte tissulaire et la neurodégénérescence dans un modèle expérimental de TC (Kumar *et al.*, 2016b). Ces effets sont associés à une augmentation de l'activation M2 et à une amélioration de la récupération fonctionnelle.

- **Action sur les récepteurs du glutamate**

Il a été montré *in vitro* que l'activation des récepteurs microgliaux mGluR5 par un agoniste sélectif, le CHPG (2-Chloro-5-HydroxyPhénylGlycine), réduit la production de NO, d'ERO et de TNF $\alpha$  en réponse au LPS ou à l'IFN $\gamma$ , ainsi que la toxicité neuronale associée (Byrnes *et al.*, 2009; Loane *et al.*, 2009). Cet effet anti-inflammatoire de la CHPG est absent des microglies provenant de souris n'exprimant pas le gène du récepteur mGluR5 ou en cas d'inhibition pharmacologique de ce récepteur. *In vivo*, l'administration de la CHPG s'est révélée neuroprotectrice dans des modèles expérimentaux de TC (Loane *et al.*, 2013). De même, un traitement par le VU0360172, un autre agoniste du récepteur mGluR5, diminue la polarisation microgliale M1 et la neurodégénérescence, et permet une meilleure récupération fonctionnelle après un TC chez la souris (Loane *et al.*, 2014a).

- **Action sur la voie mTOR**

La protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) est une sérine/thréonine kinase impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques, telles que la prolifération cellulaire, la croissance et la survie cellulaire, la biosynthèse des protéines et la transcription. Outre son rôle dans la prévention des glioblastomes, l'inhibition de mTOR s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la NOS2 et d'une diminution de l'expression de l'IL-10 (Song et Suk, 2017), suggérant que l'inhibition de mTOR empêcherait la croissance tumorale, d'une part, en inhibant la polarisation microgliale/macrophagique M2 à l'origine de la libération de facteurs de croissance, et d'autre part, en favorisant la polarisation M1 cytotoxique et donc anti-tumorale.

- **Action sur la protéine ROCK**

La protéine ROCK (Rho-associated protein kinase) est une sérine/thréonine kinase impliquée essentiellement dans le contrôle de la forme et de la mobilité cellulaire par action sur le cytosquelette. L'inhibition de cette protéine, notamment par le fasudil, réduit la neuro-inflammation et la démyélinisation dans des modèles expérimentaux de sclérose en plaques (Song et Suk, 2017). De plus, il a récemment été montré que le fasudil favorise la polarisation microgliale M2, *in vitro* sur une lignée BV2 de microglie, et *in vivo* dans un modèle expérimental de sclérose en plaques chez la souris (Chen *et al.*, 2014a).

- **Modifications épigénétiques**

L'hétérogénéité de l'activation microgliale et macrophagique peut également être la conséquence de phénomènes épigénétiques (Loane et Kumar, 2016). A titre d'exemple, de nombreux inhibiteurs d'HDAC se sont avérés protecteurs après un TC (Wang *et al.*, 2015a; Loane et Kumar, 2016; Song et Suk, 2017). Une étude récente montre que l'inhibition de l'HDAC par le scriptaid diminue les lésions de la SB en favorisant l'activation microgliale M2 (Wang *et al.*, 2015a). Une autre enzyme, l'histone déméthylase *jmjd3*, semble également intervenir dans la polarisation des microglies/macrophages en favorisant le phénotype M2 et en inhibant le phénotype M1 (Loane et Kumar., 2016). De plus, sa suppression s'accompagne d'une exacerbation de la perte de neurones dopaminergiques dans des modèles expérimentaux de maladie de Parkinson.

L'ensemble de ces données expérimentales révèle un potentiel neuroprotecteur important de molécules permettant de moduler la polarisation microgliale. Il reste maintenant à prouver leur efficacité dans la réduction des séquelles cognitives, motrices et psychiques chez les patients traumatisés crâniens.

***La neuro-inflammation post-TC étant reconnue à la fois bénéfique et délétère, la recherche actuelle vise donc à la moduler et non pas à la supprimer. Le caractère progressif et la complexité de ce phénomène offrent des possibilités infinies de cibles pharmacologiques. Parmi les acteurs cellulaires de la neuro-inflammation, la microglie, par son hétérogénéité d'activation, constitue une cible particulièrement importante en vue d'une modulation pharmacologique de la neuro-inflammation. Ainsi, favoriser le phénotype microglial M2 protecteur permettra de réduire les lésions post-TC, notamment celles de la SB qui contribuent considérablement aux séquelles cognitives, motrices et psychiques chez les patients traumatisés crâniens.***

## CHAPITRE III: LES LÉSIONS DE LA SUBSTANCE BLANCHE ET ROLE DES DÉBRIS DE MYÉLINE DANS LA NEURO-INFLAMMATION

### **1. La substance blanche: organisation et fonctions**

La substance blanche (SB), qui représente environ 50% du volume cérébral chez l'Homme (Zhang et Sejnowski, 2000), relie les différentes aires de la substance grise où se situent les corps cellulaires des neurones (Wang *et al.*, 2016). Elle est constituée de faisceaux axonaux myélinisés et non myélinisés entourant les cellules gliales et les vaisseaux. Les axones, occupant environ 87% de la SB, assurent non seulement la conduction du potentiel d'action, mais constituent également les voies de transport des médiateurs biologiques et des nutriments entre les corps cellulaires et les synapses. De manière antérograde, les axones véhiculent les nutriments, tels que le glucose, les protéines et les lipides, et les médiateurs biologiques des corps cellulaires vers les synapses. A l'inverse, de manière rétrograde, les axones transportent, d'une part, les déchets et les agrégats protéiques des terminaisons axonales vers les corps cellulaires, afin de permettre leur élimination, et d'autre part, fournissent des signaux de croissance aux corps cellulaires. L'intégrité des axones est donc essentielle pour le bon fonctionnement du SNC. Cette intégrité est notamment maintenue grâce à la présence d'une gaine de myéline, constituée par des prolongements membranaires d'origine oligodendrocytaire qui entourent, isolent et protègent les axones.

D'un point de vue anatomique, on distingue la SB périventriculaire (entourant les ventricules), sous-corticale (située immédiatement sous les cortex) et profonde (située dans l'espace délimité par les SB périventriculaire et sous-corticale). Par ailleurs, les faisceaux axonaux peuvent être répartis en trois catégories: (1) les faisceaux de projection ascendants et descendants, qui connectent des structures du cortex cérébral à celles des régions sous-corticales (thalamus, tronc cérébral, cervelet...), telles que les faisceaux thalamo-corticaux ou pyramidaux, (2) les faisceaux commissuraux, reliant des territoires homologues des deux hémisphères cérébraux, tels que le corps calleux et le fornix ou trigone, et (3) les faisceaux d'association, qui relient les différents territoires de la substance grise au sein du même hémisphère, tels que les faisceaux longitudinaux supérieur et inférieur, et le cingulum (Filley, 2010; Wang *et al.*, 2016).

#### **1.1. La myéline**

La myéline, entourant les axones, représente environ 30% de la masse sèche du cerveau humain (Schmitt *et al.*, 2015). Comparée aux autres membranes cellulaires,

la composition de la membrane myélinique est unique, avec une forte proportion de lipides (cholestérol, phospholipides et glycolipides) et une faible proportion de protéines.

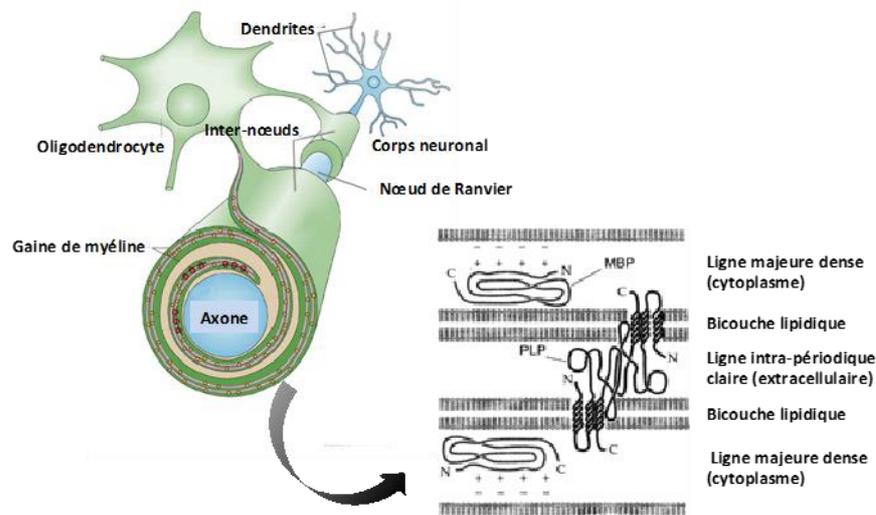
La myéline est composée de 40% d'eau. La masse sèche comprend 70 à 80% de lipides (Simons et Nave, 2015). Trois lipides constituent à eux seuls 65% de la masse totale sèche lipidique; il s'agit du cholestérol, du galactosylcéramide (ou galactocérebroside) et du plasmalogène éthanolamine avec un ratio de 40%:40%:20% (Schmitt *et al.*, 2015). Cette richesse en composants lipidiques contribue fortement à la stabilité de la gaine de la myéline (Simons et Nave, 2015). Bien que ces lipides ne soient pas spécifiques de la myéline, leur proportion est néanmoins différente de celle des autres membranes cellulaires (Schmitt *et al.*, 2015).

Contrairement aux lipides, les protéines, présentes en plus faible proportion (20 à 30%), sont spécifiques de la myéline. Parmi ces protéines, la MBP et la PLP (ProteoLipid Protein) sont les plus abondantes. La MBP, qui constitue 30 à 40% de la masse totale sèche protéique de la myéline, joue un rôle important dans la stabilisation de la gaine de myéline par des interactions avec les groupements lipidiques des feuillettes internes chargés négativement (Barkovich *et al.*, 2000). La myéline contient d'autres protéines, toutes aussi importantes pour sa structure et sa fonction, telles que la MAG (Myelin Associated Glycoprotein), la MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) et la CNPase (2,3-Cyclic Nucleotide 3-Phosphodiesterase).

La gaine de myéline présente une organisation structurale multi-lamellaire caractérisée par une répétition de couches périodiques formées par l'empilement alterné de lignes claires et denses (Figure 8) (Barkovich *et al.*, 2000; Simons et Nave, 2015). Les lignes denses, appelées aussi lignes périodiques majeures, correspondent à l'accolement des feuillettes internes cytoplasmiques des membranes lipidiques. Ces lignes contiennent de la MBP, une protéine oligodendrocytaire cytoplasmique attachée au feuillet interne de la membrane cellulaire (Barkovich *et al.*, 2000). Les lignes claires ou intra-périodiques résultent de l'accolement des feuillettes externes des membranes lipidiques (Simons et Nave, 2015). Ces lignes contiennent de la PLP, exprimée par les feuillettes externes des membranes cellulaires des oligodendrocytes (Barkovich *et al.*, 2000). Cette myéline, dite compacte, est hautement résistante à l'influx électrique et est à l'origine de la conduction saltatoire de l'influx nerveux. En effet, des segments d'axones nus, appelés nœuds de Ranvier, séparent les régions myélinisées de l'axone. Ces régions contiennent de multiples canaux sodiques intervenant dans la dépolarisation membranaire. Lors d'un influx nerveux, le potentiel d'action se propage à travers les nœuds de Ranvier de manière saltatoire, ce qui accélère la conduction nerveuse.

Il existe également de la myéline dite non compacte retrouvée essentiellement dans les régions paranodales, constituées par les extrémités latérales de la myéline compacte à

proximité des nœuds de Ranvier, et dans les incisures de Schmidt-Lanterman longitudinales (Simons et Nave, 2015).



**Figure 8: Organisation et composition de la gaine de myéline**

(adapté de Barkovich *et al.*, 2000)

*Abréviations: MBP, myelin basic protein; PLP, proteolipid protein*

## 1.2. Les oligodendrocytes

L'oligodendrocyte est la cellule gliale responsable de la myélinisation des axones dans le SNC. Chaque oligodendrocyte est capable de myéliniser 60 segments d'axones en parallèle (Maki *et al.*, 2013).

Le développement embryonnaire et la maturation des oligodendrocytes ont largement été étudiés dans les modèles animaux, notamment chez les rongeurs. Les oligodendrocytes sont les dernières cellules générées après les neurones et les astrocytes durant le développement embryonnaire (El Waly *et al.*, 2014). Trois populations d'OPC sont observées au cours du développement cérébral: la première provient de l'éminence ganglionnaire médiane et de l'aire antérieure entopédonculaire du tube neural, la seconde des éminences latérale et caudale, et la troisième du cortex après la naissance (Bradl et Lassmann, 2010). Bien que la première population soit la première à peupler l'ensemble du télencéphale, sa contribution au pool d'OPC décline rapidement, puis disparaît chez l'adulte. Par ailleurs, il a été suggéré que ces différentes populations, en compétition, pourraient myéliniser des régions différentes du cerveau (El Waly *et al.*, 2014).

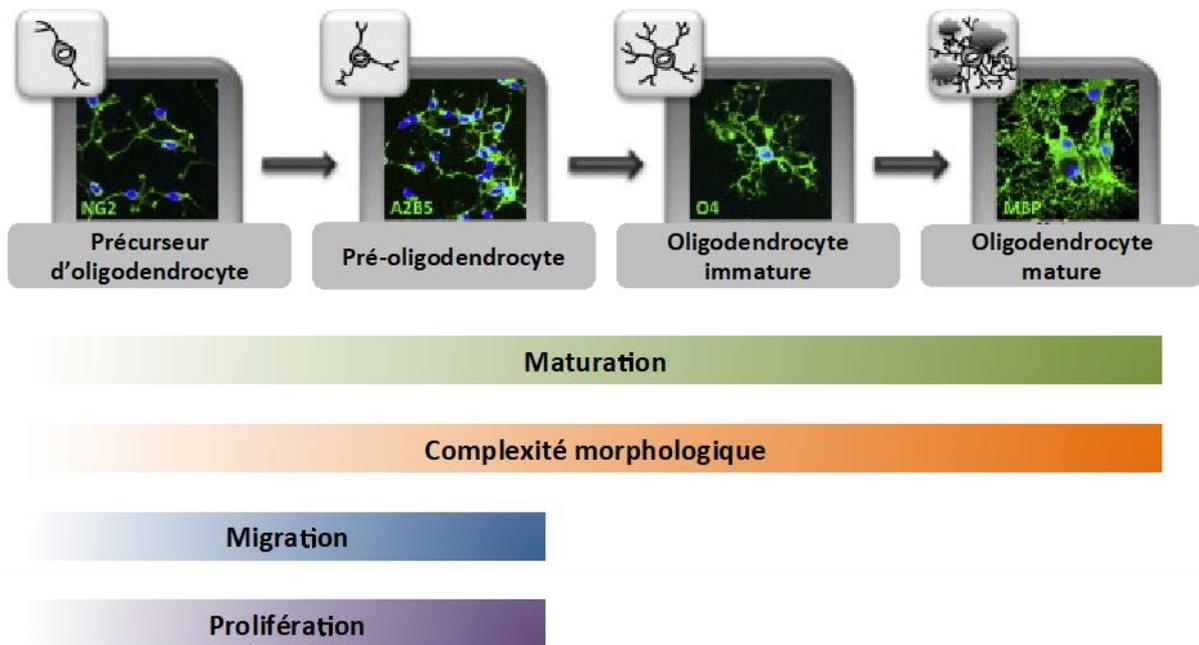
Les OPC possèdent de hautes capacités de migration, de prolifération et de différenciation en oligodendrocytes matures. Toutefois, une faible proportion est maintenue à l'état immature ou quiescent, et est ainsi retrouvée dans le cerveau adulte. Après la

naissance, le renouvellement des OPC est assuré à partir des cellules souches neurales multipotentes (Neural Stem Cell ou NSC) nichées dans la zone sous-ventriculaire (ZSV) (El Waly *et al.*, 2014). Toutefois, seule une faible proportion de ces cellules souches migre vers la SB et le cortex, et se différencie en OPC. Le reste des cellules se différencie en neurones (Maki *et al.*, 2013; El Waly *et al.*, 2014). Il est par ailleurs important de noter que contrairement aux OPC qui migrent vers la SB, ceux présents dans la substance grise restent quiescents et prolifèrent très peu (El Waly *et al.*, 2014).

Durant la maturation, les oligodendrocytes acquièrent une morphologie complexe avec de nombreux prolongements cytoplasmiques, indispensables à leur fonction de myélinisation, et perdent leurs capacités de migration et de prolifération (Barateiro et Fernandes, 2014). On peut distinguer quatre stades de maturation (Figure 9): (1) OPC, (2) pré-oligodendrocytes ou OPC tardifs, (3) oligodendrocytes immatures ou pré-myélinisants, et (4) oligodendrocytes matures ou myélinisants. Cette maturation s'accompagne d'une modification de l'expression de marqueurs spécifiques:

1. Les OPC expriment des marqueurs précoces, tels que le récepteur PDGFR $\alpha$  (Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha), le protéoglycane NG2 (Neural/Glial Antigen 2), les facteurs de transcription Olig1/2 (Oligodendrocyte transcription factor), le ganglioside A2B5 et la molécule d'adhésion PSA-NCAM (PolySialylated Acid-Neural Cell Adhesion Molecule). De plus, ces OPC présentent une morphologie caractéristique dite bipolaire avec deux courtes ramifications émanant de deux côtés opposés du corps cellulaire.
2. Les pré-oligodendrocytes ou OPC tardifs commencent à développer plus de ramifications et à exprimer des marqueurs tels que le sulfatide, reconnu par l'Ac O4 et la protéine GPR17 (G Protein-coupled Receptor 17). Cette différenciation s'accompagne de la perte de l'expression de certains marqueurs précoces, comme la PSA-NCAM ou Olig1.
3. Au stade oligodendrocyte immature, la morphologie devient plus complexe avec davantage de ramifications, qui sont de plus en plus prolongées. Ce stade de maturation se caractérise par l'expression de nouvelles protéines, telles que la CNPase et la GalC (GalactosylCéramidase), la persistance de certains marqueurs plus précoces, tels que O4, Olig2 et GPR17, ainsi que la perte de l'expression de PDGFR $\alpha$  et NG2.
4. Enfin, les oligodendrocytes matures présentent de nombreux prolongements cytoplasmiques et synthétisent les protéines de la myéline: MBP, MAG, MOG, PLP et CNPase. D'autres marqueurs, tels que GalC et Olig2, persistent jusqu'à ce stade ultime de maturation des oligodendrocytes. Par ailleurs, ces oligodendrocytes expriment d'autres marqueurs, comme le facteur MRF/Gm98 (Myelin Regulator

Factor) et les protéines zfp488 (Zinc Finger Protein 488) et FABP5 (Fatty Acid Binding Protein 5).



**Figure 9: Différents stades de maturation des oligodendrocytes**

(adapté de Barateiro et Fernandes, 2014)

Chez l'Homme, il existe très peu de données concernant l'oligodendrogenèse. Les premières populations d'OPC sont observées dans les éminences ganglionnaires et les zones ventriculaire et ZSV corticales à partir de 10 semaines de gestation (Barateiro et Fernandes, 2014). Entre 18 et 28 semaines, les cellules NG2+, correspondant aux OPC et pré-oligodendrocytes, sont les plus abondantes. Une importante vague de différenciation des oligodendrocytes, ainsi qu'un début de myélinisation, sont ensuite observés entre 28 et 40 semaines de gestation (Jakovcevski *et al.*, 2009; Barateiro et Fernandes, 2014). Les oligodendrocytes matures myélinisants MBP+, observés entre la 20<sup>e</sup> et la 28<sup>e</sup> semaines, ne sont présents en nombre important qu'à partir de 36 à 40 semaines de gestation.

La myélinisation débutant dès la 20<sup>e</sup> semaine de la période prénatale, les nerfs périphériques et les pédoncules cérébelleux sont totalement myélinisés à la naissance (Barateiro et Fernandes, 2014). Le corps calleux est totalement myélinisé 6 mois après la naissance, puis les lobes frontaux, pariétaux et occipitaux entre 8 et 12 mois après la naissance. Toutefois, la myélinisation du cortex préfrontal n'est complète qu'à l'adolescence.

En réalité, la myélinisation et la maturation des oligodendrocytes sont deux processus indissociables. En effet, la myélinisation est un processus complexe qui implique des étapes de prolifération et de migration des OPC, de reconnaissance des axones *via* des signaux

glie-axone, de différenciation des OPC en oligodendrocytes matures avec un allongement des prolongements cellulaires, un enroulement des prolongements autour des axones, l'assemblage des composants membranaires, la compaction de la myéline et la formation des nœuds de Ranvier (Simons et Nave, 2015).

Pendant la période post-natale, la prolifération des OPC dépend de l'activité électrique des axones (Vargas et Barres, 2007). De plus, les oligodendrocytes sont maintenus en vie grâce à des signaux émanant de leurs contacts avec les axones (Barres *et al.*, 1993; Vargas et Barres, 2007). Ainsi, en l'absence de contact avec les axones, les oligodendrocytes meurent par apoptose (Vargas et Barres, 2007).

## **2. Les lésions de la substance blanche après un traumatisme crânien**

La SB est particulièrement vulnérable aux dommages post-TC. Ainsi, une atrophie et une perte de l'intégrité de cette dernière ont été observées chez les patients traumatisés crâniens (Armstrong *et al.*, 2016). Une étude menée sur 56 patients, pendant une période allant de 5 à 20 mois après un TC modéré à sévère, montre une atrophie du corps calleux chez environ 77% des patients (Green *et al.*, 2014). De plus, cette atrophie du corps calleux est souvent accompagnée d'une atrophie de l'ensemble du cerveau. Une étude clinique *post-mortem*, réalisée chez des patients ayant survécu de 1 an jusqu'à 18 ans après un TC, montre une dégénérescence chronique de la SB avec une diminution de 25% du volume du corps calleux (Johnson *et al.*, 2013a).

Les lésions de la SB sont de plus en plus reconnues comme étant responsables des déficits cognitifs et émotionnels observés chez les patients traumatisés crâniens. Ainsi, des anomalies du corps calleux et du fornix sont visualisées par IRM de diffusion (Diffusion Tensor Imaging ou DTI) chez des patients présentant des déficits cognitifs, mais sans lésions macroscopiques (visibles en radiologie) associées (Nakayama *et al.*, 2006). Des corrélations entre les atteintes de la SB et les perturbations de la conscience et les déficits comportementaux ont également été mises en évidence chez les patients (Wang *et al.*, 2018). De plus, selon la localisation des lésions de la SB, il est possible de prédire en clinique quels types de déficits cognitifs seront associés. Ainsi, des anomalies structurelles du fornix (faisceau de fibres qui unit l'hippocampe aux corps mamillaires) sont corrélées avec des déficits d'apprentissage et de mémoire, tandis que des anomalies des connections du lobe frontal sont corrélées avec une altération des fonctions exécutives (Kinnunen *et al.*, 2011).

Parmi les lésions de la SB, on trouve une mort des oligodendrocytes, des lésions axonales et une démyélinisation. Dans les modèles expérimentaux de TC, une démyélinisation est observée jusqu'à 3 mois après le TC (Flygt *et al.*, 2013; Taib *et al.*,

2017). Cette démyélinisation est associée à une accumulation du peptide A $\beta$  (signe de lésions axonales) et une mort des oligodendrocytes par apoptose (Flygt *et al.*, 2013).

## 2.1. La mort des oligodendrocytes

Après un TC, une mort des oligodendrocytes est décrite à la fois en clinique (Flygt *et al.*, 2016) et dans les modèles expérimentaux (Lotocki *et al.*, 2011; Flygt *et al.*, 2013; Dent *et al.*, 2015).

L'oligodendrocyte joue un rôle physiologique primordial dans le maintien de l'intégrité des axones. Toutefois, afin de produire de la myéline en quantité suffisante, les oligodendrocytes, d'une part, consomment beaucoup d'énergie et génèrent d'importantes quantités de métabolites toxiques et d'ERO, et d'autre part, ne peuvent produire que des quantités limitées de systèmes anti-oxydants endogènes pour faire face à ce stress oxydant (Dent *et al.*, 2015). Cette importante activité métabolique rend l'oligodendrocyte particulièrement vulnérable à l'hypoxie et au stress oxydant consécutifs à des dommages cérébraux (Bradl et Lassmann, 2009). Une mort des oligodendrocytes par apoptose est ainsi observée dans des pathologies associées à un stress oxydant, telles que l'ischémie cérébrale ou le TC (Bradl et Lassmann, 2009; Dent *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015).

D'autres mécanismes, comme la neuro-inflammation ou l'excitotoxicité, peuvent également être à l'origine d'une mort oligodendrocytaire (Bradl et Lassmann, 2009). Les cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-2 et l'IFN $\gamma$ , sont capables d'induire une mort des oligodendrocytes par apoptose (Shi *et al.*, 2015). Le TNF $\alpha$  empêche également la prolifération et la différenciation des OPC. Le rôle de l'IFN $\gamma$  est quant à lui plus complexe: à forte dose, il entraîne une mort oligodendrocytaire et une démyélinisation, alors qu'à faible dose, il protège les oligodendrocytes matures. Ces cytokines peuvent également contribuer à la mort des oligodendrocytes indirectement *via* la stimulation de la production d'ERO par les microglies M1 et les astrocytes (Bradl et Lassmann, 2009).

Tout comme les neurones, les oligodendrocytes possèdent des récepteurs au glutamate (AMPA, NMDA...) et à l'ATP extracellulaire (P2X7) qui les rendent sensibles au phénomène d'excitotoxicité (Bradl et Lassmann, 2009). Ainsi, il a été montré *in vitro* et *in vivo* que l'inhibition des récepteurs au glutamate réduit la mort oligodendrocytaire (Shi *et al.*, 2015).

Une étude clinique *post-mortem* a mis en évidence une mort des oligodendrocytes par apoptose, associée à une augmentation du nombre d'OPC, chez des patients ayant subi un TC sévère (Flygt *et al.*, 2016). De manière similaire, une étude expérimentale, réalisée dans un modèle de TC induit par ICC, a montré une mort par apoptose des oligodendrocytes de 48 heures à 2 semaines post-TC, et la prolifération des OPC de 48 heures à 3 mois, au niveau du corps calleux et de la capsule interne (Dent *et al.*, 2015).

## 2.2. Les lésions axonales

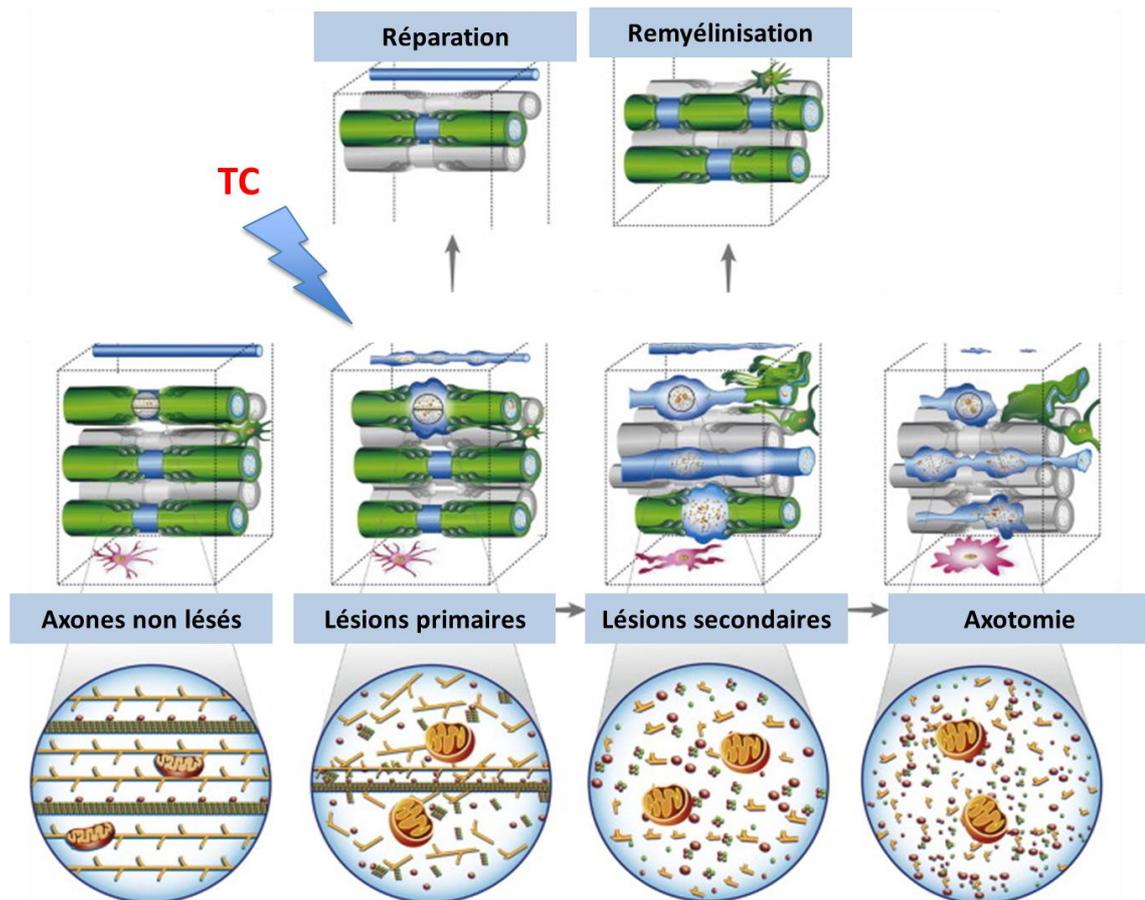
Les lésions axonales sont initiées au moment de l'impact mécanique par les phénomènes d'accélération/décélération, puis se développent de manière progressive. Elles peuvent aller d'une simple perturbation du transport axonal jusqu'à une rupture des axones et une dégénérescence axonale (Johnson *et al.*, 2013b). En raison de leur extension sur plusieurs régions de la SB, essentiellement au niveau du corps calleux, des interfaces entre la SB et la substance grise, et du tronc cérébral, on parle souvent de lésions axonales diffuses ou LAD (Flygt *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2013b).

Après interruption du transport axonal, une accumulation des métabolites transportés est à l'origine du gonflement des axones. Ce gonflement peut entraîner une rupture du cytosquelette, on parle alors d'axotomie secondaire. Plus rarement, des axotomies primaires, liées à l'étirement mécanique, peuvent également survenir immédiatement après l'impact (Johnson *et al.*, 2013b; Hill *et al.*, 2016).

Cette vulnérabilité des axones aux dommages mécaniques est confirmée dans des modèles *in vitro* d'étirement (stretch), consistant à appliquer une force mécanique (jet d'air contrôlé) sur des axones traversant les puits d'une culture de neurones (Johnson *et al.*, 2013b). De plus, il a été montré que les axones non myélinisés sont plus sensibles aux lésions post-TC que les axones myélinisés (Reeves *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2013b). Ces données suggèrent que la démyélinisation consécutive aux LAD pourrait à son tour favoriser la dégénérescence axonale.

Des cascades physiopathologiques secondaires contribuent également à l'amplification des lésions axonales. En effet, le dysfonctionnement mitochondrial, le stress oxydant, la peroxydation lipidique ou la perturbation de la balance ionique cellulaire sont autant de mécanismes pouvant être à l'origine de la souffrance que de la rupture axonale (Johnson *et al.*, 2013b). Ainsi, une augmentation des concentrations de calcium intracellulaire active les calpaïnes qui vont dégrader les neurofilaments du cytosquelette, tels que la spectrine.

Après la rupture du cytosquelette axonal, soit l'axone est réparé, ce qui implique le remplacement du cytosquelette endommagé (Figure 10), soit l'axone dégénère, on parle alors de dégénérescence Wallérienne (Johnson *et al.*, 2013b). Cette dernière consiste en une fragmentation de la partie distale à la lésion de l'axone (Hill *et al.*, 2016).



**Figure 10: Evolution des lésions axonales après un TC**

(adapté de Armstrong et al., 2016)

Les LAD peuvent être mises en évidence par différentes techniques ultrastructurelles et histologiques. À l'échelle ultrastructurelle, la microscopie électronique permet de détecter de manière précise et spécifique les atteintes axonales se traduisant par une altération du transport vésiculaire, un gonflement des mitochondries, une rupture du cytosquelette et/ou la présence de bulbes de rétraction en cas d'axotomie (Armstrong *et al.*, 2016). À côté de cela, les LAD sont souvent mises en évidence par des techniques histologiques (Johnson *et al.*, 2013b; Armstrong *et al.*, 2016; Hill *et al.*, 2016). En effet, elles se caractérisent par l'accumulation anormale de protéines pouvant être mise en évidence par immunohistochimie, il s'agit notamment du précurseur du peptide A $\beta$ ,  $\beta$ -APP (Johnson *et al.*, 2013b; Hill *et al.*, 2016). L'accumulation de cette glycoprotéine constitue une source potentielle du peptide A $\beta$ , dont les dépôts sont caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (Johnson *et al.*, 2013b). L'immunohistochimie peut également révéler la présence d'une forme altérée déphosphorylée des neurofilaments, une autre caractéristique histologique des atteintes axonales (Armstrong *et al.*, 2016).

Durant cette dernière décennie, le développement des techniques d'imageries (IRM), plus particulièrement le DTI, a considérablement amélioré la détection des lésions de la SB, y compris les LAD, que ce soit chez l'Homme ou l'animal (Kou *et al.*, 2014).

Sur le plan clinique, les LAD sont à l'origine de perte de conscience pouvant se manifester pendant la phase aiguë du TC, et elles contribuent également aux séquelles chroniques cognitives et motrices (Johnson *et al.*, 2013b). Ces lésions sont visualisées dès les premières heures après le TC, puis persistent des mois voire des années après (Johnson *et al.*, 2013a, b). Cette persistance des LAD conforte l'idée de leur implication dans le développement de maladies neurodégénératives suite à un TC, notamment lorsque ce dernier est répété au cours de pratiques sportives (Johnson *et al.*, 2013b).

### 2.3. La démyélinisation

La démyélinisation est définie comme une perte ou une destruction de la gaine de myéline. La myéline constitue, non seulement une barrière physique qui protège les axones, mais elle est également un élément indispensable à la propagation des influx nerveux et un support métabolique important pour les neurones (Armstrong *et al.*, 2016). Par conséquent, une démyélinisation entraîne un ralentissement de la conduction de l'influx nerveux pouvant se traduire cliniquement par des troubles sensoriels, moteurs et psychiques, ainsi que par des déficits cognitifs (Shi *et al.*, 2015).

Une démyélinisation est décrite dans de nombreux modèles expérimentaux de TC. Flygt et collaborateurs (2013) montrent une démyélinisation au niveau du corps calleux, de la capsule externe et du fimbria de l'hippocampe entre 2 et 21 jours dans un modèle de TC par percussion de fluide chez le rat. Au laboratoire, une diminution de la MBP est observée dès 7 jours jusqu'à 3 mois après un TC induit par ICC chez la souris (Taib *et al.*, 2017). Dans la même étude, il a également été observé, par microscopie électronique, des anomalies de la gaine de la myéline, incluant une fragmentation, une décompaction et un détachement, au niveau du corps calleux 3 mois après le TC.

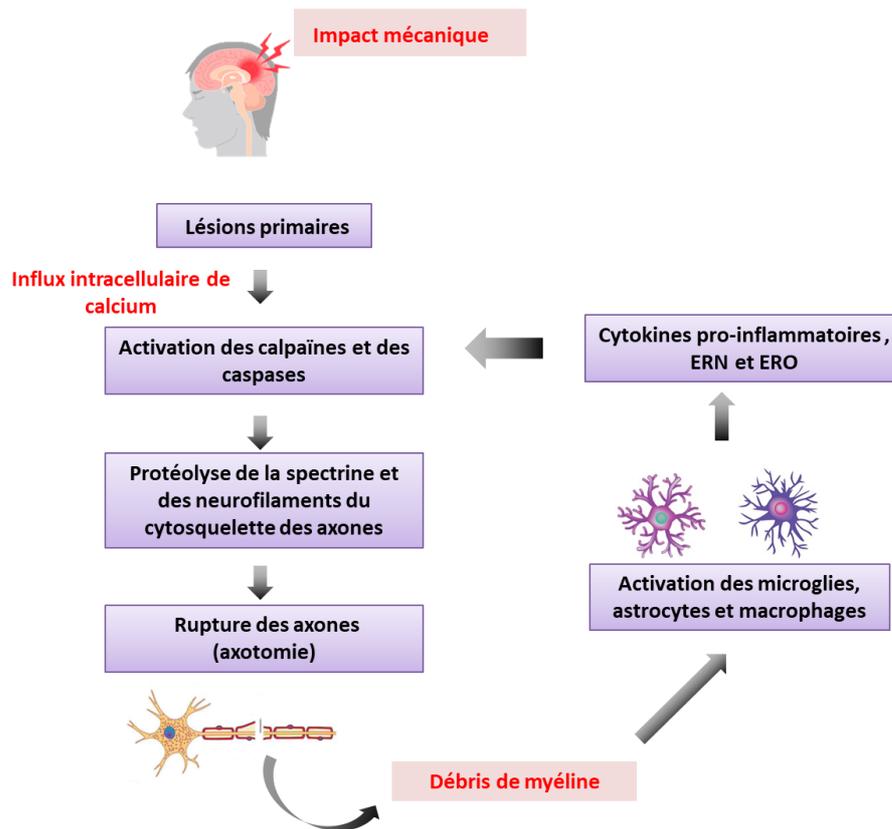
Le mécanisme à l'origine de cette démyélinisation semble complexe, car cette dernière concerne, non seulement des axones ayant subi des LAD, mais également des axones intacts. Une démyélinisation d'axones intacts a ainsi été visualisée par microscopie électronique 3 jours après un TC chez la souris (Mierzwa *et al.*, 2015). On peut donc en conclure que cette démyélinisation résulte des LAD, mais également d'autres mécanismes secondaires, notamment la mort des oligodendrocytes. Ces hypothèses sont confirmées par des données expérimentales montrant que la démyélinisation est souvent associée aux LAD et à la mort des oligodendrocytes (Flygt *et al.*, 2013; Mierzwa *et al.*, 2015).

Par ailleurs, il est important de distinguer la démyélinisation des axones intacts de celle des axones endommagés, car seuls les axones intacts peuvent être remyélinisés par les oligodendrocytes (Armstrong *et al.*, 2016). Ainsi, l'étude de Mierzwa et collaborateurs (2015) montre que les axones intacts démyélinisés, visualisés par microscopie électronique 3 jours post-TC, sont remyélinisés au bout d'une semaine. De plus, cette remyélinisation est associée à une augmentation de la prolifération des OPC. Une prolifération des OPC suite à la démyélinisation a également été décrite dans d'autres études expérimentales et cliniques de TC (Flygt *et al.*, 2013, 2016).

### **3. Conséquences des lésions de la substance blanche sur la polarisation microgliale**

Les données expérimentales, *in vitro* et *in vivo*, montrent l'implication de l'activation microgliale en phénotype M1 dans la mort des oligodendrocytes et la démyélinisation à la suite d'un TC (voir le paragraphe « 5.4.1. Conséquences de l'activation aiguë et subaiguë de la microglie » du « Chapitre II: La neuro-inflammation post-traumatique »). De plus, des études cliniques montrent que l'activation microgliale chronique est associée à une dégénérescence de la SB (voir le paragraphe « 5.4.2. Conséquences de l'activation chronique de la microglie » du « Chapitre II: La neuro-inflammation post-traumatique »). Par ailleurs, une corrélation spatio-temporelle entre l'activation microgliale et les lésions axonales est mise en évidence dans un modèle expérimental de TC par percussion de fluide chez le rat (Kelley *et al.*, 2007). En effet, les cytokines pro-inflammatoires, libérées massivement à la suite d'un TC, peuvent initier des cascades d'évènements aboutissant à la destruction du cytosquelette des axones, à la dégradation de la gaine myéline et à la mort des oligodendrocytes. Ces événements incluent une augmentation de l'expression des métalloprotéinases et de la NOS2, une augmentation du stress oxydant, une activation des calpaïnes et l'induction de la mort des oligodendrocytes par apoptose (Yang *et al.*, 2011).

Réciproquement, il a été suggéré que les lésions de la SB pourraient à leur tour amplifier la neuro-inflammation, créant ainsi un cercle vicieux (Figure 11; Yang *et al.*, 2011; Armstrong *et al.*, 2016). En effet, les axones endommagés subissent une dégénérescence Wallérienne qui s'accompagne de la génération de débris de myéline (Armstrong *et al.*, 2016). Un détachement de fragments de la gaine de myéline peut également être observé sur des axones intacts (Mierzwa *et al.*, 2015; Taib *et al.*, 2017). Ces débris de myéline pourraient inhiber la régénération axonale et amplifier la neuro-inflammation délétère (Yang *et al.*, 2011; Armstrong *et al.*, 2016).



**Figure 11: Hypothèse du « cercle vicieux » entre les lésions de la SB et la neuro-inflammation** (adapté de Yang *et al.*, 2011)

*Abréviations: ERN, espèce réactive nitrée; ERO, espèce réactive oxygénée*

### 3.1. Mise en évidence des débris de myéline après un traumatisme crânien

Peu de recherches se sont intéressées à l'étude de l'accumulation des débris de myéline à la suite d'un TC. Les données de la littérature proviennent essentiellement d'études sur la sclérose en plaques, une affection neurologique chronique démyélinisante d'origine auto-immune (Clarner *et al.*, 2012; Ponath *et al.*, 2017). Néanmoins, dans des modèles expérimentaux de TC chez le rat, des débris de myéline sont visualisés à partir de 7 jours et persistent jusqu'à 28 jours (Kelley *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2014). De plus, des microglies contenant des débris de myéline sont également observées après le TC (Kelley *et al.*, 2007).

Contrairement au système nerveux périphérique, l'élimination des débris dans le SNC est beaucoup plus lente et ces derniers peuvent ainsi être visualisés des mois voire des années après la dégénérescence Wallérienne chez l'Homme (Miklossy et Van der Loos, 1991; Varga et Barres, 2007). Au niveau du système nerveux périphérique, les débris de

myéline sont éliminés, d'une part, par les cellules de Schwann (cellules myélinisantes), et d'autre part, par les macrophages après opsonisation (Varga et Barres, 2007). Cette dernière consiste à recouvrir les débris de myéline par des opsonines d'origine sérique, tels que les Ac et les protéines du complément, afin de faciliter leur élimination par les macrophages, qui possèdent des récepteurs pour ces opsonines. La BHE limite fortement le passage des opsonines dans le SNC, et par conséquent, limite la phagocytose des débris de myéline par les macrophages et les microglies résidentes du SNC (Varga et Barres, 2007).

## 3.2. Effets délétères des débris de myélines

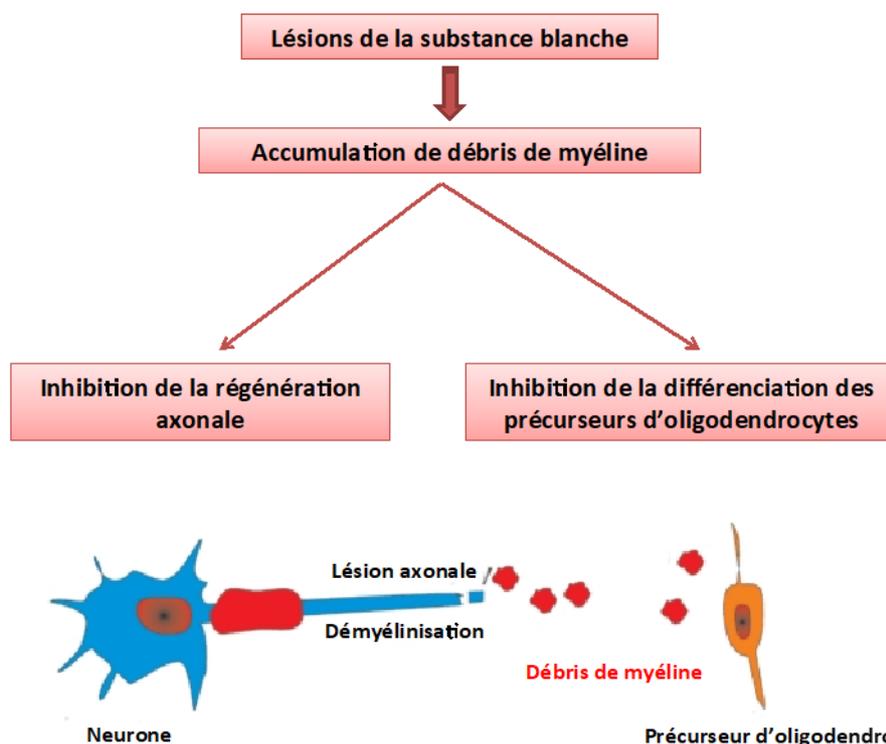
### 3.2.1. Inhibition de la régénération axonale et de la remyélinisation

Les débris de myéline contiennent des molécules, telles que la MAG, le NogoA et la OMgp (Oligodendrocyte-Myelin glycoprotein), capable d'inhiber la croissance neuronale et la régénération axonale (Figure 12; Geoffroy et Zheng, 2014). Ainsi, dans des modèles expérimentaux de pathologies démyélinisantes, telles que la sclérose en plaques, une élimination efficace des débris de myéline est souvent associée à une meilleure régénération axonale, tandis que son inefficacité est à l'origine d'une altération de la réparation axonale et de la remyélinisation (Vargas et Barres, 2007; Neumann *et al.*, 2009).

Des effets délétères sur la différenciation des OPC sont également observés avec les débris de myéline (Figure 12). Ainsi, la présence de débris de myéline, après démyélinisation focale chez le rat, altère la remyélinisation en inhibant la différenciation des OPC (Kotter *et al.*, 2006). *In vitro*, la myéline inhibe de manière réversible et dose-dépendante la différenciation des OPC en oligodendrocytes matures (Robinson et Miller, 1999).

Dans un modèle expérimental de sclérose en plaques, une étude récente montre que la stimulation de la remyélinisation par électroacupuncture est associée à une augmentation de l'élimination des débris de myéline (Zhu *et al.*, 2017). De plus, il a été montré que la microglie jouait un rôle primordial dans cette élimination des débris de myéline. Ainsi, un défaut d'élimination des débris de myéline et de remyélinisation sont observés chez des souris KO CX3CR1<sup>-/-</sup> par rapport aux souris sauvages, après démyélinisation avec la cuprizone (Lampron *et al.*, 2015).

L'ensemble de ces données montre donc l'importance de l'élimination des débris de myéline, afin de favoriser la régénération axonale et la remyélinisation.



**Figure 12: Effet des débris de myéline sur la régénération axonale et la remyélinisation**  
(adapté de Neumann *et al.*, 2009)

### 3.2.2. Amplification de la neuro-inflammation: action sur la polarisation microgliale

Contrairement au phénotype microglial M2, le phénotype M1 persiste plus longtemps après le TC (voir le paragraphe « 5.3. Polarisation microgliale après un traumatisme crânien » du « Chapitre II: La neuro-inflammation post-traumatique »). Ceci pourrait notamment être expliqué par la présence dans l'environnement cérébral post-TC de facteurs, tels que les débris de myéline, pouvant maintenir ou amplifier ce phénotype pro-inflammatoire M1, comme cela a été supposé par Yang et collaborateurs (2011). Bien que la présence de débris de myéline soit décrite comme un phénomène délétère et pro-inflammatoire dans les pathologies démyélinisantes, telles que la sclérose en plaques, sa contribution à la neuro-inflammation post-TC est moins claire.

Une étude s'est ainsi intéressée au lien entre l'activation des microglies/macrophages et les lésions axonales, caractérisées par l'accumulation du peptide A $\beta$  ou la présence d'axotomies et de gonflements axonaux, pendant les phases aiguë (6-24h), subaiguë (2 jours) et chronique (7-28 jours), dans un modèle expérimental de TC par percussion de fluide chez le rat (Kelley *et al.*, 2007). L'activation microgliale/macrophagique est limitée aux zones où sont observées les lésions axonales (cortex, hippocampe et thalamus). De plus,

les microglies présentes dans les régions saines sont quiescentes et aucune infiltration macrophagique n'est observée dans ces régions. Une interaction entre ces cellules et les axones lésés est visualisée par microscopie confocale et électronique. Bien que l'implication directe ne soit pas établie, cette étude suggère un lien entre les débris de myéline et l'activation microgliale/macrophagique. De plus, dans une autre étude, une activation microgliale est encore détectée dans le corps calleux, où prédominent les atteintes axonales, 6 semaines après un TC chez la souris (Mierzwa *et al.*, 2015).

L'implication directe des débris de myéline dans la neuro-inflammation a été essentiellement étudiée *in vitro*, sur des cultures de microglies et de macrophages, et *in vivo*, dans des modèles expérimentaux de sclérose en plaques et de lésion de la moelle épinière. Dans un modèle expérimental de sclérose en plaques chez la souris, la démyélinisation coïncide avec l'activation microgliale (Clarner *et al.*, 2012). De plus, l'injection stéréotaxique d'une préparation de débris de myéline dans le corps calleux, ou le cortex, induit une accumulation massive de microglies et de macrophages. L'injection de cette préparation dans la moelle épinière de souris entraîne une infiltration leucocytaire et macrophagique (Sun *et al.*, 2010). La myéline, *via* le récepteur CR3 (Complement Receptor 3), induit une activation de la voie FAK (Focal adhesion kinase)/PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B à l'origine d'une production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages.

Après lésion de la moelle épinière chez la souris, une accumulation de macrophages spumeux (dits « foamy macrophages »), c'est-à-dire chargés de lipides, est observée dans la zone lésée jusqu'à 4 semaines (Wang *et al.*, 2015b). Ces macrophages spumeux sont mis en évidence par une coloration avec le Oil Red'O (ORO), un colorant qui marque les lipides intracellulaires neutres de la myéline, tels que le cholestérol estérifié, sans marquer la myéline intacte du SNC. De plus, la microscopie électronique confirme que ces macrophages contiennent bien de la myéline à différents stades de dégradation. Par ailleurs, la disparition du phénotype M2 coïncide avec l'accumulation des lipides marqués avec le colorant ORO. *In vitro*, l'incubation de macrophages de phénotype M2 avec des débris de myéline entraîne non seulement une diminution de l'expression protéique des marqueurs M2, arginase 1 et YM1, mais également une augmentation de l'expression protéique du marqueur M1, NOS2. Ces macrophages incubés avec la myéline perdent également leur mobilité et leur capacité à phagocyter les corps apoptotiques. De plus, le milieu conditionné, provenant de ces macrophages incubés avec la myéline, inhibe la différenciation des OPC. Les résultats de cette étude suggèrent donc que la phagocytose des débris de myéline par les macrophages pourrait être à l'origine d'une polarisation en phénotype pro-inflammatoire M1.

L'étude *in vitro* de Pinteaux-Jones et collaborateurs (2008) montre que l'incubation de débris de myéline avec des microglies entraîne une activation de ces dernières avec une

induction de la NOS2, et une sécrétion de TNF $\alpha$  et de glutamate. De plus, le traitement de cultures de neurones avec un milieu conditionné, provenant de cultures de microglies traitées avec les débris de myéline, induit une mort cellulaire qui semble être liée à l'activation des récepteurs mGLUR.

Des études suggèrent que cette réponse pro-inflammatoire induite par les débris de myéline pourrait être liée à l'activation de voies de signalisation par des composants de la myéline, tels que le sulfatide, la MOG ou encore le peptide Nogo. Ainsi, le sulfatide ou galactocérébroside sulfaté stimule *in vitro* la production de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de NO par des cellules microgliales (Jeon *et al.*, 2008). Cet effet pro-inflammatoire résulte de l'activation de la voie des MAP kinases et des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 (Activator Protein 1). Dans cette même étude, le galactocérébroside non sulfaté et la MOG sont sans effet. Toutefois, une étude réalisée par Johns et Bernard (1997) montre la capacité de la MOG à se lier de manière dose-dépendante au facteur du complément C1q, pouvant ainsi initier une réponse inflammatoire complément-dépendante. Le peptide Nogo, connu pour ses propriétés inhibitrices de la croissance axonale, pourrait également être impliqué dans la neuro-inflammation. En effet, la microglie possède à sa surface le récepteur de ce peptide (Nogo Receptor ou NgR); ce dernier intervient dans la régulation des fonctions d'adhésion et de migration (Fang *et al.*, 2015). Il a été montré que la stimulation *in vitro* de NgR induit l'expression des enzymes NOS2 et COX2, ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires et de NO par la microglie.

Pour résumer, les données de la littérature mettent en évidence, d'une part, la capacité des débris de myéline à induire, *in vitro* et *in vivo*, une activation microgliale en phénotype pro-inflammatoire M1, et d'autre part, une corrélation spatio-temporelle entre cette activation microgliale et les atteintes axonales observées à la suite d'un TC. Toutefois, aucun lien entre la présence de débris de myéline et la neuro-inflammation post-TC n'est établi de manière directe. De plus, les travaux de Boven et collaborateurs (2006), décrivant un profil plutôt anti-inflammatoire des macrophages spumeux (chargés de myéline) *in vitro* et sur des échantillons *post-mortem* de patients atteints de sclérose en plaques, remettent en cause l'hypothèse d'un effet exclusivement délétère des débris de myéline après un TC.

***L'importance de la contribution des lésions de la SB aux séquelles aiguës et chroniques du TC est maintenant bien reconnue. Bien que les mécanismes à l'origine de ces lésions ne soient pas totalement élucidés, la neuro-inflammation, plus particulièrement l'activation microgliale, semble y jouer un rôle crucial. En réalité, les lésions de la SB et la neuro-inflammation sont deux phénomènes qui pourraient s'amplifier mutuellement. Ainsi, les débris de myéline générés pourraient moduler l'activation microgliale. La compréhension du rôle des débris de myéline dans l'orientation phénotypique de la microglie est nécessaire pour le développement de stratégies neuroprotectrices, visant à moduler la neuro-inflammation en vue de réduire les lésions de la SB après un TC.***

## CHAPITRE IV: LA POLY(ADP-RIBOSE)POLYMÉRASE

### 1. Généralités

Les cellules sont constamment exposées à divers stress génotoxiques à l'origine de cassures de l'ADN, dont la détection et la réparation est indispensable au maintien de l'intégrité génomique. Un des éléments majeurs nécessaire à ce processus de réparation est la poly(ADP-ribose)polymérase-1 ou PARP-1.

Les PARP constituent une superfamille d'enzymes ubiquitaires qui catalysent le transfert d'unités d'ADP-ribose (Adénosine DiPhosphate-ribose) sur des protéines cibles. Ce processus physiologique réversible est désigné sous le nom d'ADP-ribosylation. En fonction du nombre d'unités d'ADP-ribose fixées, on distingue des mono- ou des poly-(ADP-ribosyl)ation (encore appelée PARylation). La première description de cette activité d'ADP-ribosylation remonte à 1963 avec l'identification de la PARP-1 et de son rôle dans la réparation de l'ADN. D'autres enzymes ont ensuite été identifiées, et aujourd'hui, la famille PARP compte 17 membres, qui peuvent être classés en fonction (1) de leur homologie de structure (classification structurelle) ou (2) de leur fonction, avec notamment l'activité de PARylation (classification fonctionnelle) (Tableau VI; Schreiber *et al.*, 2006; Riffell *et al.*, 2012; Morales *et al.*, 2014; Sriram *et al.*, 2014; Bai, 2015; Ray Chaudhuri et Nussenzweig, 2017; Schuhwerk *et al.*, 2017).

**Tableau VI: Classification des 17 membres de la famille PARP**

Classification structurelle	Classification fonctionnelle
- <b><u>PARP dépendantes de l'ADN:</u></b> PARP-1, 2 et 3.	- <b><u>PARP ayant une activité de PARylation:</u></b> PARP-1, 2, 3, 4 et 5.
- <b><u>Tankyrases:</u></b> Tankyrase 1 (PARP-5a) et 2 (PARP-5b).	- <b><u>PARP ayant une activité de mono(ADP-ribosyl)ation:</u></b> PARP-6-8, 10-16.
- <b><u>PARP à doigt de zinc CCCH:</u></b> PARP-7 (tiPARP), 12 et 13.	- <b><u>PARP considérées inactives:</u></b> PARP-9 et 13.
- <b><u>macroPARP:</u></b> PARP-9, 14 et 15.	
- <b><u>autres PARP:</u></b> PARP-4 (v-PARP), 6, 8, 10, 11 et 16.	

La PARP-1 est le membre le plus important et le plus abondant de la famille PARP. En effet, la PARP-1 assure, à elle seule, 85 à 90% de l'activité totale de PARylation. La PARP-2

est ensuite à l'origine de 10 à 15% de l'activité totale, alors que la contribution des autres enzymes reste négligeable (Bai, 2015; Ray Chaudhuri et Nussenzweig, 2017).

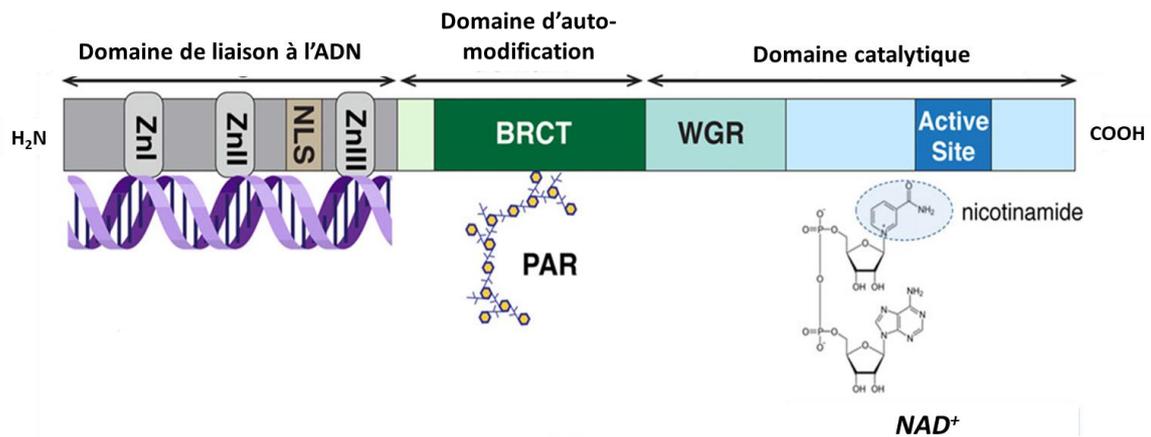
### 1.1. Structure de la PARP-1

La PARP-1 est une protéine nucléaire de 116 kDa présente chez tous les eucaryotes à l'exception des levures. Sa structure comporte trois domaines majeurs: un domaine de liaison à l'ADN, un domaine d'auto-modification et un domaine catalytique (Figure 13; Altmeyer *et al.*, 2009; Sodhi *et al.*, 2010; Ray Chaudhuri et Nussenzweig, 2017).

- **Le domaine de liaison à l'ADN** est situé dans la partie N-terminale de la protéine. Il est composé de 3 motifs en doigt de zinc ZnI, ZnII et ZnIII, capables de reconnaître et de se lier aux cassures simples et doubles brins de l'ADN. Ce domaine comporte également un motif de signal de localisation nucléaire NLS (Nuclear Localisation Signal), permettant la localisation nucléaire de la PARP-1, et contenant le site de clivage de la PARP-1, par les caspases 3 et 7 au cours de l'apoptose.

- **Le domaine d'auto-modification** est situé dans la partie centrale de la protéine. Ce domaine contient le motif BRCT (breast cancer type 1 susceptibility protein ou BRCA1 C-terminus) qui assure l'interaction de la PARP-1 avec les motifs homologues présents sur les protéines nucléaires, comme les histones. Ce domaine fut initialement identifié comme étant le site de fixation des PAR pour une auto-PARYlation, permettant la régulation négative de l'activité de la PARP. Par ailleurs, ce domaine contient un motif LZ (Leucine Zipper), impliqué dans l'homo- et/ou l'hétérodimérisation de la PARP-1.

- **Le domaine catalytique** est situé dans partie C-terminale de la protéine. Il s'agit du domaine le plus conservé de la famille PARP. Il contient une séquence WGR, particulièrement riche en tryptophane (W), glycine (G) et arginine (R), jouant un rôle dans le changement conformationnel indispensable à l'activation de l'enzyme. Ce domaine contient le site catalytique de liaison au NAD<sup>+</sup> (Nicotinamide Adénine Dinucléotide), le substrat de la PARP. Le domaine catalytique est impliqué dans l'initiation, puis l'élongation du branchement des PAR.



**Figure 13: Représentation schématique de la structure de la PARP-1**

(adapté de Berger *et al.*, 2018)

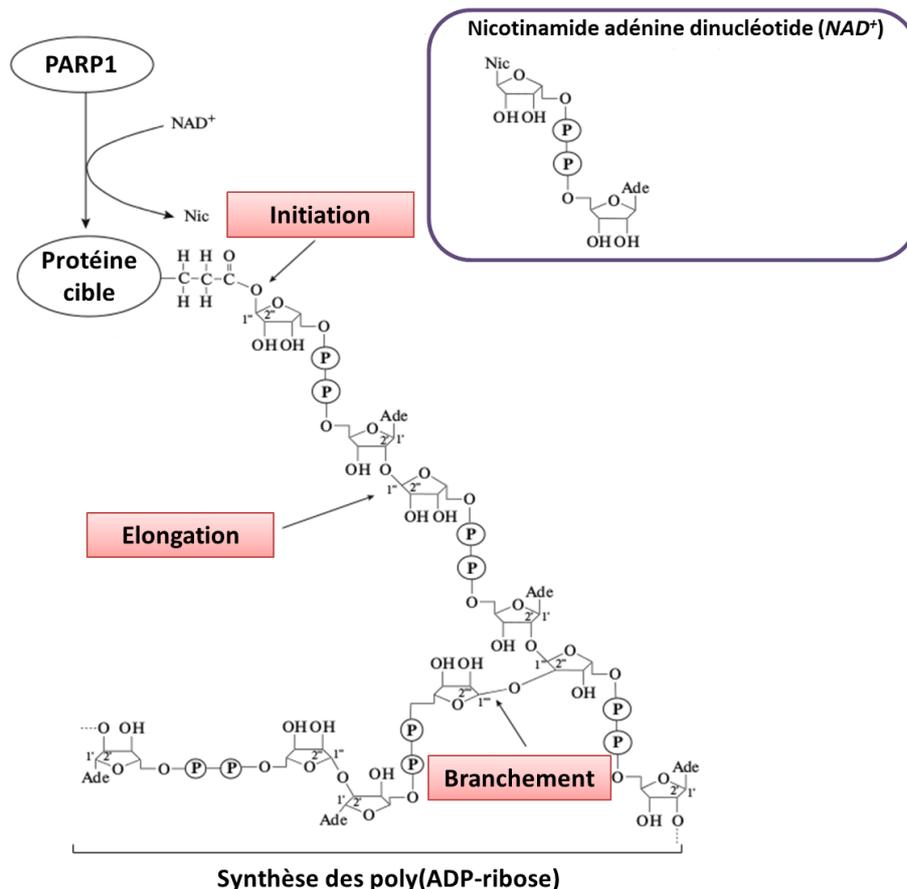
*Abréviations: ADN, acide désoxyribonucléique; BRCT, breast cancer type 1 susceptibility protein; NAD<sup>+</sup>, nicotinamide adénine dinucléotide; NLS, nuclear localisation signal; PAR, poly(ADP-ribose); WGR, tryptophane (W), glycine (G) et arginine (R); Zn, motif en doigt de zinc*

## 1.2. Déroulement et régulation physiologique de la PARylation

La PARylation consiste à synthétiser des PAR et à les greffer sur les protéines acceptrices. Il s'agit d'une modification post-traductionnelle intervenant dans de nombreux processus physiologiques, notamment la réparation de l'ADN, la transcription génique, la réplication cellulaire, l'apoptose, la dégradation des protéines par ubiquitination et la régulation de l'activité des télomères (Sodhi *et al.*, 2010; Gibson et Kraus, 2012; Bai, 2015). Cette PARylation est plus importante en présence de cassures de l'ADN. En effet, les sites catalytiques des enzymes PARP-1, 2 et 3 sont activés après interaction de l'enzyme avec des cassures simples ou doubles brins de l'ADN, et l'activité de la PARP-1 est ainsi 500 fois plus importante (Gibson et Kraus, 2012; Sriram *et al.*, 2014; Pascal et Ellenberger, 2015; Schuhwerk *et al.*, 2017). Par ailleurs, la PARP-1 peut être activée par des modifications post-transcriptionnelles, telles que l'acétylation ou la phosphorylation par des protéines kinases (Sriram *et al.*, 2014).

Une fois activée, la PARP clive le NAD<sup>+</sup> en nicotinamide et résidu ADP-ribose, puis la PARylation se déroule en trois étapes: l'initiation, l'élongation, puis le branchement des PAR sur les protéines cibles (Figure 14). L'initiation consiste en la formation d'une liaison covalente ester entre un premier résidu d'ADP-ribose et un résidu de glutamine, d'aspartate ou de lysine des protéines acceptrices. Ces dernières incluent essentiellement les histones, les facteurs de transcription et les PARP elles-mêmes (Sodhi *et al.*, 2010; Gupte *et al.*, 2017;

Schuhwerk *et al.*, 2017). Après cette étape de mono(ADP-ribosyl)ation, les polymères de PAR sont générés par des mécanismes simultanés d'élongation et de branchement. L'élongation aboutit à la formation d'une chaîne linéaire d'ADP-riboses reliés par des liaisons O-glycosidique de type  $\alpha(1\rightarrow2)$ . Des branchements sont observés en moyenne toutes les 20 à 50 réactions d'élongation et donnent naissance à des ramifications sur la chaîne linéaire. Les polymères ainsi formés sont chargés négativement et peuvent contenir jusqu'à 200 unités d'ADP-riboses (Gibson et Kraus, 2012).



**Figure 14: Etapes de synthèse des PAR** (adapté de Khodyreva et Lavrik, 2016)

*Abréviations: ADP, adénosine diphosphate; NAD<sup>+</sup>, nicotinamide adénine dinucléotide; PARP, poly(ADP-ribose)polymérase*

La production des PAR est finement contrôlée dans la cellule. Tout d'abord, l'activité de la PARP est modulée par des modifications post-traductionnelles, incluant l'auto(ADP-ribosyl)ation, la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitination (Gibson et Kraus, 2012; Schuhwerk *et al.*, 2017). Des facteurs endogènes et exogènes, tels que les estrogènes, les hormones thyroïdiennes, la forme active de la vitamine D, les polyamines, les purines et les métabolites de la caféine, sont également capables de moduler l'activité de

la PARP-1 (Sodhi *et al.*, 2010; Ray Chaudhuri et Nussenzweig, 2017). Par ailleurs, les PAR formés ont une demi-vie très courte (moins de 1 minute), en raison de la mise en place d'un système de dégradation immédiatement après leur synthèse. L'enzyme impliquée la plus importante est la PARG (Poly(ADP-Ribose)Glycohydrolase). La PARG est une endo- et exoglycohydrolase présente chez tous les mammifères. Elle existe sous trois isoformes: deux à localisation cytosolique (PARG<sub>99</sub> et PARG<sub>102</sub>) et une nucléaire (PARG<sub>110</sub>). Par son activité endoglycosidique, la PARG clive les polymères en oligomères après hydrolyse des liaisons glycosidiques internes. Par son activité exoglycosidique, la PARG libère des résidus d'ADP-ribose après hydrolyse des liaisons glycosidiques terminales des polymères ou des oligomères (Gibson et Kraus, 2012; Schuhwerk *et al.*, 2017). D'autres enzymes, telles que l'ADP-ribose hydrolase 3 (ARH3) et l'ADP-ribose glycohydrolase 1 (TARG1 ou Terminal ADP-Ribose protein Glycohydrolase 1), sont également impliquées dans la dégradation des PAR.

Cette régulation physiologique de la PARylation est extrêmement importante pour le maintien de la survie cellulaire.

### 1.3. Conséquences physiologiques de la PARylation

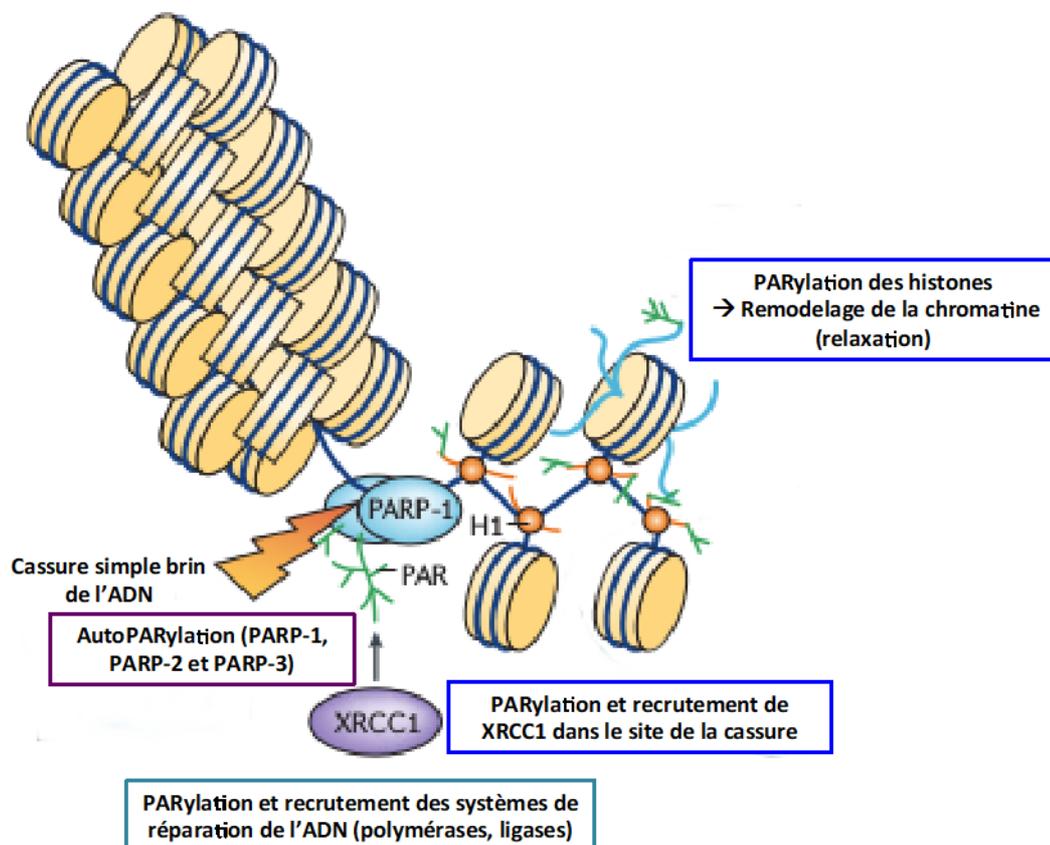
L'encombrement stérique et les charges négatives des polymères de PAR affectent considérablement le fonctionnement des protéines cibles sur lesquelles ils ont été greffés. En raison de la diversité des cibles protéiques (histones, facteurs de réplication, facteurs de transcription, molécules de signalisation intracellulaires...), la PARylation intervient dans de nombreux phénomènes physiologiques, incluant notamment la réparation de l'ADN, la division cellulaire et la transcription génique.

#### 1.3.1. Réparation de l'ADN

L'ADN est constamment soumis à des agressions génotoxiques de nature chimique ou physique, à l'origine de cassures simple ou double brin et d'anomalies de réplication.

Le rôle de la PARP-1 dans la réparation de l'ADN et le maintien de la stabilité génomique est aujourd'hui bien documenté (Schreiber *et al.*, 2006; Sodhi *et al.*, 2010; Gibson et Kraus, 2012; Caldecott, 2014; Sriram *et al.*, 2014; Bai, 2015; Pascal et Ellenberger, 2015; Khodyreva et Lavrik, 2016; Ray Chaudhuri et Nussenzweig, 2017; Schuhwerk *et al.*, 2017). La PARP-1 détecte et participe à la réparation de divers types de dommages génomiques, incluant les cassures simple ou double brin et les bases endommagées. Il a ainsi été montré que les souris KO PARP-1<sup>-/-</sup> sont très sensibles aux agents génotoxiques (Gupte *et al.*, 2017).

Quand la PARP-1 détecte une cassure de l'ADN, elle s'active en se liant à l'ADN par ses motifs en doigt de zinc. Son activation consiste en son auto-PARylation et la PARylation d'autres protéines nucléaires adjacentes, telles que les histones (H1 et H2B) et la protéine d'échafaudage XRCC1 (X-Ray Repair Cross Complementing Protein 1). Cette PARylation a pour objectif le recrutement, puis l'accumulation des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. L'encombrement stérique et les répulsions électrostatiques entre les histones PARylés et l'ADN conduit à un remodelage de la chromatine avec un passage d'une forme super-enroulée à une forme relaxée (Figure 15). Ce remodelage facilite l'accès des systèmes de réparation au niveau de la cassure d'ADN (Schreiber *et al.*, 2006; Sodhi *et al.*, 2010; Gisbon et kraus, 2012).



**Figure 15: Mécanisme de réparation des cassures simple brin de l'ADN**

(adapté de Schreiber *et al.*, 2006)

*Abréviations: ADN, acide désoxyribonucléique; H, histone; PAR, poly(ADP-ribose); PARP, poly(ADP-ribose)polymérase; XRCC1, X-Ray Repair Cross Complementing Protein 1*

La réparation des cassures d'ADN est indispensable au maintien de la stabilité génomique, notamment au cours de la réplication cellulaire. La létalité embryonnaire résultant de la délétion génique simultanée des PARP-1 et 2 montre l'importance de la PARylation dans les processus de réparation de l'ADN et de la survie cellulaire.

### 1.3.2. Régulation de la transcription génique

Dans un premier temps, le remodelage de la chromatine sous l'action de la PARylation, au moment de la réparation de l'ADN, a été associé à des modifications épigénétiques. Par la suite, il a été décrit que la PARylation jouait un rôle important dans la régulation de la transcription génique dans les conditions physiologiques en l'absence de cassures de l'ADN (Schreiber *et al.*, 2006). La PARP activée module la transcription génique par deux mécanismes principaux:

- **Le remodelage de la chromatine par PARylation des histones:** un relâchement de la chromatine, tel que celui observé au moment de la réparation de l'ADN, est tout aussi nécessaire pour la transcription des gènes.
- **L'interaction directe avec les facteurs de transcription et/ou leurs cofacteurs:** cette interaction n'implique pas forcément l'activité de PARylation de la PARP et est à l'origine de la stimulation de nombreux facteurs de transcription, tels que NF- $\kappa$ B qui intervient dans la transcription de nombreux gènes de la réponse inflammatoire.

### 1.3.3. Contrôle de la division cellulaire

Un des arguments en faveur de l'implication de la PARylation dans le contrôle de la division cellulaire est la localisation des PARP-1 et 2 au niveau des centromères, où elles peuvent interagir avec les protéines kinétochores impliquées dans la division cellulaire. La délétion du gène de la PARP-2 chez la souris est associée à des altérations de ségrégation chromosomique (Schreiber *et al.*, 2006). Il est également décrit un rôle des PAR dans le contrôle de l'organisation des protéines des microtubules au cours de la mitose.

## 2. Conséquences délétères de l'hyperactivation de la PARP dans le traumatisme crânien

Tout comme la neuro-inflammation, la PARP peut être considérée comme une « arme à double tranchant » dans les pathologies du SNC. En effet, dans les conditions physiologiques, l'activité de la PARP est finement contrôlée et joue un rôle bénéfique indispensable à la survie cellulaire, alors que dans certaines situations pathologiques associées à des dommages importants de l'ADN, la PARP est hyperactivée et joue un rôle délétère.

### 2.1. Hyperactivation de la PARP après un traumatisme crânien

Plusieurs événements physiopathologiques post-TC (libération excessive de glutamate, perturbation ionique, dysfonctionnement mitochondrial et neuro-inflammation) contribuent à

un stress oxydant et nitrant important. L'anion ONOO<sup>-</sup>, résultant de la combinaison du NO avec l'anion O<sub>2</sub><sup>-</sup>, est capable d'induire de nombreuses cassures de l'ADN, comme cela a été observé dans des modèles expérimentaux de TC (LaPlaca *et al.*, 1999; Satchell *et al.*, 2003; Sriram *et al.*, 2014). Il a été montré que ces cassures conduisaient à une hyperactivation de la PARP aussi bien chez l'animal que chez l'Homme à la suite d'un TC (Besson *et al.*, 2003b; Besson, 2009). Une augmentation des protéines PARylées est également observée entre 24 et 48 heures dans le LCR d'enfants ayant subi un TC (Fink *et al.*, 2008).

Expérimentalement, une augmentation de l'activation de la PARP est détectée dès 30 minutes après le TC et cette activation persiste jusqu'à 3 jours (LaPlaca *et al.*, 1999; Besson *et al.*, 2003a; Satchell *et al.*, 2003; Besson, 2009). De plus, une co-localisation de la 3-nitrotyrosine, un marqueur de stress nitrant, et des PAR est observée par immunohistochimie dans un modèle de TC par percussion de fluide (Besson *et al.*, 2003a).

## **2.2. Conséquences délétères de l'hyperactivation de la PARP dans le traumatisme crânien**

L'hyperactivation de la PARP conduit à une mort cellulaire et aggrave les lésions secondaires post-TC. Ces effets délétères de la PARP sont largement démontrés dans les modèles expérimentaux, grâce à l'inhibition pharmacologique de la PARP et/ou l'utilisation de souris KO PARP-1<sup>-/-</sup>. Les inhibiteurs de la PARP entraînent ainsi des effets neuroprotecteurs avec une diminution de la perte neuronale par apoptose, du volume de la lésion et des déficits neurologiques post-TC (LaPlaca *et al.*, 2001; Besson *et al.*, 2003a, 2005b; Satchell *et al.*, 2003; Stoica *et al.*, 2014 ). Par ailleurs, l'inhibition de la PARP améliore l'efficacité de la transplantation de cellules souches neurales après un TC (Lacza *et al.*, 2003). Ainsi, l'inhibition de la PARP, par le PJ34 (N-(6-oxo-5,6-dihydrophénanthridin-2-yl)-N,N-diméthylacétamide), augmente la survie des cellules transplantées et permet une récupération fonctionnelle.

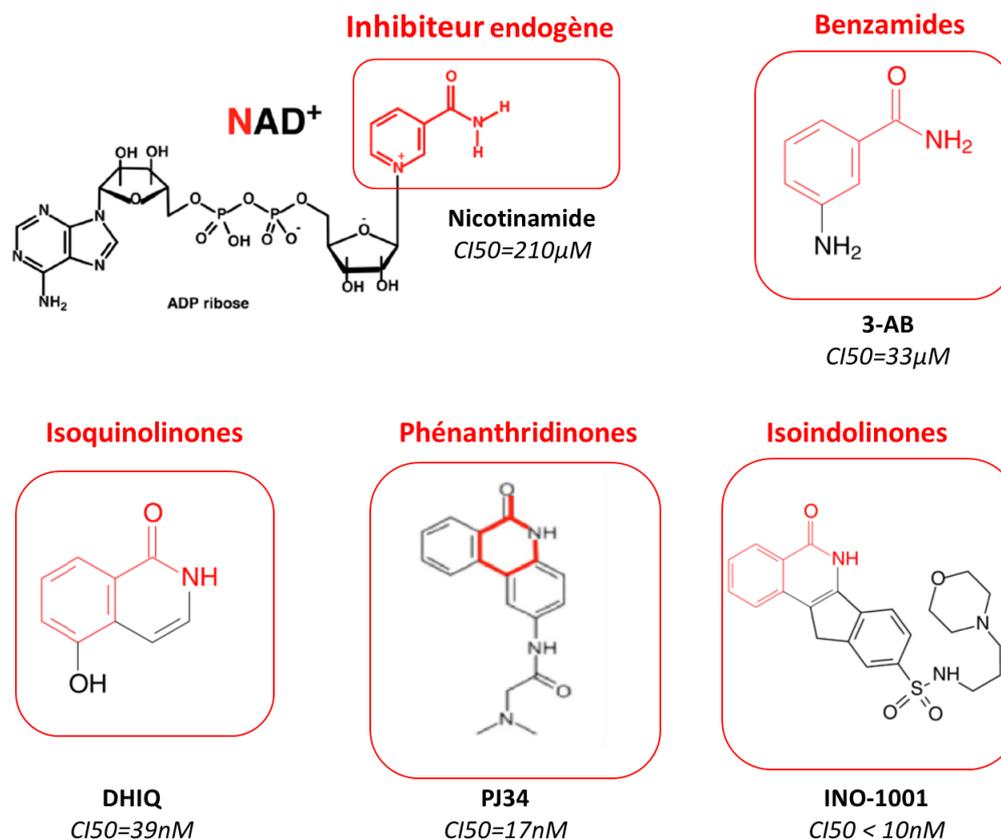
L'inhibition pharmacologique de la PARP peut se faire de manière directe ou indirecte. L'inhibition directe est l'approche conventionnelle la plus fréquemment utilisée. L'approche indirecte ou non conventionnelle cible des mécanismes en amont de l'activation de la PARP. Il s'agit par exemple de stratégies visant à réduire le stress oxydant, telles que les inhibiteurs de la NOS2 (Besson, 2009; Sriram *et al.*, 2016), les xanthines, les purines ou la vitamine D (Sriram *et al.*, 2016). Les inhibiteurs directs sont des inhibiteurs compétitifs qui, en raison d'une analogie structurale avec le NAD<sup>+</sup>, empêchent la fixation de ce dernier au domaine catalytique de la PARP. Le domaine catalytique étant très conservé dans toutes les isoformes de la PARP, ces inhibiteurs compétitifs sont capables de toutes les inhiber (Sodhi

*et al.*, 2010; Sriram *et al.*, 2014). Plus récemment, un autre mécanisme d'inhibition a été décrit: en se liant au domaine de liaison à l'ADN, les inhibiteurs empêchent la détection des cassures de l'ADN à l'origine de l'activation de la PARP.

Le nicotinamide est l'inhibiteur endogène de la PARP connu depuis plus de 30 ans (Virág et Szabó, 2002; Sodhi *et al.*, 2010). Des composés de structure similaire, tels que les benzamides, en particulier le 3-aminobenzamide (3-AB), sont capables d'inhiber la PARP (Figure 16). L'utilisation de ces premiers inhibiteurs est cependant limitée, en raison de leur faible puissance ( $CI_{50}$  très élevée de l'ordre du micromolaire) et de leur manque de spécificité d'action vis-à-vis des PARP. Ces molécules ont tout de même contribué à une meilleure compréhension du fonctionnement de la PARP et ont servi de base pour le développement de nouvelles molécules plus puissantes ( $CI_{50}$  de l'ordre du nanomolaire) et plus spécifiques (Virág et Szabó, 2002; Curtin et Szabó, 2013). Parmi ces inhibiteurs, on trouve par exemple les isoquinolinones (ex: DHIQ ou 1,5-dihydroxyisoquinoline), les phénanthridinones (ex: PJ34), et les isoindolinones (ex: INO-1001 ou N-(3-morpholinopropyl)-5-oxo-6,11-dihydro-5Hindeno[1,2-c]isoquinoline-9-sulfonamide).

Ces molécules sont décrites plus en détail dans les revues suivantes: Virág et Szabó, 2002; Jagtap et Szabó, 2005; Sodhi *et al.*, 2010; Curtin et Szabó, 2013.

Outre leur intérêt dans les pathologies du SNC (TC, ischémie cérébrale, maladie de Parkinson et autres maladies neurodégénératives), ces molécules sont également étudiées dans les domaines de la cancérologie, du cardiovasculaire, de la diabétologie et des maladies inflammatoires chroniques. Plusieurs molécules sont ainsi en développement clinique, essentiellement en oncologie (Berger *et al.*, 2018).



**Figure 16: Quelques exemples d'inhibiteurs de PARP**

*Abréviations: 3-AB, 3-aminobenzamide; ADP, adénosine diphosphate; DHIQ, 1,5-dihydroxyisoquinoline; INO-1001, N-(3-morpholinopropyl)-5-oxo-6,11-dihydro-5hindo[1,2-c]isoquinoline-9-sulfonamide; NAD<sup>+</sup>, nicotinamide adénine dinucléotide; PJ34, N-(6-oxo-5,6-dihydrophénanthridin-2-yl)-N,N-diméthylacétamide*

L'utilisation de souris KO PARP-1<sup>-/-</sup> a permis de confirmer le rôle délétère de l'hyperactivation de la PARP après un TC (Whalen *et al.*, 1999). En effet, ces souris présentent moins de déficits cognitifs et moteurs par rapport aux souris sauvages dans un modèle de TC par ICC. Toutefois aucune différence dans le volume de lésion n'est observée.

L'hyperactivation de la PARP induit un déficit énergétique à l'origine d'une mort cellulaire par nécrose. Toutefois, ce phénomène, à lui seul, n'explique pas l'ensemble des dommages associés à l'hyperactivation de la PARP après un TC. En effet, la PARP activée peut également entraîner une mort cellulaire programmée caspase-indépendante, appelée PARthanatos. Par son activité de PARylation, elle induit un dysfonctionnement mitochondrial et aggrave le stress oxydant et nitrant. De plus, elle joue également un rôle dans la modulation de la réponse inflammatoire.

### 2.2.1. Implication de la PARP dans la mort cellulaire post-traumatique

Selon le type, l'importance et la durée des lésions de l'ADN, l'activation de la PARP peut avoir comme conséquence, soit la préservation de la survie cellulaire, soit une induction de la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. Ainsi, en cas de stress génotoxique léger, l'activation de la PARP est indispensable à la réparation de l'ADN et au maintien de la stabilité génomique, et donc à la survie cellulaire. A l'inverse, en cas de stress modéré ou sévère, tel que celui observé à la suite d'un TC, l'hyperactivation de la PARP entraîne une mort cellulaire. Selon le niveau énergétique de la cellule, trois types de mort cellulaire peuvent être observés: apoptose, PARthanatos ou nécrose (Sodhi *et al.*, 2010; Luo et Kraus, 2012).

Tout comme les neurones, les oligodendrocytes et les astrocytes sont vulnérables aux lésions de l'ADN induites par le stress oxydant et nitrant. Des études *in vitro* montrent que la mort cellulaire, induite par le NO ou l'anion ONOO<sup>-</sup>, est au moins en partie réduite après l'inhibition de la PARP (Virág et Szabó, 2002).

#### 2.2.1.1. Apoptose et PARthanatos

En cas de lésions modérées de l'ADN, l'hyperactivation de la PARP peut induire une mort cellulaire programmée par apoptose, selon des mécanismes caspase-dépendants ou indépendants.

La PARP-1 activée contribue à l'initiation de l'apoptose cellulaire caspase-dépendante en stabilisant et facilitant les fonctions de la protéine p53 (tumor suppressor protein) (Luo et Kraus, 2012). De plus, durant les phases finales de l'apoptose, les caspases 3 et 7 reconnaissent le motif NLS de la PARP-1 et clivent l'enzyme en deux fragments, p89 et p24. Ce clivage permet l'inactivation de la PARP-1 et donc la préservation de l'énergie cellulaire. Cette énergie est nécessaire pour pouvoir finaliser la mort cellulaire par apoptose et prévenir la nécrose (Sodhi *et al.*, 2010; Luo et Kraus, 2012). En effet, contrairement à la nécrose, la mort cellulaire par apoptose, bien qu'elle nécessite de l'énergie, n'induit pas de réaction inflammatoire secondaire et n'endommage pas les cellules adjacentes (Jagtap et Szabó, 2005; Sodhi *et al.*, 2010; Luo et Kraus, 2012).

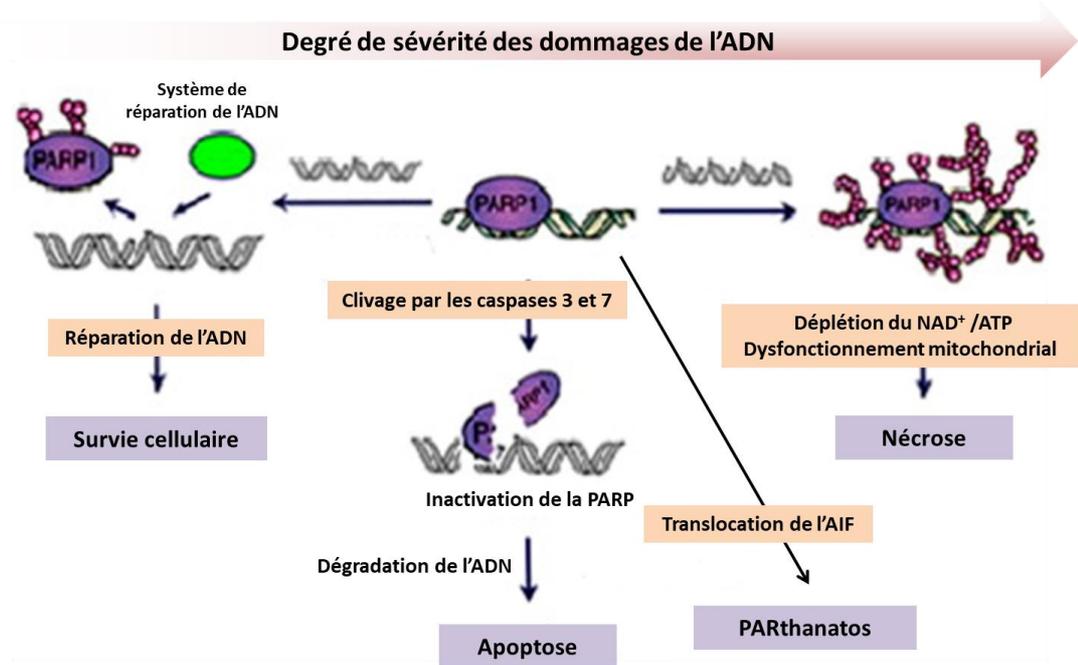
Yu et collaborateurs (2002) ont montré que l'activation de la PARP-1 entraîne la translocation d'AIF (Apoptosis Inducing Factor) dans le noyau à l'origine d'une mort cellulaire programmée caspase-indépendante. AIF est une protéine pro-apoptotique présente dans les mitochondries. À la suite de l'activation de la PARP, les PAR entraînent une translocation d'AIF de la mitochondrie dans le noyau, où il va induire une fragmentation de l'ADN, puis une mort cellulaire. Ce mécanisme de mort cellulaire est inhibé en cas de délétion génique ou d'inhibition pharmacologique de la PARP-1. Il s'agit d'une mort cellulaire programmée

PAR-dépendante, appelée PARthanatos. Elle est actuellement reconnue comme une voie de mort cellulaire à part entière, présentant certains aspects de l'apoptose (fragmentation de l'ADN, condensation de la chromatine), mais également de la nécrose (perte de l'intégrité membranaire, déficit énergétique) (Yu *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2009; Sodhi *et al.*, 2010; Luo et Kraus, 2012). Plus récemment, Stoica et collaborateurs (2014) ont montré *in vitro* que le MNNG (1-Methyl-3-Nitro-1-NitrosoGuanidine), un agent alkylant génotoxique, induit une mort caspase-indépendante sur des cultures primaires de neurones corticaux, et que cette mort cellulaire est réduite par le PJ34. De plus, dans une étude *in vivo*, l'injection de cuprizone (pour induire une démyélinisation) chez la souris entraîne une mort cellulaire caspase-indépendante dans le corps calleux, et l'administration d'un inhibiteur de PARP (4-hydroxyquinazoline ou 4-HI) permet de diminuer la mort des oligodendrocytes et la démyélinisation (Veto *et al.*, 2010).

#### 2.2.1.2. Nécrose

Lorsque les dommages de l'ADN sont sévères, l'activation excessive de la PARP épuise les stocks de NAD<sup>+</sup>, dont la régénération, à partir de son produit de dégradation, le nicotinamide, sous l'action de la nicotinamide mononucléotide adényltransférase-1, nécessite 4 molécules d'ATP. L'hyperactivation de la PARP entraîne donc une déplétion secondaire d'ATP à l'origine d'un déficit énergétique et d'une mort cellulaire par nécrose (Figure 17). Il s'agit de l'hypothèse de « suicide énergétique » avancée pour la première fois par Berger, il y a plus de 30 ans (Berger, 1985; Besson, 2009). Cette hypothèse a initialement été décrite avec les agents alkylants génotoxiques, puis, très rapidement, elle a été étendue à d'autres types de lésions de l'ADN, notamment ceux induits par les stress oxydant et nitrant et la stimulation excessive des récepteurs NMDA (Berger *et al.*, 2018). Les inhibiteurs de PARP préviennent la déplétion en NAD<sup>+</sup> et permettent une amélioration des déficits post-TC dans des modèles expérimentaux (Satchell *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2007; Besson, 2009). Ces résultats témoignent de la contribution de ce « suicide énergétique » aux lésions secondaires post-TC.

Outre la théorie du « suicide énergétique », cette nécrose induite par l'hyperactivation de la PARP peut également résulter d'un dysfonctionnement mitochondrial. En effet, certaines protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale sont des cibles de la PARP, et leur PARylation entraîne un dysfonctionnement mitochondrial qui accentue le déficit énergétique (Besson, 2009; Berger *et al.*, 2018).



**Figure 17 Rôle de la PARP dans la régulation de la survie ou la mort cellulaire**

(adapté de Sodhi *et al.*, 2010)

*Abréviations: ADN, acide désoxyribonucléique; ADP, adénosine triphosphate; AIF, apoptosis inducing factor; NAD<sup>+</sup>, nicotinamide adénine dinucléotide; PARP, poly(ADP-ribose)polymérase*

### 2.2.2. Implication de la PARP dans la neuro-inflammation post-traumatique

Une partie des effets délétères de la PARP est liée à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, impliqué dans la transcription de gènes inflammatoires. Oliver et collaborateurs (1999) ont ainsi montré que les souris KO PARP-1<sup>-/-</sup> sont moins sensibles à un choc endotoxinique, induit par l'injection de LPS, que les souris sauvages, et qu'elles produisent moins de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IFN $\gamma$ , qui sont sous le contrôle de NF- $\kappa$ B. La PARP semble agir comme un cofacteur de NF- $\kappa$ B pour faciliter sa liaison à l'ADN. De plus, son action sur NF- $\kappa$ B est indépendante de son activité enzymatique de PARylation (Sodhi *et al.*, 2010). La PARP est capable de PARyler d'autres facteurs de transcription, tels que STAT, AP-1 et 2 (Besson, 2009).

Des études expérimentales décrivent un rôle de la PARP-1 dans différentes pathologies inflammatoires infectieuses et non infectieuses (Ba et Garg, 2011). Par ailleurs, l'implication de la PARP dans l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et Macrophage Inflammatory Proteins-1 alpha ou MIP-1 $\alpha$ ), des enzymes de l'inflammation (NOS2, COX2 et NOX), ainsi que des molécules d'adhésion (ICAM-1, E- et P-sélectines) est bien démontrée. La modulation des gènes pro-inflammatoires par la PARP pourrait résulter de trois

mécanismes différents: (1) une régulation par un remodelage de la chromatine (PARylation des histones), (2) une régulation de l'activité transcriptionnelle, et (3) une modulation post-transcriptionnelle de la stabilité des ARNm.

Le rôle de la PARP dans l'activation de la microglie a également été étudié. En effet, l'activation microgliale dépend en grande partie de NF- $\kappa$ B, dont l'action est modulée par la PARP (Chiarugi et Moskowitz, 2003; Kauppinen *et al.*, 2005; Vuong *et al.*, 2015). Kauppinen et collaborateurs (2005) ont ainsi montré *in vitro* l'implication de la PARP dans l'activation microgliale induite par le TNF $\alpha$ , ainsi que dans la neurotoxicité qui en résulte. Cette dernière est mise en évidence, grâce à une co-culture microglies/neurones. Une autre étude *in vitro* montre que cette activation de la PARP microgliale (induite par le TNF $\alpha$ ) est observée en absence de lésions de l'ADN et semble impliquer la phospholipase C et la protéine kinase ERK2 (Extracellular signal-Regulated Kinase-2) (Vuong *et al.*, 2015). L'implication de la PARP dans l'activation microgliale a été confirmée dans d'autres études *in vitro* en utilisant divers stimuli inflammatoires, tels que le LPS (Chiarugi et Moskowitz, 2003; Kauppinen *et al.*, 2005; Stoica *et al.*, 2014), l'INF $\gamma$  (Chiarugi et Moskowitz, 2003; Stoica *et al.*, 2014), le peptide A $\beta$  (Chiarugi et Moskowitz, 2003; Kauppinen *et al.*, 2011), le 7-kétocholestérol (Diestel *et al.*, 2003) et l'alarmine S-100B (Xu *et al.*, 2016). De plus, l'inhibition pharmacologique de la PARP, avec le PJ34 ou l'INO-1001, diminue l'activation microgliale dans des modèles expérimentaux de TC (d'Avila *et al.*, 2012; Stoica *et al.*, 2014). Cette diminution est associée à une réduction de la perte neuronale et des déficits neurologiques post-TC.

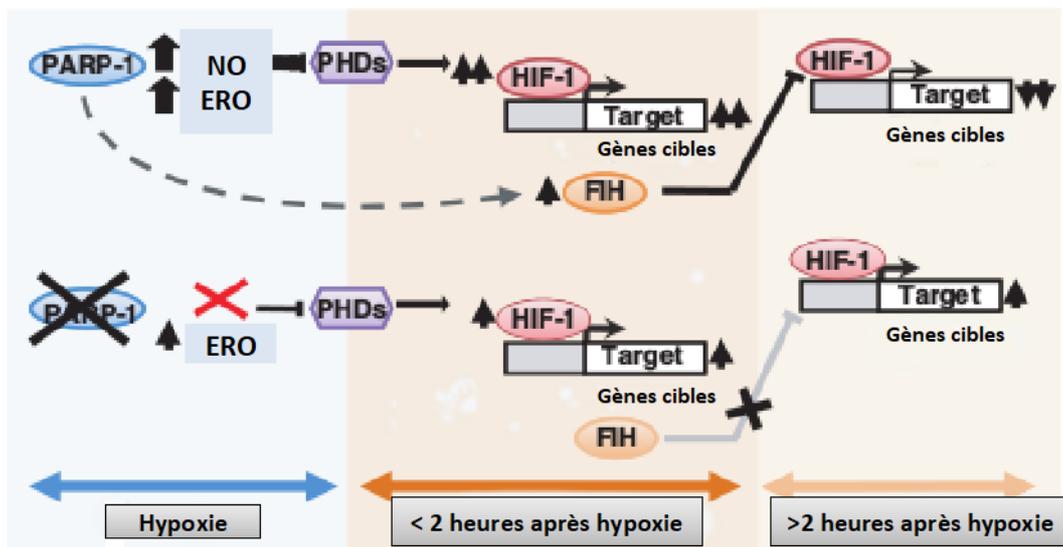
Des travaux de notre laboratoire décrivent également l'implication de la PARP dans la neuro-inflammation post-TC. Il a ainsi été montré que l'inhibition pharmacologique de la PARP, avec le 3-AB, diminue de l'œdème vasogénique après un TC chez la souris (Lescot *et al.*, 2010). De plus, la minocycline, un autre inhibiteur de PARP, diminue les taux de marqueurs de l'inflammation (IL-1 $\beta$  et métalloprotéinase-9 ou MMP-9), l'œdème cérébral (Homsy *et al.*, 2009), ainsi que l'activation microgliale après le TC (Homsy *et al.*, 2010; Siopi *et al.*, 2011).

### 2.2.3. Hyperactivation de la PARP et polarisation microgliale

L'ensemble des données expérimentales mentionnées ci-dessus décrit un rôle de la PARP dans l'activation de la voie pro-inflammatoire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, à l'origine d'une activation de la microglie caractéristique du phénotype M1.

Plus récemment, il a été montré que l'inhibition *in vitro* de la PARP de la microglie, activée par le peptide A $\beta$ , non seulement s'oppose à la production d'ERO, d'ERN et de TNF $\alpha$ , mais permet également d'augmenter la libération des facteurs trophiques VEGF et TGF- $\beta$  (Kauppinen *et al.*, 2011). Les résultats de cette étude suggèrent que l'inhibition de la

PARP permettrait un passage du phénotype M1 vers le phénotype M2. Un des mécanismes pouvant expliquer cette orientation vers le phénotype M2 est la modulation par la PARP de l'activité du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia Inducible Factor-1 alpha) (Martínez-Romero *et al.*, 2009). En effet, ce dernier est impliqué dans la production de facteurs trophiques, tels que le VEGF, le TGF- $\beta$  et l'IGF-1, capables de promouvoir des processus protecteurs et régénératifs du cerveau. En présence de la PARP, l'hypoxie entraîne une augmentation de la production de NO et d'ERO, à l'origine d'une accumulation immédiate d'HIF-1 $\alpha$  et d'une augmentation de son activité transcriptionnelle pendant les 2 premières heures (Figure 18). Toutefois, la PARP augmente également l'expression de FIH (Factor Inhibiting HIF), l'inhibiteur endogène d'HIF-1 $\alpha$ . Une répression de l'activité transcriptionnelle d'HIF-1 $\alpha$  par FIH est observée à partir de 2 heures post-hypoxie. La PARP-1 s'opposerait donc à l'activité d'HIF-1 $\alpha$  de manière indirecte par l'intermédiaire de FIH (Martínez-Romero *et al.*, 2008, 2009).



**Figure 18: Modulation de l'activité de HIF-1 $\alpha$  par la PARP**

(adapté de Martínez-Romero *et al.*, 2009)

Abréviations: ERO, espèce réactive oxygénée; FIH, factor inhibiting HIF; HIF-1 $\alpha$ , hypoxia inducible factor-1 alpha; NO, monoxyde d'azote; PHD, prolyl hydrolase

**Par son action sur les facteurs de transcription, plus particulièrement NF- $\kappa$ B et HIF-1 $\alpha$ , l'activation de la PARP pourrait intervenir dans la modulation de l'orientation du phénotype microglial, notamment en présence de débris de myéline. La PARP pourrait donc constituer une cible thérapeutique potentielle en vue de favoriser le phénotype microglial protecteur M2 après un TC.**

## OBJECTIF DU TRAVAIL

Les modèles expérimentaux de TC ont mis en évidence le rôle de la neuro-inflammation dans les lésions de la SB. Ces dernières génèrent des débris de myéline qui pourraient, à leur tour, amplifier la réponse inflammatoire, notamment en favorisant l'activation de la microglie en phénotype M1, créant ainsi un cercle vicieux. Cependant, des études remettent en cause cette hypothèse.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été d'étudier *in vitro*, sur des cultures primaires de microglies de souris, l'effet d'une préparation de débris de myéline de souris sur l'orientation du phénotype microglial. Cette étude a été réalisée, d'abord, dans un environnement non inflammatoire, puis, afin de mimer l'environnement inflammatoire post-TC, en présence de molécules pro-inflammatoires (LPS ou TNF $\alpha$ ). Comme la neuro-inflammation met également en jeu des cytokines anti-inflammatoires, nous avons étudié l'effet des débris de myéline en présence d'IL-4.

La PARP étant impliquée dans l'activation microgliale et les effets délétères de la neuro-inflammation après le TC, nous avons étudié les conséquences de son inhibition pharmacologique, par le PJ34, sur l'orientation phénotypique de la microglie par les débris de myéline, en présence de molécules pro-inflammatoire (TNF $\alpha$ ) ou anti-inflammatoire (IL-4).

Enfin, sachant, d'une part, que la microglie est le principal phagocyte responsable de la phagocytose des débris de myéline dans le SNC, et d'autre part, que ce phénomène peut être associé à des modifications de l'état d'activation microgliale, nous avons étudié les conséquences de l'inhibition de la phagocytose (par la cytochalasine D) des débris de myéline sur les changements phénotypiques observés, toujours en présence de stimulus pro-inflammatoire (TNF $\alpha$ ) ou anti-inflammatoire (IL-4).

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

## PREMIÈRE PARTIE: EXPÉRIENCES *IN VITRO*

### 1. Cultures primaires de cellules gliales

Les expériences *in vitro* sont réalisées sur des cultures primaires de microglies et d'oligodendrocytes matures préparées à partir d'une culture mixte de cellules gliales de souris. Le protocole a été mis en place au laboratoire par le Dr Claire Leconte, puis amélioré au début de ma thèse en se référant à d'autres protocoles publiés dans la littérature (Ni et Aschner, 2010; Chhor *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014).

La culture mixte de cellules gliales est composée de microglies et d'OPC sur une couche d'astrocytes (McCarthy et de Vellis, 1980). Les microglies, constituant la couche cellulaire superficielle la moins adhérente, sont isolées en premier. Les OPC sont ensuite détachés de leur support astrocytaire, puis différenciés en oligodendrocytes matures.

#### 1.1. Culture mixte de cellules gliales

La culture mixte de cellules gliales est préparée à partir de cortex de souriceaux Swiss (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) nouveaux-nés (jour post-natal P0 à P3).

Après dissection, les cortex sont mis en culture dans le milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose (DMEM HG 4,5 g/L, Sigma-Aldrich, D5796, St Quentin Fallavier, France) supplémenté avec 10% de sérum de vœu fœtal (SVF; Sigma-Aldrich, F2442 ou Dominique Dutscher, S1810-500, Issy-les-Moulineaux; le SVF est préalablement décomplémenté par incubation dans un bain-marie à 56°C pendant 45 minutes, puis filtré), 2 mM de glutamine (Sigma-Aldrich, G3126) et 0,01% (V/V) d'un mélange de streptomycine à 10 mg/ml et pénicilline à 10 000 U/ml (Sigma-Aldrich, P4333).

- **Dissection des cerveaux et isolement des cortex**

La dissection est réalisée dans des conditions stériles sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) à flux laminaire horizontal (Telstar Mini-H, Oxygen, Les Ulis, France).

Après décapitation, les têtes sont plongées dans deux bains successifs d'alcool à 70°, puis transférés dans une grande boîte de pétri contenant du milieu de dissection à 4°C (milieu DMEM HG, contenant 2% (V/V) du mélange de streptomycine/pénicilline). Après retrait de la peau et de la boîte crânienne, les cerveaux sont délicatement prélevés, puis transférés dans une petite boîte de pétri contenant du milieu de dissection à 4°C. Sous une

loupe binoculaire, les bulbes olfactifs sont retirés, puis les deux cortex sont détachés, au niveau de la scissure inter-hémisphérique, des autres structures cérébrales. Les méninges sont ensuite minutieusement ôtées, puis les cortex sont transférés dans un Falcon de 50 ml (Dominique Dutscher, 352070) contenant du milieu DMEM HG supplémenté avec 10% de SVF, 2 mM de glutamine et 0,01% (V/V) du mélange de streptomycine/pénicilline (=milieu de culture 10/1) à 4°C.

A la fin de la dissection, le Falcon est plongé pendant 5 minutes dans un bain-marie à 37°C, avant que les cortex ne soient mécaniquement dissociés à l'aide d'une pipette stérile de 5 ml sous un PSM à flux laminaire vertical (Safe Fast Top 2RD, Oxygen).

- **Mise en culture des cortex**

L'ensemble des manipulations de culture cellulaire est réalisé sous le PSM à flux laminaire vertical.

Après dissociation, les cortex sontensemencés, à raison de 2 à 3 cortex/15ml de milieu de culture 10/1, dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup> (Dominique Dutscher, 353135), préalablement traitées à la poly-D-lysine (Sigma-Aldrich, P6407). Les flasques sont placées dans un incubateur (SANYO, Panasonic group, MCO-19AIC, Bonneuil sur marne, France) à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, puis le milieu de culture est changé au bout d'une semaine.

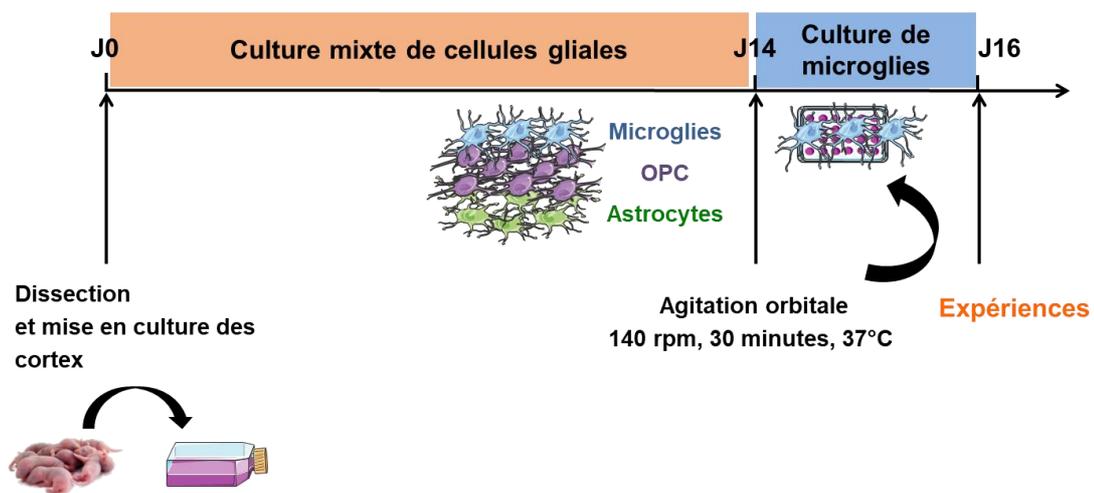
Une culture mixte de cellules gliales est obtenue au bout de 7 à 9 jours (McCarthy et de Vellis, 1980).

## 1.2. Culture primaire de microglies

Après 14 jours de culture, les flasques sont placées sous agitation orbitale, dans un incubateur-agitateur (INFORS HT, Massy, France), à 140 rpm (rotations par minute) pendant 30 minutes à 37°C. Le milieu de culture contenant la microglie est récupéré, puis centrifugé (Centrifuge MF 20-R, AWEL industries, Blain, France) à 1 200 g pendant 10 minutes à 4°C. Les culots cellulaires sont re-suspendus dans un 1 à 2 ml de milieu de culture 10/1, puis le nombre de cellules est déterminé à l'aide d'une cellule de Malassez (Superior Marienfeld, 0640610, Allemagne). Cette suspension cellulaire est ensuite complétée par du milieu de culture 10/1, afin d'ensemencer à 400 000 cellules/ml des plaques de 24 (500 µl/puits; Dominique Dutscher, 055429) ou 12 puits (1 ml/puits; Dominique Dutscher, 055428), préalablement traitées à la poly-D-lysine. Les plaques sont placées dans l'incubateur à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>.

Au bout de 24 heures, le milieu de culture 10/1 est remplacé par du milieu DMEM HG supplémenté avec 2 mM de glutamine et 0,01% (V/V) du mélange de streptomycine/pénicilline.

Les expériences sont réalisées 24 heures après le changement de milieu, soit 2 jours après ensemencement (Figure 19).



**Figure 19: Préparation d'une culture primaire de microglie de souris**

*Abréviations: J, jours; OPC, oligodendrocyte progenitor cell; rpm, rotations par minute*

### 1.3. Culture primaire d'oligodendrocytes matures

Tout de suite après l'isolement de la microglie au bout de 14 jours, 15 ml de milieu de culture 10/1 sont remis dans les flasques contenant le reste de cellules gliales (OPC et astrocytes), qui sont ensuite replacées dans l'incubateur à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> pendant 2 à 3 heures.

Afin d'éliminer les microglies restantes, les flasques sont soumises à une agitation orbitale à 210 rpm pendant 30 minutes à 37°C, puis le milieu de culture est éliminé.

Pour décrocher les OPC de leur support astrocytaire, les flasques sont soumises à une agitation orbitale pendant 16 heures à 37°C. Le milieu de culture est ensuite récupéré, puis centrifugé à 1 200 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Les culots cellulaires sont repris dans un 1 à 2 ml de milieu de culture 10/1 et le nombre de cellules est compté à l'aide d'une cellule de Malassez. Cette suspension cellulaire est complétée par du milieu de culture 10/1, afin d'ensemencer à 200 000 cellules/ml des plaques préalablement traitées avec la poly-D-lysine.

Avant de différencier les OPC en oligodendrocytes matures, ces derniers sont d'abord soumis à une phase de prolifération. Ainsi, 4 heures après leur ensemencement, le milieu de culture 10/1 est remplacé par du milieu DMEM HG supplémenté avec 1% (V/V) de supplément N1 (Sigma-Aldrich, N6530), 2% (V/V) de supplément B27 (Invitrogen,

0080085SA, Paris, France), 2 mM de glutamine, 5 ng/ml de basic Fibroblast Growth Factor (bFGF; Invitrogen, PHG0024), 5 ng/ml de Platelet-Derived Growth Factor-AA (PDGF-AA; Invitrogen, PHG0035) et de 0,01% (V/V) du mélange de streptomycine/pénicilline (= milieu OL1).

Après cette étape de prolifération, le milieu OL1 est remplacé par du milieu DMEM HG supplémenté avec 1% de supplément N1, 2% de supplément B27, 2 mM de glutamine et 0,01% du mélange de streptomycine/pénicilline (= milieu OL2). L'absence des facteurs de croissance bFGF et PDGF-AA dans le milieu OL2 permet de limiter la prolifération et de promouvoir la différenciation des OPC en oligodendrocytes matures.

La mise au point de cette culture d'oligodendrocytes matures ayant constitué une partie de mon travail de thèse, plus de précisions concernant ce protocole seront apportées dans le paragraphe « I. Mise au point des cultures primaires de microglies et d'oligodendrocytes de souris » de la partie « Résultats ».

## 2. Préparation des débris de myéline de souris

Les débris de myéline sont préparés à partir de cerveaux entiers de souris mâles Swiss de 25-30 g (Janvier Labs) selon un protocole décrit pour la première fois par Norton et Poduslo (1973), puis repris et adapté par Pinteaux-Jones et collaborateurs (2006).

### 2.1. Principe

Après ultracentrifugation d'un homogénat de cerveaux dans un gradient de sucrose à 0,32/0,85 M, un extrait brut de débris de myéline est obtenu à l'interface des deux solutions de sucrose. Cet extrait est ensuite lavé plusieurs fois avec une solution à 10 mM de Tris (2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol hydrochloride; Roth, 5429.3)-HCl (pH=7,4) et soumis à deux chocs osmotiques pour éclater les contaminants cellulaires.

### 2.2. Protocole expérimental

- **Prélèvement et broyage des cerveaux**

Après dislocation cervicale, les cerveaux sont prélevés, pesés, puis immédiatement placés dans du PBS (Phosphate-Buffered Saline; NaCl à 137 mM, KCl à 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 8,1 mM, KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 1,5 mM) à 4°C. Après 2 rinçages avec le PBS, les cerveaux sont transférés dans une solution de sucrose (Sigma, S-9378) à 0,32 M à 4°C, puis broyés pendant 2 minutes à l'Ultra-turrax (T8, IKA, Staufen, Allemagne), en faisant des allers-retours. Un homogénat de cerveaux à 100 mg/ml est ainsi obtenu.

*Remarque: Les solutions de sucrose à 0,32 M et 0,85 M sont préparées dans la solution de Tris-HCl à 10 mM (pH=7,4).*

- **Extraction des débris de myéline**

Un volume de 15 ml d'homogénat de cerveaux est délicatement déposé sur 20 ml de solution de sucrose à 0,85 M dans des tubes transparents d'ultracentrifugation de 45 ml (Ultra-Clear Centrifuge Tube, Beckman Coulter, 344058, Villepinte, France). On obtient un gradient de sucrose 0,32/0,85 M qui est ensuite ultra-centrifugé à 113 792 g (=30 400 rpm; rotor Ti32w, Beckman) pendant 30 minutes à 4°C. Un extrait brut de débris de myéline est récupéré avec une pipette pasteur en verre (Roth, 4522) à l'interface des deux solutions de sucrose. L'extrait est ensuite mis en suspension dans 36 ml de solution Tris-HCl, puis ultra-centrifugé à 113 792 g pendant 10 minutes à 4°C. Après cette étape de lavage, les culots sont soumis à un premier choc osmotique dans 36 ml d'eau bidistillée pendant 30 minutes à 4°C, puis ultra-centrifugés à 113 792 g pendant 10 minutes à 4°C. Après une autre étape de lavage avec la solution de Tris-HCl, comme précédemment décrite, les culots sont remis en suspension dans 17 ml de solution de sucrose à 0,32 M, puis déposés sur 20 ml de solution de sucrose à 0,85 M dans de nouveaux tubes d'ultracentrifugation. Le gradient de sucrose ainsi formé est ultra-centrifugé à 113 792 g pendant 30 minutes à 4°C, afin d'obtenir un extrait plus pur de débris myéline à l'interface des deux solutions de sucrose. Cet extrait est récupéré à l'aide d'une pipette pasteur en verre, lavé avec la solution de Tris-HCl, puis soumis à un deuxième choc osmotique, comme décrit précédemment (Figure 20).

Les culots obtenus après le choc osmotique sont remis en suspension dans 36 ml de solution de Tris-HCl pour un dernier lavage à la fin duquel l'extrait final de débris de myéline est récupéré.

Sous le PSM à flux laminaire horizontal, les culots sont repris dans 1 à 2 ml de solution de Tris-HCl filtrée (filtre 0,22 µm; Dominique Dutscher, 051732). Environ 50 µl de cette préparation est prélevé, afin de doser les protéines dans la préparation.

- **Dosage des protéines par la méthode de Bradford**

Il s'agit d'un dosage colorimétrique basé sur un changement d'absorbance du bleu brillant de Coomassie G-250 lorsque celui-ci est fixé aux protéines.

Le dosage est réalisé à l'aide du kit « Bio-Rad Protein Assay » (Life Science, Bio-Rad, 500-0006, Marnes-la-Coquette, France). La préparation de débris de myéline est préalablement diluée au ½ dans une solution de NaOH à 1 M et une gamme étalon de 0,1 à 1,2 mg/ml est préparée à partir d'une solution de BSA (Bovine Serum Albumine, Sigma-Aldrich, A3059) à 20%. Un volume de 20 µl de chaque point de la gamme est mélangé avec 1 ml du réactif de Bio-rad dilué au 1/5<sup>e</sup> dans de l'eau bidistillée. Cinq microlitres de la

préparation de débris de myéline sont mélangés à 2,5 ml de réactif Bio-Rad dilué au 1/5<sup>e</sup> dans de l'eau bidistillée. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 150 µl de chaque mélange sont déposés en duplicate sur une plaque de 96 puits, puis l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre (SPECTROstar<sup>Nano</sup>, BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France) à 595 nm. Les résultats sont exprimés en µg de protéines/ml.

- **Stockage de la préparation de débris de myéline**

Après dosage des protéines, la préparation de débris de myéline est diluée, sous le PSM à flux laminaire horizontal, dans la solution de Tris-HCl filtrée pour obtenir une solution stock à 1,6 mg de protéines totales/ml. Cette solution stock est conservée dans des tubes stériles de 500 µl à -40°C.



**Figure 20: Préparation des débris de myéline à partir de cerveaux de souris**

### 3. Traitement des cultures primaires de microglies

Les expériences sont réalisées 2 jours après ensemencement de la microglie à 400 000 cellules/ml dans des plaques de 12 ou 24 puits.

Vingt-quatre heures avant l'expérience, le milieu de culture 10/1 est remplacé par du milieu DMEM HG sans SVF, supplémenté avec 2 mM de glutamine et 0,01% du mélange de streptomycine/pénicilline.

Selon les expériences réalisées, les conditions de traitement sont les suivantes (les concentrations mentionnées sont les concentrations finales dans le puits):

- Pour étudier l'effet propre des débris de myéline sur le phénotype microglial dans un environnement non inflammatoire, les cellules sont incubées pendant 6 ou 24 heures avec les débris de myéline seuls à la concentration de 40 µg de protéines/ml.

- Pour étudier l'effet des débris de myéline sur le phénotype microglial dans un environnement pro-inflammatoire, les cellules sont incubées simultanément pendant 24 heures avec le LPS (E.coli 0127:B8, Sigma-Aldrich, L3129) à la concentration de 10 ng/ml ou le TNFα (recombinant mouse TNFα (aa 80-235), R&D Systems, 410-MT-010/CF, Bio-Techne France, Lille, France) à la concentration de 50 ng/ml et les débris de myéline à la concentration de 40 µg de protéines/ml.

- Pour étudier l'effet des débris de myéline sur le phénotype microglial dans un environnement anti-inflammatoire, les cellules sont incubées simultanément pendant 24 heures avec l'IL-4 (recombinant mouse IL-4, R&D Systems, 404-ML-010/CF) à la concentration de 20 ng/ml et les débris de myéline à la concentration de 40 µg de protéines/ml.

- Afin de déterminer le rôle de la PARP, un puissant inhibiteur, le PJ34 (Sigma-Aldrich, P4365), est utilisé à la concentration de 20 µM (Stoica *et al.*, 2014). Les cellules sont ainsi prétraitées pendant 1 heure avec le PJ34 qui est ensuite laissé conjointement avec les autres traitements pendant 24 heures.

- Enfin, en vue d'évaluer le rôle de la phagocytose des débris de myéline, les cellules sont prétraitées pendant 1 heure avec un inhibiteur de phagocytose, la cytochalasine D (Sigma-Aldrich, C8273; diluée dans le diméthylsulfoxyde ou DMSO, Thermoscientific, 85190) à 5 µM (Mimura et Asano, 1976; Liu *et al.*, 2006) avant l'ajout des autres traitements.

L'effet propre des inhibiteurs (PJ34 et cytochalasine D) est également étudié en incubant des cellules uniquement avec ces derniers.

Pour chaque expérience, un témoin positif de l'activation microgliale M1, constitué par des cellules incubées avec le LPS aux concentrations de 10 ou 100 ng/ml ou bien le TNFα à la concentration de 50 ng/ml, est préparé. Le choix de ces concentrations est basé à la fois

sur des données de la littérature (Chhor *et al.*, 2013), ainsi que sur la réalisation préalable d'études dose-effet de ces molécules sur l'activation microgliale.

Par ailleurs, des cellules contrôles n'ayant subi qu'un traitement avec les solvants (Tableau VII) sont également utilisées dans chaque expérience.

**Tableau VII: Tableau VII: Solvants des molécules utilisées**

Molécule	Solvant
LPS	PBS
TNF $\alpha$	PBS
IL-4	PBS
Débris de myéline	Tris-HCl 10mM
PJ34	PBS
Cytochalasine D	DMSO

*Abréviations: DMSO, diméthylsulfoxyde; IL-4, interleukine-4; LPS, lipopolysaccharide; PBS, phosphate-buffered saline; PJ34, N-(6-oxo-5,6-dihydrophénanthridin-2-yl)-N,N-diméthylacétamide; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha*

*Remarque: Le PBS utilisé pour les traitements des cultures primaires de microglies est préparé à partir d'une solution stérile 10 fois plus concentrée (10X; Sigma-Aldrich, P5493).*

#### **4. Evaluation de la viabilité et de la mort cellulaire**

La viabilité cellulaire, reflétée par l'activité métabolique cellulaire, est évaluée par le test du MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium), et la mort cellulaire est déterminée par la mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) libérée dans les surnageants de culture par les cellules mortes.

##### **4.1. Mesure de la viabilité cellulaire par le test du MTT**

###### **4.1.1. Principe**

Le test du MTT est une méthode colorimétrique basée sur la réduction du MTT, de couleur jaune, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules viables en formazan, de couleur violette, qui est ensuite solubilisé dans du DMSO, afin de permettre son dosage par spectrophotométrie à 570 nm. L'absorbance est ainsi proportionnelle au nombre de cellules dont l'activité mitochondriale est intacte.

#### 4.1.2. Protocole expérimental

Une solution de MTT (Molecular Probes, M6494, Fisher Scientific, Illkirch, France) à 5 mg/ml est préparée dans le milieu de culture DMEM HG. Cinquante microlitres de cette solution sont dilués dans 500 µl de milieu de culture DMEM 10/1 contenu dans chaque puits d'une plaque de 24 puits (concentration finale de 0,5 mg/ml). La plaque est ensuite incubée pendant 3 heures à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub>. Au bout de cette incubation, un précipité violet de formazan est observé dans les puits. Après élimination des surnageants, le précipité de chaque puits est solubilisé dans 500 µl de DMSO (Thermoscientific, 85190) par agitation pendant 10 à 15 minutes (Vibramax 100 shaker, Heidolph, Essex, Royaume-Uni). L'absorbance à 570 nm, corrigée par l'absorbance à 690 nm, est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (SPECTROstar<sup>Nano</sup>, BMG Labtech). Les valeurs obtenues sont rapportées à celles des puits contrôles, considérés comme étant à 100% de viabilité cellulaire.

### 4.2. Mesure de la mort cellulaire par dosage de la LDH

#### 4.2.1. Principe

La LDH est une enzyme cytosolique qui catalyse la conversion du pyruvate en lactate en présence d'un cofacteur, le NADH qui est oxydé en NAD<sup>+</sup>. La mort cellulaire s'accompagne d'une perte de l'intégrité membranaire qui entraîne un relargage de la LDH. La quantité de LDH extracellulaire est ainsi proportionnelle à la mort cellulaire. L'activité de la LDH est mesurée dans les surnageants de culture cellulaire en présence de pyruvate et de NADH. Le principe du dosage est de suivre la vitesse de disparition du NADH par colorimétrie à 340 nm qui est proportionnelle à l'activité de la LDH.

#### 4.2.2. Protocole

Un puits contrôle « Full kill », correspondant à 100% de mort cellulaire, est préparé pour chaque culture. Pour cela, les cellules sont incubées pendant 24 heures avec du triton X-100 (Sigma-Aldrich, T8787; dilué dans le PBS pour obtenir une solution stock à 2%) à la concentration finale de 0,1% à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub>.

A l'issue des expériences, 3 x 50 µl sont prélevés dans chaque puits, y compris le puits « Full kill », puis déposés en triplicat sur une microplaque de 96 puits. Cent microlitres d'une solution de βNADH (Sigma-Aldrich, N4505) à 0,3 mg/ml (préparée dans du PBS) sont ajoutés dans tous les puits à l'aide d'une multipipette. Après l'ajout rapide de 20 µl d'une solution de pyruvate de sodium (Sigma-Aldrich, P2256) à 0,625 mg/ml (préparée dans du PBS) à l'aide d'une multipipette, l'absorbance est immédiatement mesurée à 340 nm, toute les 30 secondes pendant 5 minutes, à l'aide d'un spectrophotomètre (SPECTROstar<sup>Nano</sup>,

BMG Labtech). Les valeurs des pentes correspondantes aux cinétiques de décroissance du NADH sont rapportées à celle obtenues dans les puits « Full kill ». On obtient ainsi un pourcentage de mort cellulaire exprimé par rapport au contrôle « Full kill » à 100%.

## 5. Evaluation de l'expression génique

L'expression de différents gènes est mesurée par RT-qPCR (Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction).

### 5.1. Principe

La PCR ou ACP (Amplification en Chaîne par la Polymérase) est une technique de biologie moléculaire d'amplification génique ciblée *in vitro*. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon biologique peu abondant et complexe, d'importantes quantités d'un fragment spécifique d'ADN.

Quand l'amplification concerne des échantillons d'ARN, on parle de RT-PCR. L'ARN est retranscrit, grâce une transcriptase inverse, en ADN complémentaire. Ce dernier est ensuite amplifié, puis quantifié par PCR quantitative (qPCR).

### 5.2. Protocole expérimental

Les études RT-qPCR sont réalisées sur des échantillons de cultures primaires de microgliesensemencées à 400 000 cellules/ml dans des plaques de 12 puits.

Après 6 ou 24 heures de traitement, les ARNm sont extraits à l'aide du kit « RNeasy Micro » (QIAGEN, 74004, Allemagne) selon les recommandations du fabricant.

#### 5.2.1. Extraction des ARNm

Un volume de 350 µl de tampon de lyse RLT (fourni dans le kit; contenant du thiocyanate de guanidinium qui favorise la fixation des ARN sur les membranes en silice des colonnes), additionné de 1% de β-mercaptoéthanol, est ajouté dans chaque puits, puis le lysat cellulaire est récupéré dans des tubes eppendorfs autoclavés en grattant les cellules à l'aide d'un cône de pipette 200 dont l'extrémité a été coupée. Un volume équivalent d'éthanol à 70% est ajouté dans chaque échantillon, puis le mélange est transféré dans les colonnes (RNeasy MinElute spin columns) placées dans des tubes collecteurs de 2 ml (fournis dans le kit).

Après une centrifugation de 15 secondes à 10 000 g à 4°C, les ARNm sont retenus sur les membranes en silice des colonnes et le reste de liquide récolté dans les tubes collecteurs est éliminé. Un volume de 350 µl de tampon de lavage RW1 (fournis dans le kit) est ajouté dans toutes les colonnes qui sont ensuite centrifugées à 10 000 g pendant 15 secondes à 4°C. Le contenu des tubes collecteurs est ensuite éliminé.

Afin d'éliminer toute trace d'ADN, les membranes en silice des colonnes sont incubées avec 80 µl d'une solution de désoxyribonucléase (DNase) diluée au 1/8<sup>e</sup> dans le tampon RDD (fournis dans le kit), pendant 15 minutes dans un bain-marie à 20-30°C. La DNase doit être reconstituée extemporanément dans de l'eau ARNase free.

Trois cent cinquante microlitres de tampon de lavage RW1 sont ensuite ajoutés dans toutes les colonnes. Le liquide collecté après 15 secondes de centrifugation à 10 000 g à 4°C est éliminé et les colonnes sont transférées dans de nouveaux tubes collecteurs de 2 ml. Après l'ajout de 500 µl de tampon de lavage RPE (fournis dans le kit), les colonnes sont encore centrifugées à 10 000 g pendant 15 secondes à 4°C, puis les tubes collecteurs et leurs contenus sont éliminés. Cinq cents microlitres d'éthanol à 80% sont ajoutés dans toutes les colonnes. Après 2 minutes de centrifugation à 10 000 g à 4°C, les tubes collecteurs et leurs contenus sont éliminés. Afin de faire sécher les membranes, les colonnes sont placées dans de nouveaux tubes collecteurs de 2 ml, puis centrifugées à 10 000 g pendant 5 minutes à 4°C. Les tubes collecteurs et leurs contenus sont éliminés et les colonnes sont placées dans des tubes eppendorfs de 1,5 ml (fournis dans le kit). Les ARN sont récupérés dans 14 µl d'eau RNase-free après centrifugation à 10 000 g pendant 1 minute à 4°C.

### **5.2.2. RT-qPCR**

Les extraits d'ARN sont conservés à -80°C jusqu'à la réalisation de la RT-qPCR par Sophie Lebon, ingénieure de recherche dans l'unité de recherche du Dr Pierre Gressens (INSERM U1141 PROTECT Hôpital Robert Debré, Paris).

#### **5.2.2.1. Dosage des ARN**

La concentration d'ARN est déterminée par spectrophotométrie (Nanodrop 1000, Thermo Scientific) en mesurant les d'absorbances à 260 nm. En raison de la présence de différents pics d'absorbance (230 nm pour les phénols, 260 nm pour les acides nucléiques et 280 nm pour les protéines), cette étape permet également de juger de la qualité de l'extraction. La quantité d'ARN est exprimée en ng/µl (1 absorbance = 40 ng d'ARN). Les échantillons d'ARN sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à la réalisation de la RT-qPCR.

#### **5.2.2.2. Rétrotranscription**

La rétrotranscription (RT), permettant la synthèse des brins d'ADN complémentaires (ADNc), est réalisé à l'aide du kit « High iScript cDNA synthesis » (Bio-Rad, 1708891). Les ARN sont dilués dans l'eau de manière à obtenir 300 ng d'ARN dans un volume de 15 µl. A ce volume, sont ajoutés 1 µl de iScript reverse transcriptase et 4 µl de iScript reaction buffer 5X, contenant le mélange d'oligo (dT) et d'amorces aléatoires. Le mélange

est incubé pendant 5 minutes à 25°C, puis 30 minutes à 42°C pour activer l'enzyme, et enfin 5 minutes à 85°C pour inactiver l'enzyme.

### **5.2.2.3. PCR quantitative**

La quantification des ADNc est basée sur la mesure de la fluorescence du SYBR Green (Bio-Rad), un fluorophore qui s'intercale dans le double brin d'ADN environ toutes les 18 paires de bases. Le SYBR Green émet une fluorescence verte (520 nm) après excitation à 497 nm.

Les amorces sens et antisens de chaque gène sont diluées en une concentration finale de 0,15 µM. L'amplification est réalisée dans un mélange réactionnel (volume final de 10 µl) constitué de:

- 5 µl du iQ SYBR Green Supermix,
- 2,7 µl d'eau,
- 0,15 µl d'amorce sens,
- 0,15 µl d'amorce antisens,
- 2 µl d'ADNc préalablement dilués au 1/5<sup>e</sup> ou 1/10<sup>e</sup> selon les gènes étudiés.

Ce mélange réactionnel est déposé en triplicate dans une plaque, puis l'amplification est réalisée à l'aide d'un appareil CFX (Bio-Rad). L'amplification se déroule en 40 cycles de 2 étapes chacun: (1) dénaturation pendant 5 secondes à 95°C et (2) hybridation et élongation pendant 10 secondes à 60°C.

Une courbe de fusion permet de vérifier la spécificité de l'amplification. Pour chaque condition, un cycle seuil ou Ct (cycle threshold) est déterminé à partir du seuil placé automatiquement en fonction du coefficient de corrélation et de l'efficacité de la PCR. Ces deux derniers paramètres sont déterminés à partir de la gamme étalon de chaque gène. Ce seuil permet d'exclure les bruits de fond dans la quantification de l'ADN. Au cours de l'amplification, la fluorescence du SYBR Green augmente et le Ct corrèle avec le nombre de copies de départ.

L'expression des gènes d'intérêts est normalisée par rapport à un gène de référence, Rpl13a (Ribosomal protein L13A) exprimé de manière stable,

## **6. Evaluation de l'expression protéique**

Différentes protéines ont été étudiées sur les cultures primaires de microglies et d'oligodendrocytes par des techniques d'immunocytochimie et de Western blot (WB).

Les principales protéines étudiées, leurs caractéristiques, ainsi que l'intérêt de leur étude sont résumés dans le tableau VIII.

**Tableau VIII: Protéines étudiées par WB ou immunocytochimie sur les cultures primaires de microglies ou d'oligodendrocytes**

	Protéine	Caractéristique	Intérêt de la protéine
Cultures de microglies	<b>Iba1</b>	Protéine membranaire exprimée par les microglies/macrophages	- Vérifier la pureté de la culture primaire de microglie - Visualiser la morphologie de la microglie en culture
	<b>NOS2</b>	Enzyme exprimée par les microglies/macrophages de phénotype M1	Caractériser le phénotype microglial M1
	<b>Arginase 1</b>	Enzyme exprimée par les microglies/macrophages de phénotype M2	Caractériser le phénotype microglial M2
	<b>AIF</b>	Protéine pro-apoptotique transloquée de la mitochondrie vers le noyau après activation de la PARP	Mettre en évidence l'activation de la PARP
	<b>MBP</b>	Protéine de la gaine de myéline	Marquer les débris de myéline incubés avec les microglies
Cultures d'oligodendrocytes	<b>NG2</b>	Protéine exprimée par les OPC	Vérifier la pureté et la maturation de la culture d'oligodendrocytes
	<b>MBP</b>	Protéine exprimée par les oligodendrocytes matures	Vérifier la pureté et la maturation de la culture d'oligodendrocytes
	<b>GFAP</b>	Protéine exprimée par les astrocytes	Vérifier l'absence d'astrocytes
	<b>Iba1</b>	Protéine exprimée par les microglies/macrophages	Vérifier l'absence de microglies

*Abréviations: AIF, apoptosis inducing factor; CD, cluster of differentiation; GFAP, glial fibrillary acidic protein; Iba1, ionized calcium binding adapter molecule 1; MBP, myelin basic protein; NG2, neural/glial antigen 2; NOS2, NO-synthase de type 2*

## 6.1. Immunocytochimie

### 6.1.1. Principe

L'immunocytochimie est une technique d'immunomarquage réalisée *in situ* sur des cellules cultivées sur des lamelles en verre, placées au fond des puits de plaque de culture de 24 puits. Le principe de l'immunomarquage est de révéler des molécules biologiques grâce à des anticorps (Ac) spécifiques.

### 6.1.2. Protocole expérimental

Les immunocytochimies sont réalisées sur les cultures primaires de microglies ou d'oligodendrocytesensemencées respectivement à 400 000 et 200 000 cellules/ml sur des lamelles fines en verre (Dominique Dtuscher, 100048; Ø 13 mm) stériles (stérilisation faites avec l'alcool à 70°), préalablement traitées avec la poly-D-lysine.

Le protocole général est identique pour les différentes immunocytochimies. Il comprend des étapes de fixation des cellules, de perméabilisation membranaire et de blocage des sites non spécifiques, d'incubation avec des Ac primaires (Ac I) dirigés contre les molécules d'intérêt, puis des Ac secondaires (Ac II) couplés à des fluorochromes et dirigés contre les Ac I. Il est également possible de marquer les noyaux, les lysosomes et/ou les cytosquelettes avant de monter les lamelles sur des lames en verre.

- **Fixation des cellules et cryoprotection**

Après récupération des surnageants pour des dosages ultérieurs (conservés à -40°C), les puits sont lavés avec 500 µl de PBS (préparé à partir de PBS 10X, Sigma-Aldrich, P5493), puis les cellules sont fixées avec 400 µl de paraformaldéhyde (PFA) à 4% (PFA à 1,3 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 7,7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 25 mM, NaCl à 145,5 mM et NaOH à 5 M pour ajuster le pH à 7,4) pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois avec 400 µl de PBS (NaCl à 137 mM, KCl à 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 8,1 mM, KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 1,5 mM).

Il est possible de s'arrêter à cette étape et de conserver les cellules dans une solution de cryoprotection (PBS contenant 20% de glycérol et 30% d'éthylène glycol) à -40°C.

- **Saturation des sites non spécifiques et perméabilisation des membranes**

Avant de procéder à l'immunocytochimie, la solution cryoprotection est retirée, puis les cellules sont rincées 3 x 5 minutes avec 500 µl de PBS.

La saturation des sites non spécifiques et la perméabilisation des membranes cellulaires sont réalisées simultanément en incubant les cellules avec 200 µl d'une solution de PBS contenant 0,2% de gélatine porcine (Sigma-Aldrich, G-6144) et 0,25% de triton X-100

(Sigma-Aldrich, T8787) pendant 1 heure à température ambiante. La saturation des sites non spécifiques avec la gélatine permet de réduire au maximum la fixation non spécifique de l'Ac I. La perméabilisation membranaire avec le triton X-100 rend les protéines intracellulaires accessibles à la fixation de l'Ac I. Il est ainsi possible de s'affranchir de cette étape lorsque les protéines étudiées sont membranaires.

- **Incubation avec les anticorps primaires**

Les cellules sont incubées toute la nuit à 4°C avec 200 µl d'Ac I dilué dans une solution de PBS contenant 0,2% de gélatine. Il est possible de révéler deux ou trois protéines différentes en incubant simultanément les cellules avec les Ac I provenant d'espèces animales différentes. Par ailleurs, pour chaque expérience, il est réalisé un témoin négatif constitué par des cellules incubées seulement avec la solution de PBS contenant 0,2% de gélatine.

- **Incubation avec les anticorps secondaires**

Après 3 rinçages de 10 minutes avec 200 µl de PBS additionné de 0,1% de Tween 20 (Roth, 9127.1, Lagny-sur-Marne, France), les complexes antigène-Ac sont révélés en incubant les cellules simultanément pendant 1 heure, à température ambiante et à l'abri de la lumière, avec 200 µl du mélange d'Ac II, dirigés contre les Ac I et couplés à des fluorochromes différents, dilués dans la solution de PBS contenant 0,2% de gélatine. Les cellules sont ensuite rincées 3 x 10 minutes avec 200 µl de PBS contenant 0,1% de Tween 20.

- **Marquage des lysosomes**

Après incubation avec les Ac II, les lysosomes sont marqués à l'aide du LysoTracker Red DND-99 (Fisher Scientific, L7528). La solution stock à 1 mM, préparée dans le DMSO (Thermoscientific, 85190), est diluée dans le PBS, afin d'obtenir une solution finale à 50 nM. Deux cents microlitres de cette solution sont ajoutés dans chaque puits, puis la plaque est incubée pendant 30 minutes, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Trois rinçages de 10 minutes sont réalisés avec 200 µl de PBS à l'abri de la lumière.

- **Marquage du cytosquelette et/ou des noyaux**

Le marquage du cytosquelette est réalisé après l'incubation avec les Ac II et éventuellement le marquage des lysosomes. Pour cela, les cellules sont incubées avec 200 µl de la solution de phalloïdine couplée à l'Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, A12379), diluée au 1/40<sup>e</sup> dans du PBS, pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la

lumière. Trois rinçages de 10 minutes sont également réalisés avec 200 µl de PBS à l'abri de la lumière.

Enfin, afin de marquer les noyaux, les cellules sont incubées avec 200 µl des solutions de DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole; Calbiochem, 268298, Merck, Fontenay-sous-Bois, France) ou de TO-PRO-3 iodide (Molecular Probes, T3605) dilué au 1/1000<sup>e</sup> dans du PBS pendant respectivement 10 et 20 minutes, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Trois rinçages de 10 minutes avec 200 µl de PBS sont ensuite réalisés à l'abri de la lumière.

- **Montage des lamelles et observation du marquage**

Les lamelles sont rincées avec 400 µl d'eau bidistillée, puis montées sur des lames en verre (SuperFrost, Roth) avec du milieu de montage aqueux (Fluoromount, SouthernBiotech, 0100-01, Clinisciences, Nanterre, France). Les lames sont laissées à sécher toute la nuit à l'abri de la lumière, puis lutées avec du vernis à ongles transparent et conservées à l'abri de la lumière à 4°C.

Les marquages sont visualisés à l'aide d'un microscope confocal (Leica DMI8, Leica Microsystem, Nanterre, France) à la plateforme d'imagerie de la Faculté de Pharmacie.

L'ensemble des protéines étudiées par immunocytochimie, ainsi que les Ac I et II utilisés pour leur révélation sont résumés dans le tableau IX.

**Tableau IX: Conditions expérimentales utilisées au cours  
des immunocytochimies**

<b>Expériences réalisées sur les cultures primaires de microglies</b>		
<b>Protéine d'intérêt</b>	<b>Ac I</b>	<b>Ac II</b>
<b>→ Vérification de la pureté de la culture</b>		
<b>Iba1</b>	Ac I de chèvre anti-souris Iba1 (Abcam, ab5076) Dilution: 1/1000 <sup>e</sup>	Ac II d'âne anti-chèvre couplé à l'Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, A11055) Dilution: 1/500 <sup>e</sup>
<b>→ Caractérisation du phénotype microglial</b>		
<b>NOS2</b>	Ac I de lapin anti-souris NOS2 (M-19) (Santa Cruz Biotechnology, sc-650, Clinisciences) Dilution: 1/200 <sup>e</sup>	Ac II d'âne anti-lapin couplé à l'Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, A21206) Dilution: 1/500 <sup>e</sup>
<b>Arginase 1</b>	Ac I de chèvre anti-souris arginase 1 (M-20) (Santa Cruz Biotechnology, sc-18355) Dilution: 1/200 <sup>e</sup>	Ac II d'âne anti-chèvre couplé à la cyanine 3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 705-165-147, Interchim) Dilution: 1/500 <sup>e</sup>
<b>→ Etude de la translocation d'AIF (activation de la PARP)</b>		
<b>AIF</b>	Ac I de lapin anti-souris AIF (Merck Millipore, AB16501) Dilution: 1/200 <sup>e</sup>	Ac II d'âne anti-lapin couplé à la cyanine 3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 711-165-152) Dilution: 1/500 <sup>e</sup>
<b>→ Etude de la phagocytose des débris de myéline</b>		
<b>MBP</b>	Ac I lapin anti-souris MBP (Merck Millipore, AB980) Dilution: 1/200 <sup>e</sup>	Ac II d'âne anti-lapin couplé à l'Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, A21206) Dilution: 1/500 <sup>e</sup>

**Tableau IX (Suite): Conditions expérimentales utilisées au cours des immunocytochimies**

Expériences réalisées sur les cultures primaires d'oligodendrocytes		
Protéine d'intérêt	Ac I	Ac II
<b>→Vérification de la pureté et de la différenciation</b>		
<b>MBP</b>	Ac de chèvre anti-souris MBP (Santa Cruz Biotechnology, sc-13914) Dilution: 1/200 <sup>e</sup>	Ac II d'âne anti-chèvre couplé à l'Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, A11055) Ac II d'âne anti-chèvre couplé à la cyanine 3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 711-165-147) Dilution: 1/500 <sup>e</sup>
<b>NG2</b>	Ac I de lapin anti-souris NG2 (Merck Millipore, AB5320) Dilution: 1/200 <sup>e</sup>	Ac II anti-lapin couplé à la cyanine 3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 711-165-152) Ac II anti-lapin à l'Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, A21206) Dilution: 1/500 <sup>e</sup>
<b>GFAP</b>	Ac I de lapin anti-souris GFAP (Merck Millipore, AB5320) Dilution: 1/1000 <sup>e</sup>	Ac II d'âne anti-lapin couplé à cyanine 3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 711-165-152) Ac II d'âne anti-lapin à l'Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, A21206) Dilution: 1/500 <sup>e</sup>
<b>Iba 1</b>	Ac I de chèvre anti- souris Iba1 (Abcam, ab5076,) Dilution: 1/1000 <sup>e</sup>	Ac II d'âne anti-chèvre couplé à l'Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, A11055) Ac II d'âne anti-chèvre couplé à la cyanine 3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 711-165-147) Dilution : 1/500 <sup>e</sup>

*Abréviations: Ac, anticorps; AIF, apoptosis inducing factor; GFAP, glial fibrillary acidic protein; Iba1, ionized calcium binding adapter molecule 1; MBP, myelin basic protein; NG2, neural/glial antigen 2; NOS2, NO-synthase 2*

## 6.2. Western blot

### 6.2.1. Principe

Le WB est une technique semi-quantitative permettant de détecter et d'identifier des protéines dans un échantillon biologique. Les protéines des échantillons sont séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (en présence de dodécylsulfate de sodium ou SDS), transférées sur une membrane en polyfluorure de vinylidène (PVDF), puis révélées grâce à des Ac spécifiques.

### 6.2.2. Protocole expérimental

#### 6.2.2.1. Préparation des échantillons

Pour la réalisation des WB, les cultures primaires de microglies sont ensemencées à 400 000 cellules/ml sur des plaques de 12 ou 24 puits.

Après 24 heures de traitement, les surnageants sont recueillis et conservés à -40°C pour des dosages ultérieurs, et les cellules sont lavées avec 500 µl de PBS.

L'extraction des protéines est réalisée en plaçant les plaques sur un bac à glace à 4°C. Un volume de 20 ou 40 µl (selon que l'on utilise une plaque de 24 ou 12 puits) de tampon d'extraction à pH 7,6 (Tris à 50 mM, NaCl à 150 mM, Nonidet P-40 à 1%, SDS à 0,1%, acide désoxycholique à 0,1%, HCl à 5 M pour ajuster le pH), contenant des inhibiteurs de protéases (Complete Tablets, EDTA Free, Mini EASY pack, Roche, 04693159001, Merck; 1 pastille/10 ml), est ajouté dans tous les puits. Après 30 minutes d'incubation à 4°C, les puits sont grattés à l'aide d'un cône de pipette 200 dont l'extrémité a été préalablement coupée et les lysats cellulaires sont ensuite prélevés dans des tubes eppendorfs de 1,5 ml. Les tubes sont centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C.

Deux microlitres de chaque échantillon sont utilisés pour le dosage des protéines par la méthode microBCA (Acide bicinchonique). Le reste des échantillons est dilué au 1/2 dans du tampon Laemmli (Tris-HCl à 125 mM pH 6,8 contenant 20% de glycérol, 4% de SDS, du dithiothréitol à 130 mM et quelques grains de bromophénol) et chauffé à 96°C pendant 10 minutes.

#### 6.2.2.2. Dosage des protéines par la méthode microBCA

Le dosage est réalisé à l'aide du kit « Bicinchoninic Acid Protein Assay » (Sigma-Aldrich, B9643). Ce kit est constitué de 2 réactifs, le réactif A (BCA, carbonate de sodium, tartrate de sodium, bicarbonate de sodium, NaOH à 0,1 N, pH=11,25) et le réactif B (4% de pentahydrate de sulfate de fer II).

Le principe du dosage repose sur la formation, dans des conditions alcalines ( $\text{OH}^-$ ), d'un complexe protéine- $\text{Cu}^{2+}$ , suivi d'une réduction du  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$ . L'ion  $\text{Cu}^+$  ainsi formé est détecté par colorimétrie en formant un complexe violet avec le BCA. L'absorbance mesurée est ainsi proportionnelle à la quantité de protéines présente dans l'échantillon.

La méthode microBCA permet de détecter une gamme de concentrations environ 20 fois plus faible que la méthode BCA classique. En raison de cette plus grande sensibilité, il est donc possible de diluer davantage les échantillons avant leur dosage.

L'étalonnage est réalisé à l'aide d'une gamme de BSA (Sigma-Aldrich, A3059) de concentrations comprises entre 10 et 250  $\mu\text{g/ml}$ , alors que pour la BCA classique la gamme est comprise entre 100  $\mu\text{g/ml}$  et 1,5  $\text{mg/ml}$ . Les échantillons sont dilués au  $1/25^{\text{e}}$  dans de l'eau bidistillée. Le blanc (eau bidistillée), la gamme, ainsi que les échantillons dilués sont ensuite déposés en duplicate à raison de 20  $\mu\text{l}$ /puits sur une plaque de 96 puits. Deux cents microlitres de la solution de travail, constituée du mélange des réactifs A et B dans un rapport 100:2, sont ajoutés dans tous les puits. Après 2 heures d'incubation dans une étuve à  $37^\circ\text{C}$  et à l'abri de la lumière, la mesure des absorbances est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre (SPECTROstar<sup>Nano</sup>, BMG Labtech) à 562 nm. Les résultats sont exprimés en mg de protéines totales/ml.

### 6.2.2.3. Réalisation du WB

La technique du WB se déroule sur 2 ou 3 jours. Elle implique des étapes d'électrophorèse, de transfert, de blocage des sites non spécifiques, d'immunomarquage, puis de révélation.

- **Électrophorèse**

Les échantillons sont déposés à quantité constante (25 à 50  $\mu\text{g/ml}$ ) en protéines sur un gel de concentration de 4,15% d'acrylamide (Tableau X), puis les protéines sont séparées par électrophorèse sur un gel de séparation de 8 ou 15% d'acrylamide (selon le poids moléculaire de la protéine d'intérêt; Tableau X) dans un tampon d'électrophorèse (Tris à 125 mM, glycine à 960 mM, SDS à 0,5%) à courant constant de 25 mA par gel pendant environ 2 heures.

Des marqueurs de poids moléculaire (Bio-Rad, 161-0374; GE Healthcare, RPN800E, Buc, France), ainsi que des témoins positifs contenant la protéine d'intérêt sont utilisés.

**Tableau X: Composition des gels de concentration et de migration utilisés pour la réalisation des WB**

Composition	Gel de concentration (4,15% d'acrylamide)	Gel de migration	
		8% d'acrylamide	15% d'acrylamide
Acrylamide à 30%	1,4 ml	5,3 ml	10 ml
Tris-HCl à 0,5 M (pH=6,8)	2,5 ml	-	-
Tris-HCl à 1,5 M (pH=8,8)	-	5 ml	5 ml
Eau bidistillée	6 ml	9,4 ml	4,7 ml
SDS à 10%	100 µl	200 µl	200 µl
Persulfate d'ammonium (APS)	100 µl	200 µl	200 µl
Tétraméthyléthylènediamine (TEMED)	10 µl	20 µl	20 µl

*Abréviation: SDS, dodécylsulfate de sodium*

- **Transfert**

Les protéines sont transférées sur des membranes en PVDF de porosité 0,45 µm (préalablement activées pendant environ 5 minutes dans l'éthanol absolu) dans un tampon de transfert (Tris à 500 mM, glycine à 384 mM, éthanol à 20%) pendant 1 heure à 100 volts.

- **Blocage des sites non spécifiques**

Les sites non spécifiques sont bloqués en incubant les membranes, sous agitation pendant 1 heure à température ambiante, avec une solution de TBS (Tris-Buffered Saline) à pH=7,6 (Tris à 10 mM, NaCl à 142 mM) contenant 0,1% de Tween 20 (TTBS) et 5% de lait écrémé.

- **Immunomarquage**

Les membranes sont incubées sous agitation toute la nuit à 4°C avec les Ac I dilués dans la solution de blocage (TTBS contenant 5% de lait écrémé).

Il est possible de couper les membranes et d'incuber simultanément avec plusieurs Ac I dirigés contre des protéines de poids moléculaires suffisamment différents.

Après un lavage de 15 minutes et 2 lavages de 5 minutes avec la solution de TTBS, les membranes sont incubées sous agitation et à l'abri de la lumière pendant 1 heure à

température ambiante avec les Ac II couplés à la fluorescéine (FITC) dilués dans la solution de blocage. Un lavage de 15 minutes et 2 lavages de 5 minutes sont ensuite réalisés avec le TTBS.

Afin d'amplifier le signal, les membranes sont incubées sous agitation et à l'abri de la lumière pendant 1 heure à température ambiante avec un Ac III anti-fluorescéine couplé à la phosphatase alcaline (Sigma-Aldrich, A5719) dilué au 1/1000<sup>e</sup> dans la solution de blocage.

- **Révélation par chimiofluorescence (ECF)**

Après un lavage de 15 minutes et 2 lavages de 5 minutes, les membranes sont incubées avec le réactif ECF (Substrat Enhanced Chimio Fluorescence, Kit GE Healthcare, RPN5780), substrat de la phosphatase alcaline, pendant 20 minutes à l'abri de la lumière. Enfin, les membranes sont scannées, puis le signal est quantifié à l'aide du Storm 860 (GE Healthcare).

- **Analyse des résultats**

Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (UA) après soustraction du bruit de fond. Afin de tenir compte des différences entre les membranes, au moins un point commun est déposé sur les différents gels et un facteur de correction est ainsi calculé pour chaque protéine. Les résultats sont ensuite rapportés aux valeurs d'une protéine de référence, l'actine.

- **Décapage des membranes**

Après une première révélation, il est possible de décaper les membranes, afin de les incuber avec d'autres Ac I. Pour cela, les membranes sont incubées sous agitation pendant 30 minutes à 60°C dans une solution de décapage (Tris-HCl à 62 mM pH=6,08 contenant du  $\beta$ -mercaptoéthanol à 100 mM et 2% de SDS), puis rincées abondamment avec de l'eau bidistillée.

Après 2 lavages de 5 minutes avec le TTBS et le blocage des sites non spécifiques, comme décrit précédemment, les membranes sont à nouveau incubées avec d'autres Ac I.

La teneur en acrylamide du gel de séparation utilisé pour chaque protéine, ainsi que les Ac I et II et leurs dilutions, sont résumés dans le tableau XI.

**Tableau XI: Conditions expérimentales utilisées au cours des WB**

Protéine d'intérêt	Gel de séparation (% d'acrylamide)	Ac I	Ac II
NOS2 (130 kDa)	8%	Ac I de lapin anti-souris NOS2 (M-19) (Santa Cruz Biotechnology, sc-650) Dilution: 1/500 <sup>e</sup>	Ac II anti-IgG de lapin couplé à la FITC (Roth, 4752) Dilution: 1/1000 <sup>e</sup>
Arginase 1 (37 kDa)	8%	Ac I de lapin anti-arginase 1 (Fisher Scientific, PA-5-22009) Dilution: 1/2000 <sup>e</sup>	
MBP (14, 17, 18 et 21 kDa)	15%	Ac I de lapin anti-MBP (Merck Millipore, AB980) Dilution: 1/1000 <sup>e</sup>	
Actine (41 kDa)	8%	Ac I de lapin anti-actine (Sigma-Aldrich, A2066) Dilution: 1/2000 <sup>e</sup>	

*Abréviations: Ac, anticorps; MBP, myelin basic protein; NOS2, NO-synthase 2*

## 7. Dosage des nitrites

Les nitrites, les produits d'oxydation du NO, sont dosés à l'aide du réactif de Griess dans les surnageants des cultures primaires de microglies.

### 7.1. Principe

Il s'agit d'un dosage colorimétrique basé sur une réaction de diazotation de sulfanilamide, en présence de nitrites dans un milieu acide, pour former un sel de diazonium. Ce dernier réagit avec le N-(1-naphtyl)éthylènediamine (NED) pour constituer un groupement chromophore de couleur rose mesuré par spectrophotométrie à 540 nm.

### 7.2. Protocole expérimental

Après centrifugation pendant 10 minutes à 10 000 g et à 4°C, les surnageants, ainsi qu'une gamme étalon de 1 à 50 µM, préparée à partir d'une solution de nitrites à 0,1 mM,

sont déposés en duplicate à raison de 50 µl/puits sur une plaque de 96 puits. Cent microlitres de réactif de Griess, constitué d'un mélange équimoléculaire d'une solution de sulfanilamide en milieu acide (sulfanilamide à 1%, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pur (d=1,7) à 0,05%) et d'une solution de NED à 0,1%, sont ajoutés dans tous les puits. Après 10 minutes d'incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante, les absorbances sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre (SPECTROstar<sup>Nano</sup>, BMG Labtech) à des longueurs d'onde comprises entre 538 et 542 nm (range 1). Ces valeurs sont ensuite corrigées par soustraction des absorbances mesurées à des longueurs d'onde comprises entre 636 et 640 nm (range 2). Les résultats sont exprimés soit en concentration de nitrites (µM), soit en quantité de nitrites rapportée à celle des protéines présentes dans l'extrait cellulaire correspondant à chaque surnageant.

## **8. Analyse statistique des résultats**

Les résultats sont exprimés en valeur moyenne  $\pm$  esm (écart standard à la moyenne).

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPadPrism (GraphPad Software, Etats-Unis). Pour toutes les expériences, une analyse de variance (ANOVA) est suivie soit d'un test de Dunnett (en cas de comparaisons à un groupe contrôle), soit d'un test de Bonferroni corrigé (en cas de comparaisons multiples). Une différence est considérée significative pour une valeur de  $p < 0,05$ .

L'analyse statistique correspondante à chaque expérience est décrite dans la légende des figures des résultats.

## **DEUXIÈME PARTIE: EXPÉRIENCES IN VIVO**

Toutes les expériences sont réalisées chez des souris mâles Swiss d'environ 30 g (Janvier Labs) en accord avec la directive européenne relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (2010/63/UE). Toutes les procédures sont approuvées par le comité d'éthique de l'Université Paris Descartes (CEEA34) et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

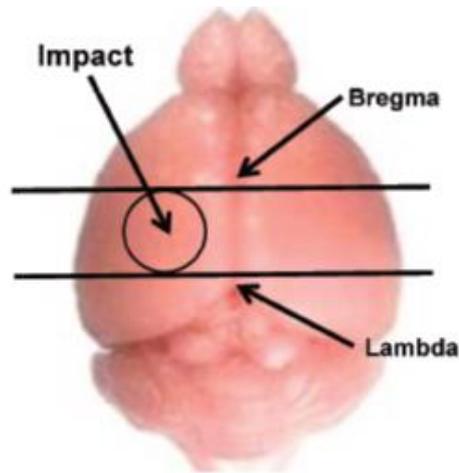
Les souris sont gardées dans une animalerie à 22°C en alternance jour/nuit par cycle de 12 heures avec un libre accès à l'eau et à la nourriture.

### **1. Modèle expérimental de traumatisme crânien par impact cortical contrôlé**

Le TC est réalisé chez les souris par ICC comme précédemment décrit dans la littérature (Smith *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 2005) par le Dr Toufik Taib, ancien doctorant au laboratoire.

L'anesthésie des animaux est induite avec de l'isoflurane (3,5%/100% air) pendant 2 minutes, puis maintenue pendant la chirurgie (1,5%/100% air). Après anesthésie, la souris est placée en contention stéréotaxique et maintenue à une température de  $37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durant toute la chirurgie grâce à une couverture chauffante thermostatée. La peau du crâne est incisée pour permettre l'accès à l'os crânien. En prenant soin de ne pas abîmer la dure-mère, une craniotomie d'un diamètre de 4 mm est réalisée à l'aide d'une fraise dentaire au niveau de l'hémisphère gauche entre le bregma et le lambda (Figure 21). Après calibration, un piston de 3 mm de diamètre délivre un impact direct sur la dure-mère à la vitesse de 3,5 m/s, une profondeur de 0,5 mm et avec un temps de contact de 50 ms. La craniotomie est ensuite rebouchée avec de la cire d'Horsley avant suture de la plaie. Les animaux sont alors placés dans une couveuse thermostatée à 26-28°C jusqu'à leur réveil. Ils sont ensuite remis dans des cages collectives dans l'animalerie.

Les animaux témoins opérés subissent la totalité de la chirurgie, à l'exception de l'impact. Les animaux non opérés ne font l'objet d'aucune chirurgie.



**Figure 21: Zone de la craniotomie et de l'impact lors de l'ICC**

## **2. Sacrifice des animaux et préparation des coupes de cerveaux**

Les animaux sont sacrifiés trois jours après le TC. Ils sont anesthésiés au pentobarbital (150 mg/kg), et perfusés par voie intracardiaque à une pression de 60 mmHg avec 30 ml de NaCl à 0,9%, puis 60 ml de PFA à 4%. Les cerveaux sont prélevés et plongés dans un bain de sucrose à 30% pendant 72 heures. Ils sont ensuite plongés dans l'isopentane à -40°C pendant 24 heures pour être congelés, puis ils sont conservés à -80°C.

Des coupes coronales de cerveau de 20  $\mu\text{m}$  sont réalisées à l'aide d'un cryostat, tous les 300  $\mu\text{m}$  entre les niveaux +2 mm et -4 mm par rapport au bregma, par le doctorant Clément Delage. Au total une vingtaine de coupes par cerveau sont réparties sur 1 ou 2 lames gélatinées, puis conservées à -20°C jusqu'au jour de la réalisation de l'immunohistochimie (IHC).

## **3. Immunohistochimie**

### **3.1. Principe**

L'IHC est une technique d'immunomarquage *in vivo* permettant la révélation de protéines ou d'antigènes à l'intérieur de sections tissulaires. Elle repose sur le même principe que l'immunocytochimie et fait donc également appel à un Ac I et un Ac II couplé à un fluorophore.

### **3.2. Protocole expérimental**

Le protocole d'IHC a nécessité des étapes de mise au point pour le choix des conditions expérimentales. Les détails concernant notamment les étapes de post-fixation et de blocage des sites non spécifiques seront décrit dans le paragraphe « 1. Mise au point de la technique

d'immunohistochimie » de la section « IV. Mise en évidence *in vivo* des débris de myéline et caractérisation des phénotypes microgliaux après traumatisme crânien chez la souris » de la partie « Résultats ».

Brièvement, après décongélation, les coupes de cerveaux sont post-fixées à l'acétone ou au PFA à 4%, puis réhydratées pendant 15 minutes dans une solution de PBS (NaCl à 137 mM, KCl à 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 8,1 mM, KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 1,5 mM).

Après saturation des sites non spécifiques pendant 1 heure avec une solution de blocage, les coupes sont incubées en présence de l'Ac I toute la nuit à 4°C en chambre humide.

Le lendemain, les lames sont lavées 3 x 5 minutes dans des bains de PBS contenant 0,1% de Tween 20. Elles sont ensuite incubées pendant 1h30 en chambre humide avec les Ac II correspondants, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après 3 rinçages de 5 minutes avec du PBS additionné de 0,1% de Tween 20 et un rinçage de 5 minutes avec du PBS, les lames sont incubées avec une solution de DAPI dilué au 1/500<sup>e</sup> dans du PBS, pendant 10 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Trois nouveaux rinçages de 5 minutes sont réalisés dans des bains de PBS, puis les lames sont recouvertes avec des lamelles à l'aide de Fluoromount, à l'abri de la lumière.

Des témoins négatifs sont réalisés à partir de coupes de cerveaux de souris témoins non opérées ou témoins opérées. Ces lames subissent le même protocole que les autres à l'exception de l'incubation avec les Ac I.

Une fois lutées avec du vernis à ongle transparent, les lames sont observées et photographiées au microscope confocal. Les photographies ont été prises au niveau du corps calleux, une zone riche en SB particulièrement impactée dans ce modèle.

Les conditions expérimentales des marquages des débris de myéline, des microglies/macrophages de phénotype M1 et des microglies/macrophages de phénotype M2 qui ont été réalisés sont décrites dans le Tableau XII.

Les Ac I spécifiques des débris de myéline (anti-dMBP) et des protéines NOS2 (phénotype M1) et CD206 (phénotype M2) étant tous issus de la même espèce (lapin), les IHC ont été réalisées séparément sur des coupes différentes, avec un Ac I anti-Iba-1 d'une espèce différente. Trois IHC ont ainsi été réalisées selon les triples marquages suivants: Iba-1/dMBP/DAPI, Iba-1/NOS2/DAPI, Iba-1/CD206/DAPI.

**Tableau XII: Conditions expérimentales utilisées lors des immunohistochimies**

Protéine d'intérêt	Ac I	Ac II
<b>→ Marquage des microglies/macrophages</b>		
<b>Iba1</b>	Ac I de chèvre anti-souris, (Abcam, ab5076) Dilution: 1/500 <sup>e</sup>	Ac d'âne anti-chèvre couplé à l'Alexa Fluor 488, (Molecular Probes, A-11055) Dilution: 1/500 <sup>e</sup>
<b>→ Marquage des débris de myéline</b>		
<b>Myéline dégradée</b>	Ac I anti-dMBP de lapin (Merck Millipore, A5864) Dilution: 1/2000 <sup>e</sup>	Ac II d'âne anti-lapin couplé à la cyanine 3 (Jackson ImmunoResearch, 711- 165-152) Dilution: 1/400 <sup>e</sup>
<b>→ Marquage des microglies/macrophages de phénotype M1</b>		
<b>NOS2</b>	Ac I anti-NOS2 de lapin (Santa Cruz, sc-650) Dilution: 1/100 <sup>e</sup>	Ac II d'âne anti-lapin couplé à la cyanine 3 (Jackson ImmunoResearch, 711- 165-152) Dilution: 1/400 <sup>e</sup>
<b>→ Marquage des microglies/macrophages de phénotype M2</b>		
<b>CD206</b>	Ac anti-CD206 de lapin (Proteintech 8704-1-AP) Dilution: 1/100 <sup>e</sup>	Ac II d'âne anti-lapin couplé à la cyanine 3 (Jackson ImmunoResearch, 711- 165-152) Dilution: 1/400 <sup>e</sup>

*Abréviations: CD, cluster of differentiation; Iba1, ionized calcium binding adapter molecule 1; NOS2, NO-synthase 2*

# RÉSULTATS ET DISCUSSION

## 1. Mise au point des cultures primaires de microglies et d'oligodendrocytes de souris

Les expériences *in vitro* ont été réalisées sur des cultures primaires de microglies de souris ayant préalablement nécessité une étape d'optimisation pour améliorer le rendement et la qualité. Par ailleurs, afin de pouvoir étudier les conséquences des modifications phénotypiques microgliales induites par les débris de myéline sur les oligodendrocytes, nous avons commencé la mise au point d'une culture d'oligodendrocytes matures de souris.

### 1.1. Optimisation du protocole de la culture primaire de microglies

Au moment où j'ai commencé ma thèse, la culture primaire de microglies de souris n'avait que récemment été introduite au laboratoire par le Dr Claire Leconte, et elle nécessitait encore une importante étape d'optimisation. En effet, au cours de mon Master 2, nous avons été confronté à un problème de faible rendement cellulaire et de contaminations fréquentes. De plus, mes résultats avaient mis en évidence une importante activation microgliale à l'état basal, c'est-à-dire en l'absence de stimulus, de 75%.

La première étape de mon travail de thèse a donc été de modifier plusieurs paramètres de la culture, afin de:

- ✓ réduire les contaminations;
- ✓ réduire l'activation microgliale à l'état basal;
- ✓ augmenter le rendement.

Les modifications, que nous avons réalisées, sont issues de protocoles décrits dans la littérature (McCarthy et de Vellis, 1980; Ni et Aschner, 2010; Witting et Möller, 2011; Chhor *et al.*, 2013), et de conseils du Dr Juliette Van Steenwinckel, ingénieure de recherche dans l'équipe du Dr Pierre Gressens (INSERM U1141 PROTECT, Hôpital Robert Debré, Paris).

Les principales modifications apportées par rapport au protocole initial sont résumées dans le tableau XIII.

**Tableau XIII: Principales modifications apportées au protocole de culture primaire de microglies de souris**

Etape de la culture	Paramètre	Condition initiale	Condition après modification	Effet de la modification
Dissection	Composition du milieu de dissection	DMEM HG	DMEM HG contenant 0,2 mg/ml de streptomycine et 200 U/ml de pénicilline	↓ contaminations
	Nombre de cortex/flasque	6-8	3-4	↑ rendement
Culture gliale mixte	Suppléments ajoutés au milieu de culture DMEM HG	- 10% de SVF - 10% de sérum de cheval - 2 mM de glutamine - 0,05 mg/ml de streptomycine et 50 U/ml de pénicilline	- 10% de SVF - 2 mM de glutamine - 1 µg/ml streptomycine et 1 U/ml pénicilline	↑ rendement
	Fréquence des changements de milieu de culture	J1, J4 et J7	J7 (changements plus fréquents, si nécessaire)	- ↑ rendement - ↓ activation microgliale basale
Culture primaire de microglie	Densité cellulaire d'ensemencement	1,2 million de cellules/ml	400 000 cellules/ml	- ↑ rendement - ↓ activation microgliale basale
	Jour de l'expérience	J21 = 7 jours après ensemencement	J16 = 2 jours après ensemencement	- ↓ activation basale - ↑ réactivité de la microglie
	Changement complet de milieu de culture au moment du traitement	Oui	Non	↓ activation microgliale basale

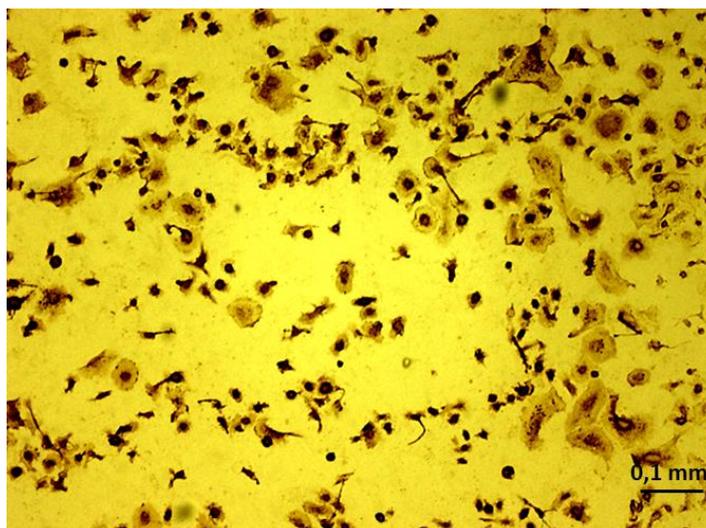
*Abréviations: DMEM HG, dulbecco's modified eagle's medium high glucose; SVF, sérum de veau foetal*

### **Objectif 1: Réduire les contaminations microbiennes**

Les contaminations microbiennes ayant principalement comme origine une asepsie insuffisante ou des gestes inadaptés de l'expérimentateur, nous avons renforcé les conditions d'asepsie au moment de la dissection et pendant la culture gliale. Ainsi, pour réaliser les dissections, nous avons ajouté 2% (V/V) de la solution d'antibiotiques, afin d'obtenir des concentrations finales de streptomycine de 0,2 mg/ml et de pénicilline de 200 U/ml dans le milieu de dissection (DMEM HG), qui n'en contenait pas initialement. Par contre, la quantité d'antibiotiques ajoutée dans le milieu de culture est passée de 0,5% (streptomycine à 0,05 mg/ml et pénicilline à 50 U/ml) à 0,01% (streptomycine à 1 µg/ml et pénicilline à 1 U/ml), afin de ne pas masquer une contamination éventuelle. Ces mesures nous ont ainsi permis de supprimer les contaminations de la culture de microglie.

### **Objectif 2: Réduire l'activation microgliale à l'état basal**

Comme mentionné précédemment, les résultats de mon Master 2 avaient mis en évidence une activation microgliale basale de 75% une semaine après ensemencement, avec une microglie principalement de morphologie hypertrophique (Figure 22). Cet état d'activation a déjà été décrit dans des conditions contrôles (Boche *et al.*, 2013), et pourrait s'expliquer par la difficulté à maintenir une microglie à l'état quiescent dans les conditions *in vitro*. En effet, différents paramètres liés aux conditions de culture cellulaire peuvent être à l'origine de cette activation microgliale. Tout d'abord, le taux d'ensemencement pourrait être un facteur influençant l'activation de la microglie. Dans nos conditions expérimentales initiales, les cellules étaient ensemencées à 1,2 million/ml, et il est possible que cette densité cellulaire soit trop importante et que les microglies puissent alors s'activer les unes les autres. En effet, dans le cerveau, les microglies ne sont pas en contact entre elles, mais plutôt avec d'autres cellules (Bennaroch, 2013). De plus, il faut savoir que dans un cerveau sain des signaux provenant de l'environnement de la microglie permettent de la maintenir à l'état quiescent; ces signaux peuvent notamment provenir des neurones adjacents. Ainsi, dans les conditions *in vitro*, l'absence de signaux « off » par les cellules voisines pourrait aussi être à l'origine de l'activation microgliale. Enfin, au cours de la préparation de la culture primaire de microglie, les changements de milieux pourraient également contribuer à activer la microglie.

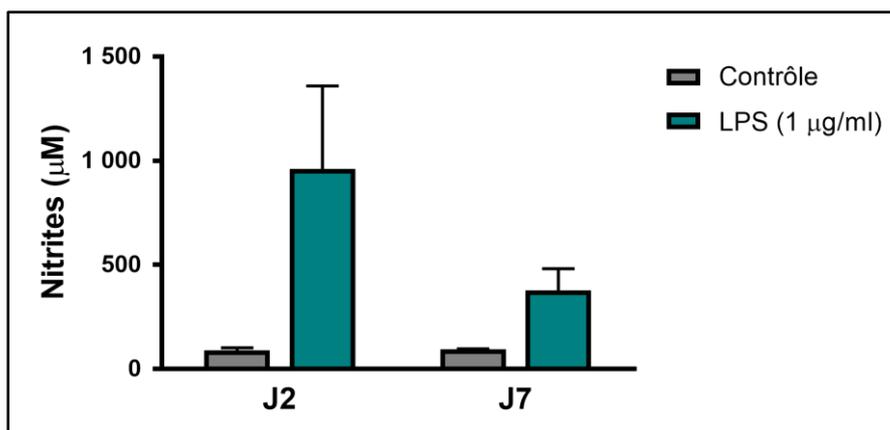


**Figure 22: Photo représentative de microglies activées à l'état basal avec une prédominance de la morphologie hypertrophique**

*Les photos sont prises à l'aide d'un microscope optique (grossissement x100).*

Afin de maintenir les cultures de microglies à l'état quiescent, nous avons, d'une part, diminué la densité cellulaire, et d'autre part, changé la méthode de traitement des cellules. Ainsi, au lieu de changer la totalité du milieu des puits, nous avons par la suite simplement ajouté dans chaque puits un faible volume (5% du volume final de chaque puits) de la solution concentrée de traitement, afin d'obtenir la concentration finale souhaitée. Un volume de milieu de culture équivalent est préalablement retiré de chaque puits.

Par ailleurs, initialement, les traitements étaient réalisés une semaine après l'ensemencement. Or, dans les protocoles décrits dans littérature et sur lesquels nous nous sommes basés (cités précédemment), les expériences sont réalisées le plus souvent 2 jours après ensemencement. Ainsi, le maintien des microglies jusqu'à une semaine après leur ensemencement pourrait également expliquer l'importante activation basale. Afin d'évaluer la réactivité des cellules, les cultures microgliales ont été traitées avec du LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ; Chhor *et al.*, 2013) 2 jours (J2) ou une semaine (J7) après leur ensemencement, et au bout de 24 heures, les surnageants ont été prélevés pour doser les nitrites, qui sont le reflet de la production de NO par la NOS2, induite en cas d'activation microgliale. Nos résultats montrent que la production de nitrites est semblable dans la condition contrôle (PBS) à J2 ou J7 (Figure 23). Par contre, les cellules traitées par le LPS à J7 semblent moins réactives que celles traitées à J2. En effet, en réponse au LPS, les microglies traitées 7 jours après ensemencement produisent environ 2 fois moins de NO que celles traitées à J2. Au vu de ce résultat, les expériences ont été réalisées 2 jours après ensemencement de la microglie dans la suite du travail.



**Figure 23: Mesure de la réactivité microgliale par dosage des nitrites dans les surnageants de cultures microgliales traitées, 2 ou 7 jours après ensemencement, par du LPS pendant 24 heures**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  esm; N=2-3. Les contrôles sont des microglies traitées par le solvant du LPS (PBS).

### Objectif 3: Améliorer le rendement

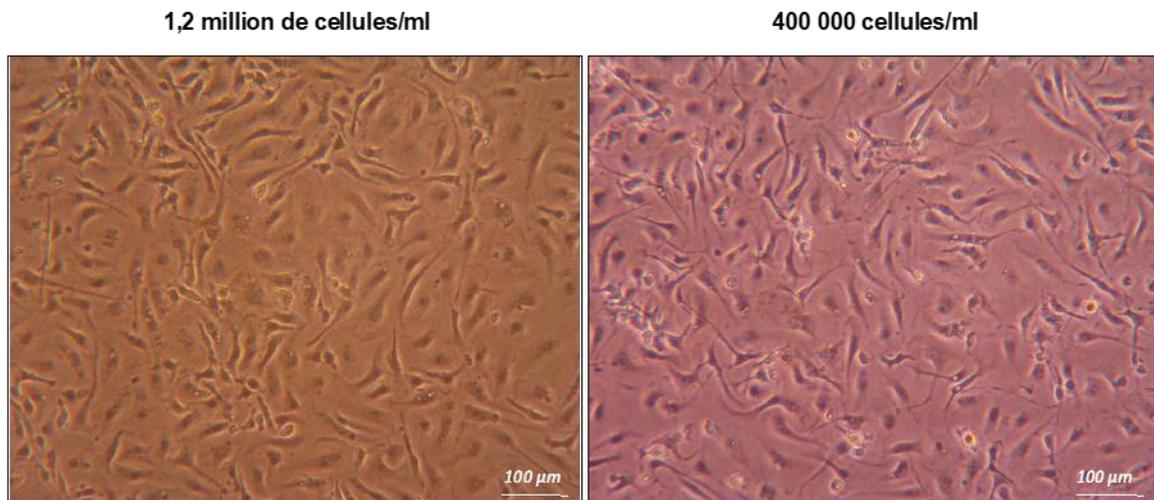
Le but était d'augmenter le nombre de cellules obtenu à la fin de la culture de microglies.

Nous avons constaté que le rendement de la culture n'était pas corrélé au nombre de cortex disséqué mis en culture par flasque, et que généralement, des quantités quasiment identiques de cellules étaient récoltées à partir de 6-7 ou de 3-4 cortex par flasque (environ 300 000 cellules/flasque). Cette réduction nous a permis d'augmenter le nombre de flasques préparées à partir de chaque dissection.

La microglie constituant la couche cellulaire la moins adhérente des 3 populations cellulaires de la culture gliale mixte, des changements trop fréquents du milieu de culture sont accompagnés d'une perte assez importante de microglies. Pour cette raison, nous avons décidé de limiter le nombre de changement de milieu et nous sommes ainsi passés de 3 changements à J1, 3 et 7 à un seul changement à J7. Toutefois, des changements supplémentaires peuvent être réalisés, si de nombreux débris cellulaires sont observés dans les flasques.

Après isolement de la microglie à J14, nous avons également réduit la densité d'ensemencement de 1,2 million à 400 000 cellules/ml (Chhor *et al.*, 2013). En effet, les cellules non adhérentes étant éliminées lors du changement de milieu, un ensemencement à une trop forte densité cellulaire s'accompagne d'une perte cellulaire importante. Ainsi, comme illustré dans la Figure 24, des tapis cellulaires semblables sont obtenus au bout de 2 jours de culture, que les cellules soient ensemencées à 1,2 millions ou 400 000 cellules/ml.

La réduction de la densité cellulaire d'ensemencement nous a ainsi permis d'augmenter le nombre de plaques préparées par culture.



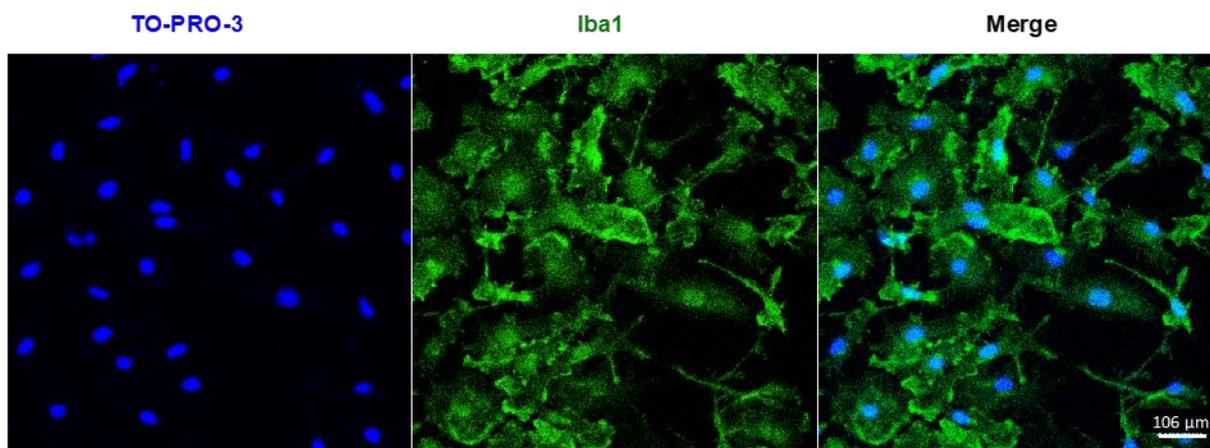
**Figure 24: Photos représentatives de cultures de microglies 2 jours après ensemencement à différentes densités cellulaires**

*Les photos sont prises à l'aide d'un microscope inversé à contraste de phase (grossissement x100).*

## **1.2. Vérification de la pureté de la culture primaire de microglies**

Une fois le protocole de culture de microglies optimisé, nous avons vérifié sa pureté en réalisant une immunocytochimie pour mettre en évidence la microglie par un Ac I anti-Iba1 et les noyaux par le TO-PRO-3. Le pourcentage de pureté est calculé en rapportant le nombre de cellules Iba1<sup>+</sup> sur le nombre total de noyaux, et ceci sur 6 champs différents de chaque culture (N=3). **Le pourcentage de pureté obtenu est de 98%** (Figure 25).

Pour conclure, l'ensemble des modifications apportées, aussi bien à la culture gliale mixte qu'à celle de la microglie, nous a permis (1) d'augmenter considérablement le rendement de la culture primaire de microglies, et (2) d'obtenir une microglie « quiescente » avec un aspect ramifié à l'état basal (Figures 24 et 25), condition indispensable pour la suite de mon projet de thèse.



**Figure 25: Photos représentatives de la pureté de la culture de microglies par immunocytochimie TO-PRO-3/Iba1**

*Les photos, prises au microscope confocal (grossissement x40), montrent le marquage des noyaux par le TO-PRO-3, des microglies par Iba1, ainsi que le co-marquage (merge).*

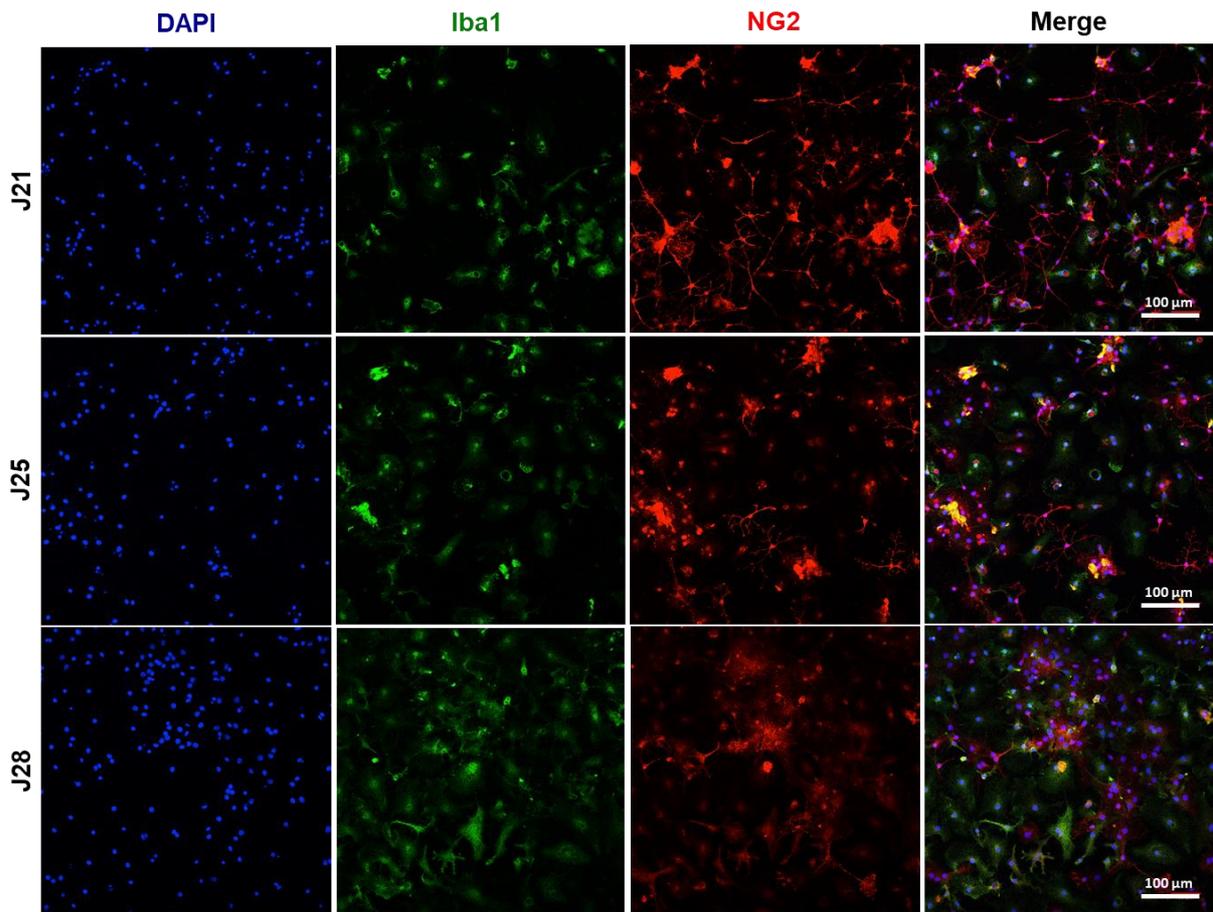
### 1.3. Mise au point de la culture primaire d'oligodendrocytes

L'objectif de la mise au point d'une culture d'oligodendrocytes est de pouvoir étudier les conséquences des modifications phénotypiques microgliales, induites par les débris de myéline, sur la survie des oligodendrocytes. Après récupération des microglies à partir de la culture mixte de cellules gliales, nous avons essayé de mettre au point un protocole qui consiste à isoler les OPC de leur support astrocytaire, puis de les différencier en oligodendrocytes matures.

Pour cette mise au point, nous nous sommes basés sur un protocole préalablement introduit au laboratoire par le Dr Claire Leconte, permettant d'isoler les OPC après 10 jours de culture gliale mixte, puis de les différencier en oligodendrocytes matures pendant 18 jours. Afin de pouvoir réaliser nos expériences sur des microglies et des oligodendrocytes matures issus de la même culture, nous avons récupéré les OPC après 14 jours de culture gliale mixte. Pour cela, tout de suite après la récupération des microglies, du milieu de culture est remis dans les flasques, qui sont ensuite placées dans l'incubateur pendant au moins 2 heures. Une première agitation orbitale (210 rpm, pendant 30 minutes) est réalisée pour éliminer le reste de microglies. Une deuxième agitation orbitale (300 rpm, pendant 16 heures) permet de récupérer les OPC qui sont ensuiteensemencés à 200 000 cellules/ml dans le milieu de culture 10/1. Au bout de 4 heures, le milieu est remplacé par un milieu de prolifération (OL1). Ce dernier est changé au bout de 3 jours (J18). Après une semaine de prolifération (J21), le milieu de OL1 est remplacé par un milieu de différenciation (OL2). Ce dernier est également changé au bout de 3 jours (J25).

Dans une première expérience, des cellules ont été fixées à différents temps de différenciation: J21 (sans phase de différenciation), J25 (4 jours de différenciation) et J28 (7 jours de différenciation). Des immunocytochimies ont ensuite été réalisées, afin de vérifier la pureté de la culture et/ou la maturation des oligodendrocytes.

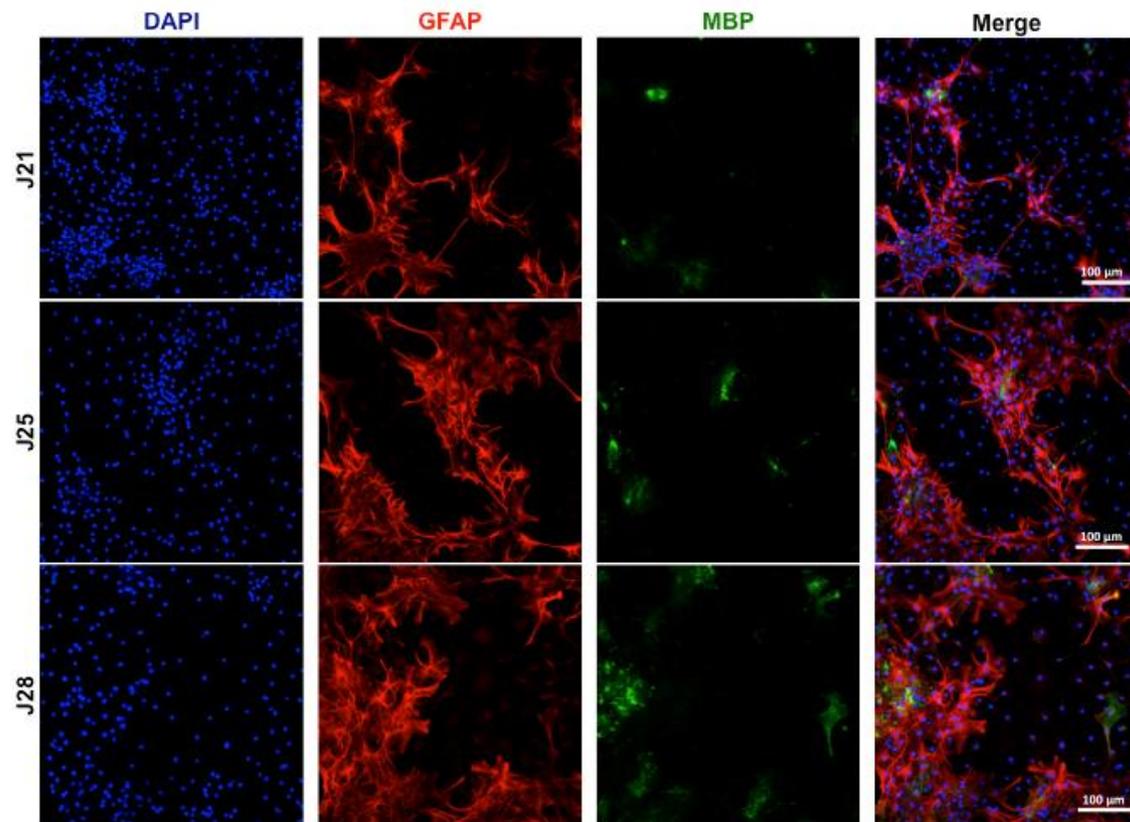
Les résultats ont révélé une forte contamination de la culture par les microglies, mise en évidence par un marquage Iba1 (Figure 26), et surtout par les astrocytes, mise en évidence par un marquage GFAP (Figures 27). De plus, la majorité des cellules se trouve encore à l'état immature après 28 jours de culture. En effet, la protéine NG2, caractéristique des oligodendrocytes immatures, persiste jusqu'à J28 (Figure 26), alors que la protéine MBP, caractéristique des oligodendrocytes matures, est faiblement exprimée par les cellules, même au bout de 28 jours de culture (Figure 27).



**Figure 26: Photos représentatives de la pureté et de la différenciation de la culture primaire d'oligodendrocytes, après 21, 25 et 28 jours de culture, par immunocytochimie DAPI/Iba1/NG2**

*Les photos, prises à l'aide d'un microscope confocal (grossissement x20), montrent le marquage des noyaux par le DAPI, des microglies par Iba1 et des oligodendrocytes immatures par NG2, ainsi que le co-marquage (merge); N=1.*

*Abréviations: Iba1, ionized calcium binding adapter molecule 1; NG2, neural/glial antigen 2*



**Figure 27: Photos représentatives de la pureté et de la différenciation de la culture primaire d'oligodendrocytes, après 21, 25 et 28 jours de culture, par immunocytochimie DAPI/GFAP/MBP**

*Les photos, prises à l'aide d'un microscope confocal (grossissement x20), montrent le marquage des noyaux par le DAPI, des astrocytes par la GFAP et des oligodendrocytes matures par la MBP, ainsi que le co-marquage (merge); N=1.*

*Abréviations: GFAP, glial fibrillary acidic protein; MBP, myelin basic protein*

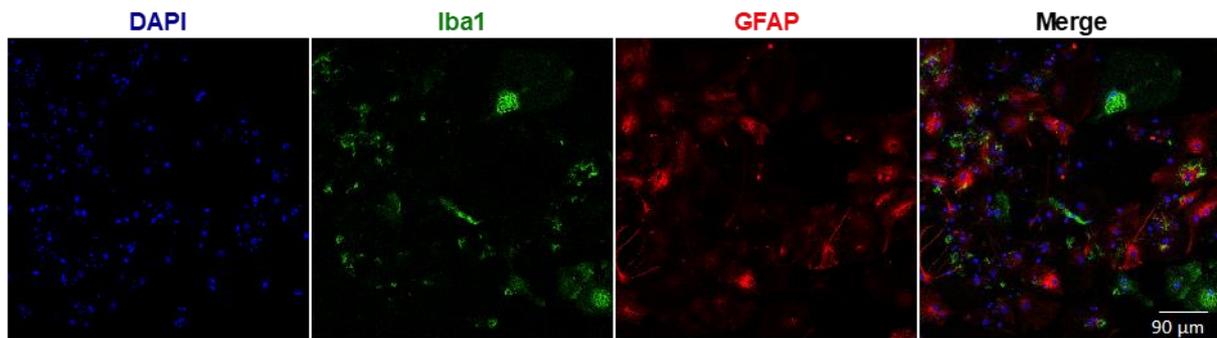
Au vu des résultats de cette première expérience, il était donc nécessaire d'améliorer notre protocole, afin d'augmenter la pureté et la différenciation des oligodendrocytes. Après plusieurs essais, des modifications ont progressivement été apportées; ces dernières sont résumées dans le tableau XIV.

**Tableau XIV: Principales modifications apportées au protocole  
de culture primaire d'oligodendrocytes**

<b>Objectif</b>	<b>Modifications apportées</b>
<b>Réduire la contamination microgliale</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Avant de procéder à l'isolement des OPC, effectuer 3 rinçages avec du milieu de culture (5 ml/flasque) pour éliminer le reste de microglies flottantes.</li> <li>- Après isolement des OPC, incuber la suspension cellulaire pendant 1 heure dans des flasques non traitées avec la poly-D-lysine, pour permettre à la microglie flottante d'adhérer au fond de la flasque.</li> </ul>
<b>Réduire la contamination astrocytaire</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réduire la vitesse d'agitation orbitale permettant l'isolement des OPC à <b>230 rpm</b>, pour éviter de décoller les astrocytes.</li> <li>- Après isolement des OPC, incuber la suspension cellulaire pendant 1 heure dans des flasques non traitées avec la poly-D-lysine, pour permettre aux astrocytes d'adhérer au fond de la flasque.</li> </ul>
<b>Améliorer la différenciation des OPC en oligodendrocytes matures</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminuer la durée de prolifération à 3 jours, afin d'augmenter celle de la différenciation → le milieu OL1 est remplacé par le milieu OL2 à J18.</li> <li>- Enrichir la composition du milieu OL2 avec 3% (V/V) de SVF. Ce milieu est ensuite changé à J21 et J25.</li> </ul>

*Abréviations: OPC, oligodendrocyte progenitor cell; rpm, rotation par minute; SVF, sérum de veau fœtal*

À la suite de ces modifications, des immunocytochimies ont été réalisées au bout de 28 jours de culture, afin de vérifier la pureté et la maturation des oligodendrocytes. Les résultats montrent une légère amélioration concernant la pureté de la culture (Figure 28). Ainsi, le nombre de microglies est diminué par rapport à la première expérience, et la contamination astrocytaire semble également être réduite.

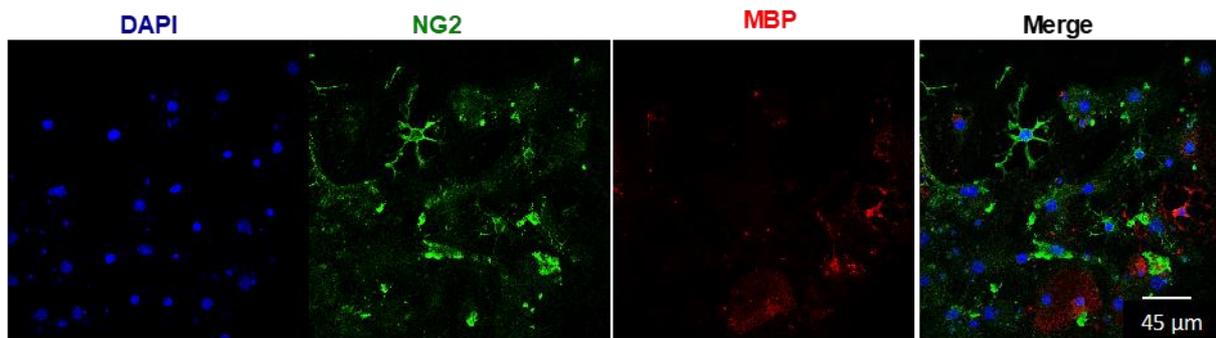


**Figure 28: Photos représentatives de la pureté de la culture primaire d'oligodendrocytes, après 28 jours de culture, par immunocytochimie DAPI/Iba1/GFAP**

*Les photos, prises à l'aide d'un microscope confocal (grossissement x20), montrent le marquage des noyaux par le DAPI, des microglies par Iba1 et des astrocytes par GFAP, ainsi que le co-marquage (merge); N=1.*

*Abréviations: GFAP, glial fibrillary acidic protein; Iba1, ionized calcium binding adapter molecule 1*

Concernant la différenciation, le marquage NG2 est toujours observé à J28 (Figure 29). Toutefois, le marquage MBP semble légèrement augmenté par rapport à la première expérience illustrée par la figure 27.



**Figure 29: Photos représentatives de la différenciation des cultures primaires d'oligodendrocytes, après 28 jours de culture, par immunocytochimie DAPI/NG2/MBP**

*Les photos, prises à l'aide d'un microscope confocal (grossissement x20), montrent le marquage des noyaux par le DAPI, des oligodendrocytes immatures par le NG2 et des oligodendrocytes matures par la MBP, ainsi que le co-marquage (merge); N=1.*

*Abréviations: MBP, myelin basic protein; NG2, neural/glial antigen 2*

Au vu de ces résultats, la culture d'oligodendrocytes nécessite encore quelques améliorations, afin de diminuer encore la contamination par les astrocytes et d'améliorer la différenciation des oligodendrocytes. Malheureusement, pour des raisons de temps, nous n'avons pas pu finir cette mise au point pendant ma thèse.

La plus grande difficulté de la culture gliale mixte réside dans la séparation des 3 types cellulaires et l'obtention de cultures, quasiment pures, correspondant à chaque type cellulaire. Cette séparation repose sur deux principes: (1) une stratification en couches des différents types cellulaires et (2) un détachement sélectif selon la vitesse et la durée de l'agitation orbitale (McCarthy et de Vellis, 1980).

Dans ce travail, nous avons étudié la possibilité de récupérer les OPC après 14 jours de culture gliale mixte, après isolement des microglies. Or, le protocole déjà mis en place au laboratoire, ainsi que ceux disponibles dans la littérature permettent un isolement des OPC après 10 jours de culture gliale mixte (Baer *et al.*, 2009; Correa *et al.*, 2011; Barateiro et Fernandes, 2014). Le choix du moment d'isolement des oligodendrocytes est extrêmement important. En effet, un temps de culture gliale mixte inférieur à 9-10 jours ne permet pas une stratification suffisante des différentes couches cellulaires (OPC et astrocytes), tandis qu'un temps plus long, permet le plus souvent une séquestration des OPC entre les astrocytes (McCarthy et de Vellis, 1980). L'isolement des OPC paraît donc plus compliqué au bout de 14 jours que 10 jours de culture gliale mixte. Ceci a été confirmé dans notre première expérience qui montre une forte contamination de la culture d'oligodendrocytes par les

astrocytes. De plus, il s'est avéré que notre culture contenait également des « restes » de cellules microgliales.

Pour se débarrasser de la contamination microgliale, nous avons décidé d'effectuer plusieurs rinçages successifs des flasques, avant de procéder à l'isolement des OPC. Ces rinçages, servant à éliminer les microglies flottantes restantes, ont permis de réduire la contamination microgliale de notre culture d'oligodendrocytes.

Le plus grand challenge de notre mise au point était de pouvoir décrocher sélectivement les OPC avec le moins d'astrocytes possible. En effet, les astrocytes ayant des capacités de prolifération plus importantes que celles des oligodendrocytes (McCarthy et de Vellis, 1980), ces derniers envahissent très rapidement les cultures, et ceci notamment au cours de la différenciation des OPC en oligodendrocytes matures. Nous avons donc testé plusieurs vitesses d'agitation orbitale (entre 180 et 300 rpm), afin de choisir celle permettant de décrocher le moins d'astrocytes possible, mais tout en ayant suffisamment d'OPC. Nous avons finalement retenu la vitesse de 230 rpm, car des vitesses inférieures n'ont pas permis de récupérer suffisamment d'OPC. Malgré cette modification, nos cultures d'oligodendrocytes contenaient toujours une proportion importante d'astrocytes. Afin de réduire au maximum cette contamination astrocytaire (mais également microgliale), nous avons rajouté une étape d'incubation de la suspension cellulaire pendant 1 heure dans des flasques T75 non traitées avec de la poly-D-lysine (il est également possible d'utiliser des boîtes de pétri à la place de flasques). Cette étape repose sur le principe d'une adhésion plus simple et plus rapide des contaminants astrocytaires et microgliaux au plastique (Baer *et al.*, 2009; Syed *et al.*, 2008; Correa *et al.*, 2011; Pang *et al.*, 2013).

Malheureusement, toutes ces modifications n'ont pas permis d'obtenir une culture « pure » d'oligodendrocytes. Pour la suite de cette mise au point, nous envisageons d'allonger la durée d'incubation de la suspension cellulaire, dans les flasques non traitées avec la poly-D-lysine, afin d'éliminer le maximum de contaminants. Il serait également intéressant de filtrer la suspension cellulaire (Filtres NITEX 33 et 17) pour éliminer les cellules astrocytaires contaminantes (McCarthy et de Vellis, 1980).

En parallèle des étapes visant à améliorer la pureté de la culture d'oligodendrocytes, nous avons également essayé d'augmenter la différenciation des OPC en oligodendrocytes matures. Peu de protocoles concernant la différenciation *in vitro* des OPC en oligodendrocytes matures myélinisants sont disponibles dans la littérature.

A maturité, comme souligné précédemment, les oligodendrocytes perdent leur capacité de prolifération et de migration (Barateiro et Fernandes, 2014). Pour cette raison, avant de les différencier en oligodendrocytes matures, les OPC sont d'abord soumis à une phase de prolifération en présence des facteurs de croissance PDGF-AA et bFGF. Ces derniers

stimulent la prolifération et inhibent la différenciation des OPC (Barateiro et Fernandes, 2014). La différenciation des OPC étant inhibée pendant la phase de prolifération, nous avons décidé de réduire cette dernière à 3 jours. En effet, nous avons constaté que cette durée était largement suffisante pour obtenir suffisamment d'OPC.

Pour permettre la différenciation des OPC en oligodendrocytes, les facteurs de croissance PDGF-AA et bFGF sont donc retirés du milieu de culture. En se basant sur d'autres protocoles, nous avons décidé de rajouter 3% de SVF dans le milieu OL2 (Syed *et al.*, 2008; Baer *et al.*, 2009; Barateiro et Fernandes, 2014; Amaral *et al.*, 2016).

Une période de 6 à 7 jours est normalement suffisante pour obtenir des oligodendrocytes matures (Barateiro et Fernandes, 2014; Amaral *et al.*, 2016). Toutefois, dans nos conditions expérimentales, au bout d'une semaine de différenciation, de nombreuses cellules expriment encore NG2, un marqueur d'oligodendrocytes immatures. De plus, seule une faible proportion de cellules exprime la protéine MBP, caractéristique des oligodendrocytes matures.

Notre protocole nécessite donc encore quelques modifications en vue d'améliorer la différenciation des OPC. L'une des difficultés majeures de cette différenciation *in vitro* réside dans l'absence de communication des OPC avec les neurones, un phénomène indispensable à myélinisation (Voir paragraphe « 1. La substance blanche: organisation et fonctions » du « Chapitre III: Lésions de la substance blanche et rôle des débris de myéline dans la neuro-inflammation »). Quand cela est possible, l'utilisation de modèles de co-culture oligodendrocytes-neurones constitue un moyen plus simple, pour faciliter cette différenciation.

En conclusion, notre protocole de culture primaire d'oligodendrocytes nécessite encore d'être optimisé en vue, d'une part, de réduire les contaminations astrocytaires et microgliales, et d'autre part, d'améliorer la différenciation des OPC en oligodendrocytes matures. Cette mise au point sera donc poursuivie au laboratoire, afin de pouvoir étudier les conséquences des modulations phénotypiques microgliales sur la survie des oligodendrocytes.

## **2. Etude *in vitro* des effets de débris de myéline sur les phénotypes microgliaux - Conséquences de l'inhibition de la PARP et de la phagocytose**

La neuro-inflammation et les lésions de la SB sont deux phénomènes physiopathologiques pouvant s'amplifier mutuellement après le TC. Considérés comme des produits de dégradation exclusivement délétères, il a ainsi été suggéré que les débris de

myéline, issus des lésions de la SB, pourraient à leur tour induire une activation microgliale en phénotype pro-inflammatoire M1.

Ne disposant actuellement que de très peu de données concernant le rôle des débris de myéline dans la neuro-inflammation post-TC, l'objectif de ce travail a été de déterminer, *in vitro*, sur des cultures primaires de microglies de souris traitées par des stimuli mimant l'environnement inflammatoire post-TC, les effets de débris de myéline sur le phénotype microglial.

Les données de la littérature et de notre laboratoire montrent (1) une activation microgliale à la suite du TC (Jonhson *et al.*, 2013a; Siopi *et al.*, 2013; Loane *et al.*, 2014b; Donat *et al.*, 2017; Taib *et al.*, 2017), (2) une démyélinisation pouvant être à l'origine d'une formation de débris de myéline (Flygt *et al.*, 2013; Mierzwa *et al.*, 2015; Taib *et al.*, 2017), et (3) une implication de la PARP dans la neuro-inflammation post-TC (Homsy *et al.*, 2009, 2010; Lescot *et al.*, 2010; Siopi *et al.*, 2011; d'Avila *et al.*, 2012; Stoica *et al.*, 2014). Par son action sur la transcription génique, la PARP participe à l'expression de nombreux gènes de l'inflammation et à l'activation microgliale (Chiarugi et Moskowitz, 2003; Kauppinen *et al.*, 2005; Besson *et al.*, 2009; Vuong *et al.*, 2015). Ainsi, il a été suggéré que la PARP pourrait contribuer à l'orientation phénotypique de la microglie activée (Kauppinen *et al.*, 2011). Toutefois, son rôle dans la polarisation microgliale observée après un TC n'est pas encore déterminé. Dans ce contexte, nous avons évalué les conséquences de l'inhibition de la PARP sur les modifications phénotypiques de la microglie induites par les débris de myéline dans environnement mimant la neuro-inflammation post-TC.

Par ailleurs, la phagocytose des débris de myéline par la microglie pouvant moduler l'état d'activation de cette dernière (Neumann *et al.*, 2009), nous avons également étudié le rôle de la phagocytose dans l'orientation phénotypique de la microglie induite par les débris de myéline.

Les principaux résultats de ces études font l'objet d'un article en préparation inséré dans le paragraphe « 2. Etude *in vitro* des effets des débris de myéline sur les phénotypes microgliaux ».

Pour réaliser ce travail, plusieurs études préliminaires ont été nécessaires, afin de déterminer (1) comment reproduire *in vitro* l'effet de débris de myéline produits *in vivo* à la suite de lésions de la SB post-TC, et (2) les concentrations des différents stimuli utilisés.

## 2.1. Etudes préliminaires

### 2.1.1. Comment mimer *in vitro* l'effet de débris de myéline?

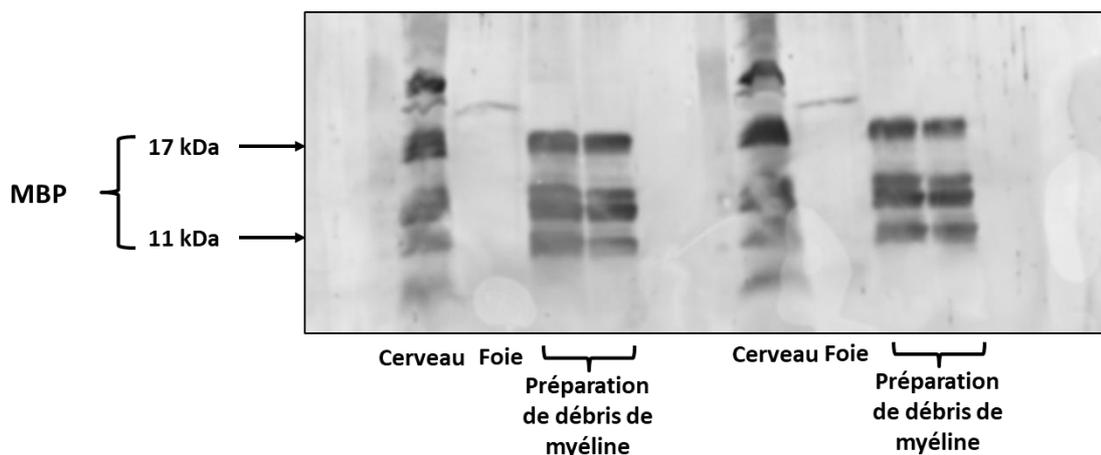
Au cours de mon Master 2, nous avons utilisé le fragment 35-55 de la MOG, une protéine retrouvée à la surface de la gaine de myéline (Johns et Bernard, 1999). En effet, ce fragment est classiquement utilisé pour mimer expérimentalement la sclérose en plaque (Mendel *et al.*, 1995; Bittner *et al.*, 2014). Ainsi, le traitement par la MOG entraîne la production d'auto-Ac dirigés contre la myéline, ce qui va être à l'origine d'une démyélinisation, caractéristique de cette pathologie. D'autre part, le choix de la concentration de MOG que nous avons utilisée était basée sur l'étude de Ford et Evavod (2005), qui montre qu'à la concentration de 10  $\mu$ M le fragment 35-55 de la MOG est capable d'induire l'activation de lymphocytes T CD8+, qui vont alors produire de l'IFN $\gamma$ . Toutefois, nous n'avons constaté aucun effet de la MOG sur l'activation microgliale, évaluée morphologiquement par immunocytochimie de CD11b, un marqueur microglial membranaire.

Au vu de ce résultat, nous avons supposé que la concentration de 10  $\mu$ M de MOG était peut-être insuffisante pour induire une activation microgliale, et qu'il serait donc intéressant par la suite (1) d'évaluer l'effet de concentrations plus importantes de MOG, ou (2) d'envisager d'utiliser d'autres constituants de la myéline pour activer la microglie ou (3) directement des débris de myéline (Pinteaux-Jones *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2015b).

Par ailleurs, l'étude de Jeon et collaborateurs (2008) ayant également montré que la MOG n'avait pas d'effet sur l'activation microgliale, évaluée par mesure de la production de NO, contrairement à un constituant lipidique de la myéline, le sulfatide, il nous est apparu plus judicieux d'utiliser directement des débris de myéline plutôt qu'un constituant particulier, afin de nous rapprocher au maximum des conditions *in vivo*.

Pour la préparation de débris de myéline, nous avons utilisé le protocole décrit par Pinteaux-Jones et collaborateurs (2008), qui est adapté de celui de Norton et Poduslo (1973). Ce protocole nous a permis d'obtenir une préparation de débris de myéline à partir de cerveau de souris naïves (voir paragraphe « 2. Préparation des débris de myéline de souris » de la partie « Matériel et méthodes »). Par ailleurs, il a été utilisé dans de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* visant à étudier le rôle des débris de myéline dans des modèles expérimentaux de pathologies associées à une démyélinisation, telles que la sclérose en plaque et les lésions de la moelle épinière (Boven *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2010; Clarner *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015b). Les résultats de ces études sont décrits dans le paragraphe « 3.2. Effets délétères des débris de myéline » du « Chapitre III: Lésions de la substance blanche et rôle des débris de myéline dans la neuro-inflammation » de la partie « Rappels bibliographiques ».

Avant de traiter les cellules microgliales avec ces débris de myéline, nous avons, tout d'abord, vérifié que la préparation extraite des cerveaux contenait bien de la myéline. Pour cela, nous avons mesuré par Western Blot (WB) l'expression de la protéine MBP, l'une des principales protéines la composant. La figure 30 montre des bandes comprises entre 11 et 17 kDa, correspondant aux poids moléculaires (PM) des différentes isoformes de la protéine MBP, dans la préparation de débris, tout comme dans le témoin positif (homogénat de cerveau de souris). Par contre, aucune bande n'est détectée dans le témoin négatif (homogénat de foie de souris).



**Figure 30: Western blot de l'expression de la protéine MBP dans des échantillons de préparation de débris de myéline, d'homogénats de cerveau (témoin positif) et de foie (témoin négatif) de souris**

*Abréviation: MBP, myelin basic protein*

### 2.1.2. Choix des concentrations des stimuli pro- et anti-inflammatoires

L'étude de l'effet des débris de myéline dans un environnement non inflammatoire ne permet pas de conclure quant à leur rôle après un TC. En effet, après un TC, les débris de myéline sont générés dans un environnement inflammatoire et ces derniers agissent sur une microglie qui se trouve déjà exposée à divers stimuli pro- et anti-inflammatoires. Au laboratoire, il a été mis en évidence, dans un modèle expérimental de TC chez la souris (voir le paragraphe «1. Modèle expérimental de traumatisme crânien par impact cortical contrôlé» de la section «Expériences *in vivo*» de la partie «Matériel et méthodes»), un début de démyélinisation 3 jours après le TC, ainsi que la présence d'une population mixte de microglies activées M1 et M2 à ce temps (Taib *et al.*, 2017). Afin de tenir compte de cet environnement inflammatoire post-TC, nous avons, tout d'abord, étudié l'effet des débris de myéline en présence de molécules pro-inflammatoires. Une première étude a consisté à

co-traiter les microglies avec les débris de myéline et une faible concentration de LPS. Ensuite, afin de mimer au plus près cette neuro-inflammation post-TC, le LPS a été remplacé par le TNF $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire produite après un TC (Morganti-Kossmann *et al.*, 2002; Kumar et Loane, 2012). Nous avons notamment choisi cette cytokine, car le modèle de TC utilisé au laboratoire a permis de montrer une augmentation de sa production par les microglies/macrophages dès le premier jour après le TC et ceci jusqu'à 3 jours (Taib *et al.*, 2017).

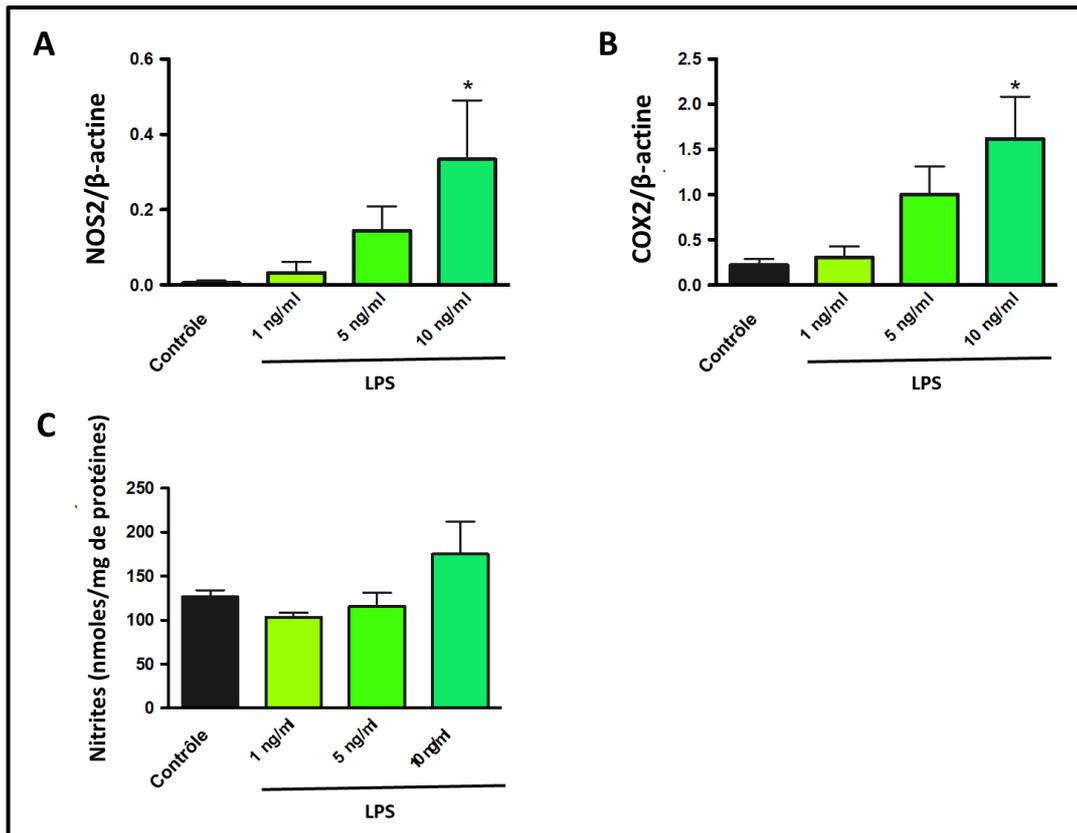
La neuro-inflammation post-TC, impliquant à la fois des facteurs pro- et anti-inflammatoires, nous avons également étudié les effets des débris de myéline sur le phénotype microglial en présence d'un stimulus anti-inflammatoire, l'IL-4, à la concentration de 20 ng/ml. Le choix de cette concentration est basée sur des données de la littérature (Chhor *et al.*, 2013; Siddiqui *et al.*, 2016).

Les microglies sont ainsi exposées simultanément, pendant 24 heures, à l'une des molécules pro- ou anti-inflammatoires (LPS, TNF $\alpha$  ou IL-4) et les débris de myéline. Une caractérisation du phénotype microglial est ensuite réalisée.

Avant de réaliser ces expériences, il a fallu déterminer les concentrations de LPS et de TNF $\alpha$  adéquates pour mieux mimer l'inflammation telle qu'observée après un TC. L'objectif étant d'induire une activation modérée et non pas excessive de la microglie, afin de pouvoir observer son éventuelle modification par les débris de myéline.

#### **2.1.2.1. Choix de la concentration de LPS**

Dans nos premières études, le LPS a été utilisé comme témoin positif du phénotype M1 à la concentration de 100 ng/ml (Kroner *et al.*, 2014), ce qui a permis d'obtenir une stimulation très importante des cellules microgliales, comme le montre les résultats de l'article sur l'expression génique des marqueurs M1 (Fig. 1). Dans la suite de ce travail, l'objectif étant de mimer un environnement inflammatoire, nous avons testé des concentrations plus faibles de LPS allant de 1 à 10 ng/ml. L'activation microgliale a été évaluée, d'une part, en mesurant l'expression des protéines NOS2 et COX2 dans les cellules, la production de nitrites dans les surnageants, et d'autre part, par une étude morphologique. Une augmentation de l'expression des protéines NOS2 et COX2 est observée à partir de la concentration de 5 ng/ml, mais n'est significative qu'à la concentration de 10 ng/ml (Figures 31A et B). Une augmentation de la production des nitrites est également observée à cette concentration, mais elle est non significative ( $p=0,1087$ ; Figure 31C).

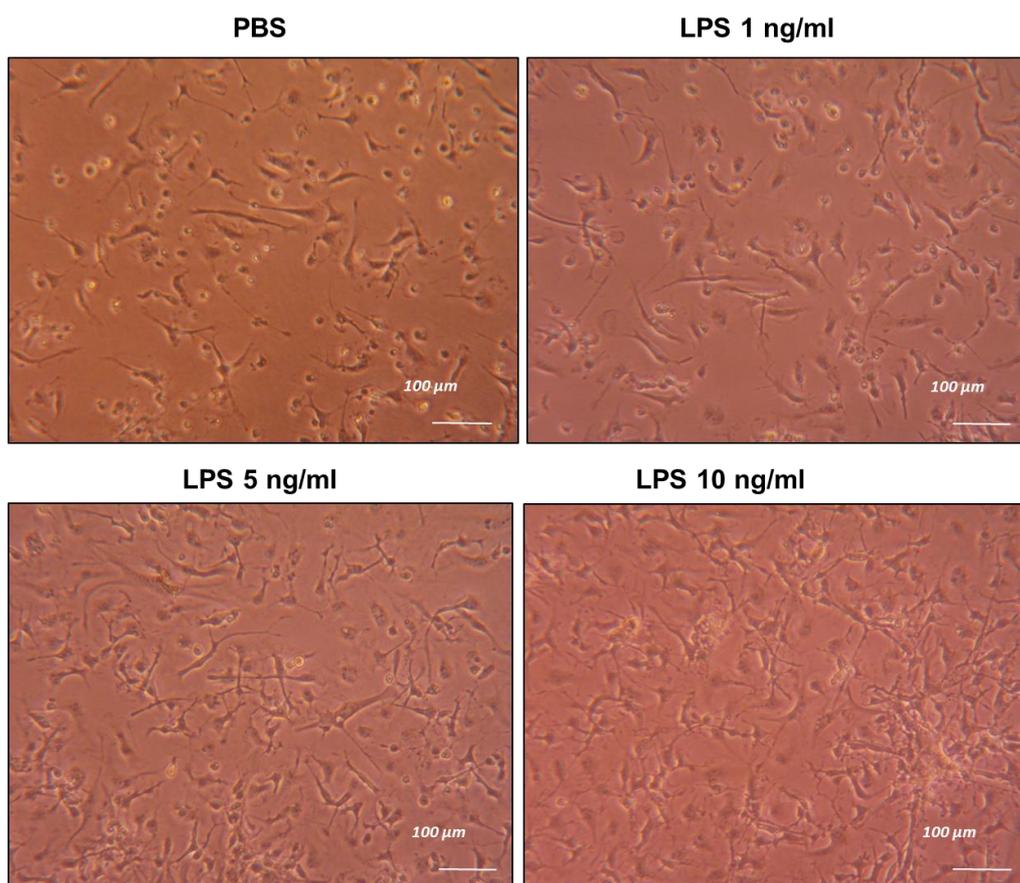


**Figure 31: Evaluation de l'activation microgliale en phénotype M1 après traitement par le LPS pendant 24 heures**

*Expression des protéines NOS2 (A) et COX2 (A) dans les cellules, obtenue par WB, et production de nitrites dans les surnageants (C). Les contrôles sont des microglies traitées par le solvant du LPS (PBS). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  esm. Les données, issues de 5 cultures différentes (N=5), ont été analysées par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett: \* $p < 0,05$  versus contrôle*

*Abréviations: COX2, cyclo-oxygénase de type 2; LPS, lipopolysaccharide; NOS2, NO-synthase de type 2*

Sur les mêmes cultures de microglies, nous avons également observé la morphologie des cellules. Sur la figure 32, les microglies traitées par le LPS à 1 ng/ml ont le même aspect ramifié que les microglies contrôles (PBS). Par contre, un changement morphologique commence à apparaître à 5 ng/ml, puis il s'observe dans toutes les cellules à 10 ng/ml. Ce changement consiste en un élargissement du corps cellulaire, comme cela a déjà été décrit dans la littérature (Cao *et al.*, 2012).



**Figure 32: Photos représentatives de la morphologie des cellules microgliales après 24 heures de traitement par le LPS**

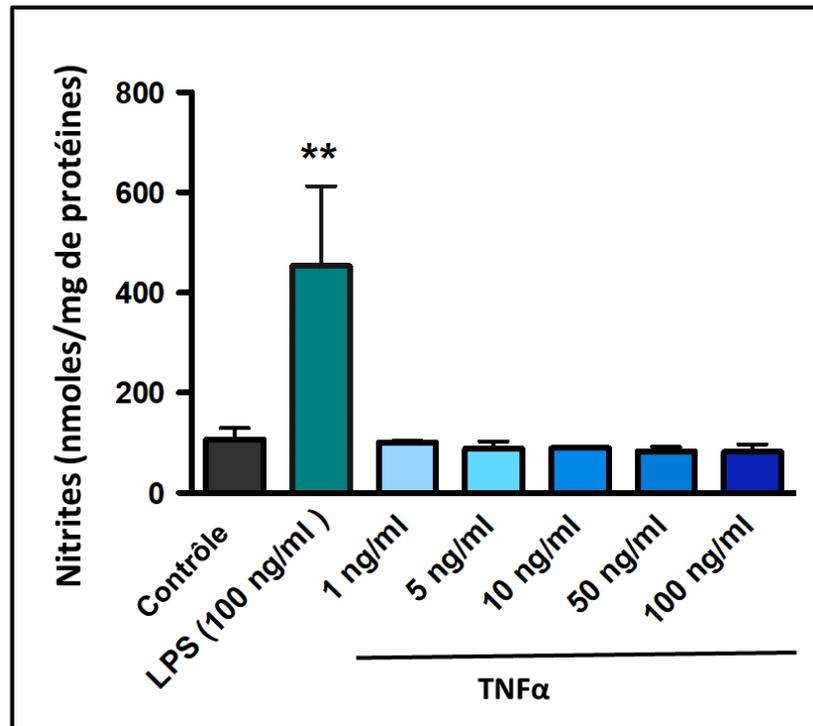
*Les photos sont prises à l'aide d'un microscope inversé à contraste de phase (grossissement x100). Les contrôles sont des microglies traitées par le solvant du LPS (PBS).*

*Abréviation: LPS, lipopolysaccharide*

Au vu de l'ensemble de ces résultats, nous avons donc choisi d'utiliser le LPS à la concentration de 10 ng/ml pour mimer un environnement inflammatoire dans nos études *in vitro*.

#### **2.1.2.2. Choix de la concentration de TNF $\alpha$**

Afin de déterminer la concentration la mieux appropriée pour mimer un environnement inflammatoire post-TC, nous avons traité des microglies par une gamme de concentrations de TNF $\alpha$  allant de 1 à 100 ng/ml (Chhor *et al.*, 2013; Siddiqui *et al.*, 2016). Contrairement au LPS, la production de nitrites n'est pas augmentée par rapport au contrôle (PBS) quelle que soit la concentration de TNF $\alpha$  (Figure 33).

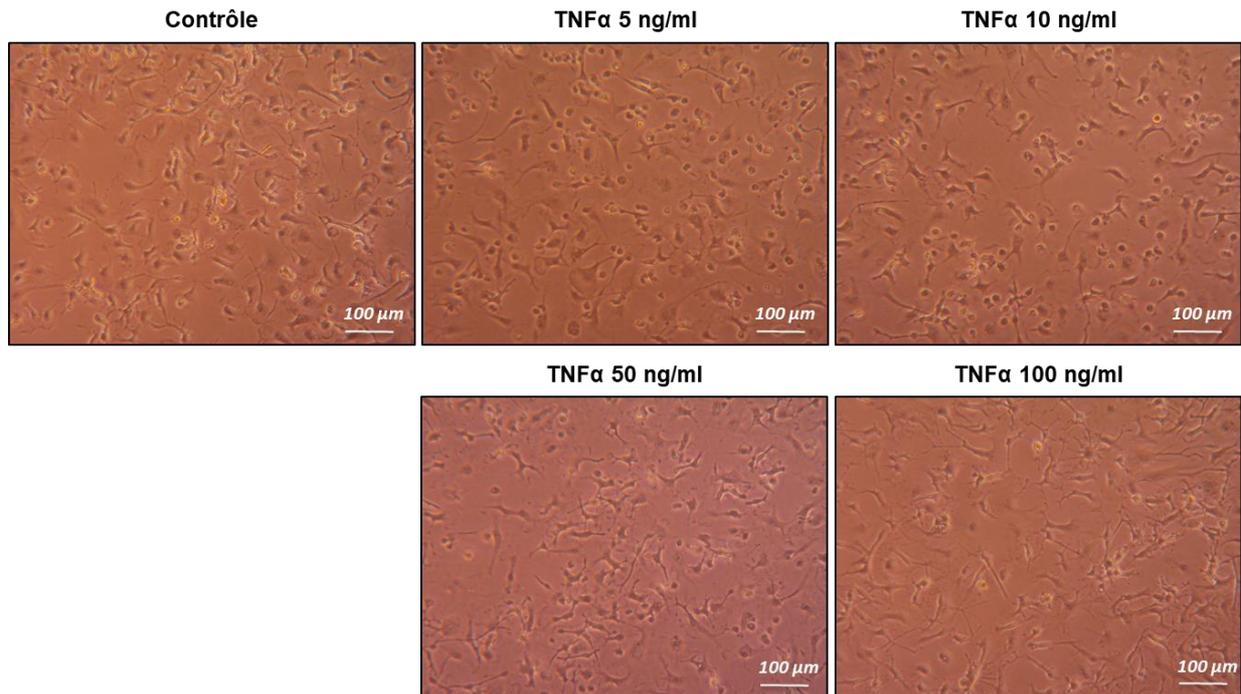


**Figure 33: Evaluation de l'activation microgliale M1 par le dosage des nitrites dans les surnageants après 24 heures de traitement par le TNF $\alpha$**

Les contrôles sont des microglies traitées par le solvant du LPS (PBS). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  esm. Les données, issues de 5 cultures différentes (N=5), ont été analysées par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett: \*\* $p < 0,01$  versus contrôle.

Abréviations: TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha; LPS, lipopolysaccharide

Ces résultats ne nous permettant pas de choisir la concentration de TNF $\alpha$  pour la suite de nos études, nous nous sommes basés sur le changement morphologique de la microglie. En effet, la figure 34 montre que les microglies traitées par le TNF $\alpha$  adoptent une morphologie semblable à celle observée avec le LPS, surtout à partir de la concentration de 50 ng/ml. En se basant sur ces résultats ainsi que sur des données de la littérature (Siddiqui *et al.*, 2016), nous avons donc choisi la concentration de 50 ng/ml pour la stimulation de la microglie



**Figure 34: Photos représentatives de la morphologie des cellules microgliales traitées par le TNF $\alpha$  pendant 24 heures**

*Les photos sont prises à l'aide d'un microscope optique inversé (grossissement x100). Les contrôles sont des microglies traitées par le solvant du LPS (PBS).*

## 2.2. Etude *in vitro* des effets de débris de myéline sur les phénotypes microgliaux

L'effet des débris de myéline sur le phénotype microglial, évalué par la mesure de l'expression génique et protéique de marqueurs spécifiques, a été étudié en absence ou présence de stimuli pro- ou anti-inflammatoires.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé le phénotype de cultures exposées pendant 6 ou 24 heures à des débris de myéline seuls.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet des débris de myéline sur le phénotype microglial en présence, pendant 24 heures, de stimuli pro-inflammatoire (LPS ou TNF $\alpha$ ) ou anti-inflammatoire (IL-4).

Les résultats de ces expériences font partie de l'article ci-dessous.

Cet article comprend également les résultats de (1) l'étude des conséquences de l'inhibition de la PARP sur l'orientation phénotypique induite par les débris de myéline dans un environnement pro-inflammatoire mimé par le TNF $\alpha$ , et de (2) l'étude du rôle de la phagocytose des débris de myéline dans les changements phénotypiques induits par les

débris de myéline. Pour la réalisation de ces 2 études, nous avons utilisé, respectivement, des inhibiteurs de la PARP (PJ34) et de la phagocytose (cytochalasine D).

### 2.2.1. Article en préparation

Mamma C, Taib T, Lebon S, Palmier B, Leconte C, Van Steenwinckel J, Lawson R, Ishikawa A, Novak AC, Gressens, Marchand-Leroux C, Besson VC#, Lerouet D#. Microglial polarization induced by myelin debris *in vitro*. *J Neuroinflammation*, en préparation.

# These authors contributed equally to this work.

## Microglial polarization induced by myelin debris *in vitro*

Célia Mamma<sup>1</sup>, Toufik Taib<sup>1</sup>, Sophie Lebon<sup>2</sup>, Bruno Palmier<sup>1</sup>, Claire Leconte<sup>1</sup>, Juliette Van Steenwinckel<sup>2</sup>, Roland Lawson<sup>1</sup>, Aya Ishikawa<sup>1</sup>, Anne-Catherine Novak<sup>1</sup>, Pierre Gressens<sup>2</sup>, Catherine Marchand-Leroux<sup>1</sup>, Valérie C Besson<sup>#1</sup>, Dominique Lerouet<sup>\*#1</sup>.

\*Corresponding author: dominique.lerouet@parisdescartes.fr

# These authors contributed equally to this work.

<sup>1</sup>EA4475 - « Pharmacologie de la Circulation Cérébrale », Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>2</sup>UMR1141 - « Neuroprotection du Cerveau en Développement », Hôpital Robert Debré, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

**Keywords:** microglia, myelin debris, phagocytosis, phenotype

### **Background**

Microglia are the primary mediators of innate immune response in the central nervous system (CNS). They rapidly respond, orchestrate immune and neurorestorative processes by producing factors and clearing cellular debris (Donat *et al.*, 2017). However, microglia can also become dysregulated and produce high levels of pro-inflammatory and cytotoxic mediators that can disrupt CNS repair. This dual nature of microglia is linked to their polarization states. Indeed, depending on their environment, microglia can adopt heterogeneous phenotypes ranging from the “classical” pro-inflammatory phenotype (M1-like) to the “alternative” anti-inflammatory one (M2-like). The M1-like microglia is typically induced by exposure to bacterial product, such as lipopolysaccharide (LPS), or pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) or interferon gamma (IFN $\gamma$ ), and produces high levels of inflammatory cytokines and cytotoxic oxidative metabolites (Cherry *et al.*, 2014; Orihuela *et al.*, 2015; Loane and Kumar, 2016). Regarding the M2-like microglia, three distinct

subsets have been classically described: alternative (M2a), intermediate (M2b) and deactivated (M2c) states (Colton, 2009). The alternative phenotype is induced by anti-inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-4 or 13, and contributes to tissue remodelling, while in response to IL-10, glucocorticoids or transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ), microglia adopt a deactivated state, involved in inflammation resolution and tissue remodelling. At last, the intermediate phenotype, induced by exposure to immune complexes and ligands of toll-like receptors (TLR), seems rather to have an immunoregulatory effect (Colton, 2009).

Several studies have shown that both M1 and M2 phenotypes are involved in the neuroinflammatory response induced by traumatic brain injury (TBI), a leading cause of death and disability worldwide (Maas *et al.*, 2017). Models mimicking TBI described that neuroinflammation had opposing roles. Indeed, mixed population of M1- and M2-like microglia has been reported within hours to few weeks in animal models of TBI (Wang *et al.*, 2013, 2015a; Loane *et al.*, 2014a and b; Kumar *et al.*, 2016a; Taib *et al.*, 2017). However, contrary to the M2 phenotype, the M1 phenotype appears to predominate and persists months or even years after TBI, and thus contributes to cell death and neurodegenerative process.

Several studies have highlighted a link between neuroinflammation and white matter injury (WMI) after TBI (Johnson *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013, 2015a). A *post-mortem* study provided evidence of correlated persistent microglial inflammation and ongoing WM degeneration for up to 18 years after a single TBI (Johnson *et al.*, 2013). WMI is characterized by myelin pathology resulting from either the loss of myelin due to loss of axons, and/or from secondary damage that cause oligodendrocyte loss with subsequent demyelination of viable/intact axons. Demyelination and oligodendrocyte death lead to the generation of myelin debris in the brain. Although most of cellular and molecular debris are quickly and efficiently removed from the brain by microglia and infiltrating macrophages, myelin debris can persist for very long time periods in patients (Miklossy *et al.*, 1991; Neumann *et al.*, 2009) and in rodent models of TBI (Kelley *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2014; Armstrong *et al.*, 2016).

Therefore, in order to develop therapeutic strategies that could reduce the cytotoxic M1 activation and/or promote the protective M2 one, it is crucial to understand how the TBI environment, especially the persistence of myelin debris, can influence microglial polarization. As microglial activation can

develop from hours to days, months or even years following the impact (Johnson *et al.*, 2013), it provides a wide window of opportunity for therapeutic intervention.

It has been suggested that myelin debris could promote the M1 phenotype that would further increase WMI, thus forming a vicious circle (Yang *et al.*, 2011). However, to date, no clear interaction between myelin debris and microglia activation has been established. In demyelinating diseases, such as multiple sclerosis (MS) and spinal cord injury (SCI), it is well documented that myelin debris inhibit axonal regeneration (Geoffroy and Zheng, 2014) and oligodendrocyte differentiation (Robinson and Miller, 1999; Kotter *et al.*, 2006). In this line, Lampron and colleagues (2015) demonstrated, using a model of MS with CX3CR1<sup>-/-</sup> mice, that there can be no efficient remyelination after a primary demyelinating insult if myelin removal by microglia is impaired. However, there is only few data on the involvement of myelin debris in microglial activation. Thus, in animal models of MS and SCI, myelin debris could induce a pro-inflammatory response (Pinteaux-Jones *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010; Clarner *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015b) or, on the contrary, confer anti-inflammatory properties (Boven *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Kroner *et al.*, 2014).

In that context, the aim of the present study was to clarify, using primary microglial culture, the impact of myelin debris exposure on microglial phenotype, under “physiological”, pro- and anti-inflammatory conditions.

## **Methods**

### **Animals**

All cares and experiments were in accordance with the ethical approvals stipulated by the Animal Ethics Committee of Paris Descartes University, the French regulations and the European Union Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EEC) on the protection of animals for experimental use (APAFiS#4765) and conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health (publication 85-23, revised 1996). Experiments were performed on Swiss mice (Janvier labs, Le Genest-St-Isle, France), housed at 4 to 6 animals per cage on a 12 hours light/dark cycle, under temperature-controlled conditions, and with free access to food and water.

### **Primary microglial culture**

Primary mixed glial cell culture was prepared from cortices of postnatal (day P0 to P3) mice as previously described (Ni and Aschner, 2010; Chhor *et al.*, 2013). Briefly, brains were harvested and dissected into ice-cold DMEM-High Glucose (HG) medium supplemented with 2% of antibiotic solution (penicillin 10 000 U/ml - streptomycin 10 mg/ml), and the meninges were gently removed. Cortices were collected, and then mechanically dissociated and suspended in DMEM-HG medium supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM of L-glutamine and 0.01% of antibiotic solution. Glial cells were cultured in poly-D-lysine coated flasks under humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

Fourteen days later, microglia were isolated from the mixed glial population by an orbital shaking (140 rpm, 37°C) of the flasks for 30 minutes. The supernatants containing microglia were collected and centrifuged (1 200 g x 10 minutes, 4°C). The pellets were re-suspended in fresh DMEM-HG medium supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM of L-glutamine and 0.01% of antibiotic solution. Microglia were seeded onto 12- or 24-well culture plates, previously treated with poly-D-lysine, at a density of 400 000 cells/ml for protein or ribonucleic acid (RNA) collection, respectively. For immunofluorescence staining, cells were seeded on poly-D-lysine coated coverslips placed in 24-well plates. One day after plating, the culture media was removed and replaced with serum-free DMEM-HG medium supplemented with 2 mM of L-glutamine and 0.01% of antibiotic solution.

The culture purity, determined by immunofluorescence labeling using ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1, a specific marker of microglia) antibody (Abcam, ab5076), is about 98%.

### **Preparation of myelin debris**

Myelin debris were isolated from whole mouse brain (male, 28-30 g) by sucrose density gradient (0.32 M/0.85 M) centrifugation as previously described (Norton and Poduslo, 1973; Pinteaux-Jones *et al.*, 2008). The resulting myelin debris was made up in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) and the protein content was determined by the Bradford assay, using bovine serum albumin as standard. A stock

preparation (1.6 mg/ml) was then prepared in 10 mM Tris-HCl and stored at -40°C. Myelin debris were used at a final concentration of 40 µg myelin protein per milliliter to stimulate microglial culture.

### **Drug preparation and treatment protocols of microglial cultures**

Microglia were routinely used 24 hours after serum deprivation. The following concentrations stated are the final concentrations of the drugs in the culture medium.

To assess the effect of myelin debris itself, microglia were exposed either to 0.5 mM Tris-HCl (pH 7.4; control), myelin debris at 40 µg of proteins/ml or LPS at 100 ng/ml (E.coli 0127:B8; Sigma-Aldrich, L3129; used as a positive control of M1-like phenotype) for 6 or 24 hours (Wang *et al.*, 2013; Stoica *et al.*, 2014).

To mimic the inflammatory environment, microglia were stimulated with a lower concentration of LPS at 10 ng/ml or TNFα at 50 ng/ml (R&D Systems, 410-MT-010/CF) (Chhor *et al.*, 2013; Siddiqui *et al.*, 2016), and the myelin debris were applied simultaneously with these molecules for 24 hours. Microglia were also co-treated with IL-4 at 20 ng/ml (R&D Systems, 404-ML-010/CF) (Chhor *et al.*, 2013), a typical anti-inflammatory cytokine, and myelin debris for 24 hours. Stock solutions of LPS (2 mg/ml) and recombinant mouse cytokines (100 ng/ml) were made in sterile phosphate-buffered saline (PBS) solution and stored at -20°C.

To examine the effects of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) inhibition, microglia were pre-treated with the potent PARP inhibitor PJ34 (Sigma-Aldrich, P4365) at 20 µM for 1 hour (Curtin and Szabo, 2013; Stoica *et al.*, 2014) followed by the addition of myelin debris with TNFα or IL-4 for 24 hours.

To examine the effect of phagocytosis inhibition, microglia were pre-treated with the phagocytosis inhibitor cytochalasin D (Thermoscientific, 85190) at 5 µM for 1 hour (Liu *et al.*, 2006) followed by the addition of myelin debris with TNFα or IL-4 for 24 hours. A stock solution of cytochalasin D (9.85 mM) was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) and stored at -20°C.

After treatment, supernatants were collected and stored at -40°C until the assessment of NO production, and the cells were washed with PBS before being harvested for RNA or protein extraction, or fixed for immunocytochemistry.

### **Controlled cortical impact-induced brain injury and treatment**

The controlled cortical impact (CCI) model was performed as previously described (Taib *et al.*, 2017). Mice (28-30 g) were anesthetized with isoflurane and placed in a stereotaxic frame. Body temperature was monitored throughout surgery by a rectal probe and maintained at  $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  with a homeothermic blanket control unit. A 4-mm craniotomy was performed onto the left temporo-parietal cortex centered between the bregma and lambda, taking care to leave the dura mater intact. Injury was delivered using a 3-mm diameter impactor by a pneumatically controlled device (TBI 0310 Impactor, Precision System Instruments) using these parameters: diameter 3 mm, velocity 3.5 m/s, depth of cortical deformation 1.0 mm and dwell time 50 ms. Following the injury, the skullcap was replaced by applying bone wax and the skin sutured. To recover from anesthesia and prevent post-surgery hypothermia, animals were placed in an incubator set at  $30^{\circ}\text{C}$  for one hour. Mice were subsequently returned to their home cage and housed under temperature- and light-controlled conditions with access to food and water *ad libitum*.

Animals were randomly assigned to these five groups:

- TBI + vehicle at D1, and euthanized 3 days post-injury;
- TBI + PJ34 at D1, and euthanized 3 days post-injury;
- TBI + PJ34 at D1, and euthanized 7 days post-injury;
- TBI + vehicle at D1 and D3, and euthanized 7 days post-injury;
- TBI + PJ34 at D1 and D3, and euthanized 7 days post-injury.

The PARP inhibitor PJ34 (10 mg/kg) was administered intraperitoneally (10 ml/kg) either just 1 day (D1) after TBI or twice, 1 (D1) and 3 days (D3) after TBI (Stoica *et al.*, 2014; Charriaut-Marlangue *et al.*, 2018). Mice receiving a single dose were euthanized 3 or 7 days (D7) after TBI and those treated twice were euthanized at day 7 (Fig. 1).

### **Real time-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) for microglial phenotypes**

We have adopted a nomenclature of microglial phenotype consistent with the previous work in primary microglia (Chhor *et al.*, 2013). We distinguished 3 types of phenotypes according to the mRNA expression levels of markers listed in brackets: pro-inflammatory (CD86, CD32, NOS2, Ptg2, IL1 $\beta$  and TNF $\alpha$ ), anti-inflammatory (CD206, Arg1, IGF1, Lgals3, and IL10) and immunoregulatory (IL4ra, Sphk1, Socs3 and IL1Rn).

Anesthetized TBI mice were intracardially perfused with 0.9% NaCl and brains were rapidly collected. After removing the cerebellum and olfactory bulbs, brains were dissociated using the Adult Brain Dissociation Kit and the gentleMACS Octo Dissociator with Heaters (Miltenyi Biotec). The resulting brain homogenates from two brains were pooled and cleaned of their debris using the debris removal solution of the kit according to the manufacturer's instructions. CD11b<sup>+</sup> cells were enriched using the anti-CD11b (microglia) MicroBeads (Miltenyi Biotec) and multiMACS Cell24 separator (Miltenyi Biotec). After elution, the CD11b<sup>+</sup> isolated cells were centrifuged for 10 min at 300 *g* and the pellets were stored at -80°C (Taib *et al.*, 2017).

Total RNA was isolated, from primary microglia culture or after Cd11b<sup>+</sup> cell selection after TBI, with the RNeasy®Micro Kit according to the manufacturer's instruction (Qiagen). RNA quality and concentration were assessed by spectrophotometry with the Nanodrop™1000 (Thermofischer Scientific). Total RNA was then subjected to reverse transcription using the iScript™ cDNA synthesis kit (Bio-Rad). Using SYBER Green Super-mix (Biorad), RT-qPCR was performed in triplicate for each sample for 40 cycles with a two-step program (5 seconds of denaturation at 95°C and 10 seconds of annealing at 60°C). Amplification specificity was evaluated with a melting curve analysis. Primers were designed using Primer3 software. Sequence and their NCBI references are given in Table 1. The relative expression of gene of interest was normalized to that of ribosomal protein L13A (Rpl13a), used as a reference gene. For primary microglia culture, the data are presented as relative RNA units with respect to the control group (normalized to 100%).

### **Western blot of NOS2 and arginase 1**

Microglial cells were washed with PBS, and lysed in the following lysis buffer (pH 7.6): 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1% desoxycholic acid, and proteinase inhibitors (Complete Tablets, EDTA Free, Mini EASY pack, Roche, 04693159001; 1 tablet/10 ml).

Equivalent amounts of protein (25 to 50  $\mu$ g), determined using the Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit, from each sample were separated on a 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes at 100 V for 1 hour. Membranes were blocked with 5% dry non-fat milk in a Tris-buffered saline (TBS) solution-0,1% Tween 20 (TBS-T) for 1 hour at room temperature, and incubated overnight at 4°C with the corresponding primary antibody diluted in the blocking solution: rabbit anti-NO synthase 2 (NOS2, 1:500; Santa Cruz Biotechnology, sc-650), rabbit anti-arginase 1 (1:2000; Fisher Scientific, PA-5-22009) and rabbit anti- $\beta$ -actin (1:2000; Sigma-Aldrich, A2066). After extensive washing with TBS-T, blots were incubated with specific secondary fluorescein-linked antibody (1:1000; Roth, 4752) for 1 hour at room temperature, and then with a third antibody with an anti-fluorescent alkaline phosphatase conjugate (1:1000; Sigma-Aldrich, A5719) for 1 hour at room temperature. Finally, membranes were incubated with the Enhanced Chemiluminescence (ECL) substrate (Kit GE Healthcare, RPN5780) according to the manufacturer's instructions. Protein bands were then visualized using the Storm 860 Imager (GE Healthcare Life Sciences) and semi-quantification was performed with the ImageQuant software. To check for equal loading of the gel, membranes were incubated with anti- $\beta$ -actin antibody (1:2000; Sigma-Aldrich, A2056). Relative densitometry units were then calculated relative to  $\beta$ -actin for each lane.

### **NO assay**

NO released from activated microglia was assessed by measuring, in duplicate, the level of nitrite in the culture supernatant (collected 24 hours after treatment) using colorimetric assay with Griess reagent. Supernatants (50  $\mu$ l) were reacted with 100  $\mu$ l of Griess reagent (1% sulfanilamide in 0.05%  $H_3PO_4$  and 0.1% naphthylethylenediamine), in a 96-well plate at room temperature in the dark for 10 minutes. Absorbance was measured at 540 nm, using a microplate reader. Nitrite concentrations

( $\mu\text{M}$ ) were determined by extrapolation from a nitrite standard curve and then reported to the quantity of proteins measured in the corresponding cell extracts.

### **Immunocytochemistry of microglial activation markers and phagocytosis**

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 minutes at room temperature, and then incubated for 1 hour at room temperature with 0.2% porcine gelatin and 0.25% Triton X-100 in PBS to block nonspecific immunolabeling and permeabilized cell membranes. Afterwards, cells were incubated overnight at 4°C with the primary antibody rabbit anti-NOS2, goat anti-arginase 1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-18355) and rabbit anti-myelin basic protein (MBP; Merck Millipore, AB980; 1:200). After washes with 0.1% PBS-Tween 20, cells were incubated for 1 hour at room temperature in the dark with specific fluorophore-conjugated secondary antibody: donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488 conjugated (1: 500, Molecular Probes, A21206) or donkey anti-goat cyanine 3 conjugated (1: 500, Jackson ImmunoResearch Laboratories, 705-165-147).

For cytoskeletal F-actin or lysosome labeling, cells were incubated for 30 minutes at room temperature in the dark with Alexa Fluor 488 phalloidin (1:40; Molecular Probes, A12379) or LysoTracker®Red (50 nM; Fisher Scientific, L7528), respectively.

After extensive washes with PBS, cells were finally incubated for 10 minutes at room temperature in the dark with 4-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1:1000, Calbiochem, 268298) or TO-PRO-3 iodide (1:1000; Molecular Probes, T3605) for nuclear staining.

Negative controls were performed omitting the primary antibody.

Coverslips were mounted onto slides with Fluoromount mounting medium. Examination and photographs were made using confocal microscope.

### **Statistical analysis**

Results are presented as mean  $\pm$  sem, with n representing the number of *in vitro* experiments (from independent microglial cultures) or animals. All statistical graphs and analyses were performed with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, San Diego, CA). Data were analyzed with one-way analysis

of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni or a Dunnett test. Difference with a  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## **Results**

### **Myelin debris have no effect on “resting” microglia**

Our first aim was to evaluate whether myelin debris could polarize unstimulated microglia into an activated phenotype in our culture conditions. Therefore, we incubated primary microglia with myelin debris for 6 or 24 hours and assessed the gene expression of 12 phenotype markers, the protein levels of two phenotype markers [NOS2 and Arginase 1 (Arg1)], and NO production. Markers were classified into M1 (pro-inflammatory), M2a (anti-inflammatory) or M2b (immunoregulatory) as previously reported (Chhor *et al.*, 2013; Taib *et al.*, 2017).

Myelin debris did not change the gene expression of M1- and M2-like markers after 6 or 24 hours of exposure compared to control, except CD206 that was down-regulated (Fig. 2). Moreover, the protein expression of Arg1 and NOS2, as well as the associated NO production, both evaluated at 24 hours, were not modified (Fig. 3). In contrast, LPS (100 ng/ml), used as a positive control of M1-like phenotype, not only increased gene expression of known cytotoxic M1 [Cluster of differentiation (CD) 86, CD32, NOS2 and prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2; also known as cyclooxygenase 2 or COX-2)] and immunoregulatory M2b [interleukin 4 receptor subunit alpha (IL4R $\alpha$ ), sphingosine kinase 1 (Sphk1), suppressor of cytokine signaling 3 (Socs3) and interleukin 1 receptor antagonist (IL1Rn)] markers after 6 and/or 24 hours of exposure (Fig. 2A and C), but also modified the gene expression of M2a markers. Indeed, CD206 and insulin growth factor 1 (IGF1) were down-regulated, while Arg1 was up-regulated (Fig. 2B). In addition, western blotting and immunofluorescence staining showed an increase in NOS2 protein expression, without modification in Arg1 24 hours after exposure (Fig. 3A, B and C). At last, LPS induced a significant release of NO by microglia (Fig. 3D). All results demonstrated reactivity of microglia when stimulated by LPS, while myelin debris alone did not activate microglia.

**Under pro-inflammatory conditions, myelin debris decrease the M1-like phenotype, but also promote the M2-like phenotype**

To mimic post-TBI inflammation, microglial cells were first stimulated with LPS. The bacterial endotoxin, LPS, is indeed the most commonly used pro-inflammatory stimulus for microglia (Lively and Schlichter, 2018). However, because TBI occurs without a bacterial infection in the brain, it also seemed more relevant to consider another stimulus. Then, in a second experiment, we examined the microglial response to TNF $\alpha$ , as several studies have demonstrated this pro-inflammatory cytokine to be increased in the serum or CSF of traumatized patients, as well as in experimental models of TBI (Frugier *et al.*, 2010; Kumar and Loane, 2012; Woodcock and Morganti-Kossmann, 2013; Taib *et al.*, 2017). Moreover, in a CCI model of TBI, we recently demonstrated that TBI induced in microglia a robust increase in TNF $\alpha$  mRNA from one to 3 days after the impact (Taib *et al.*, 2017).

Therefore, microglial cells were co-incubated for 24 hours with myelin debris and LPS or TNF $\alpha$ . Considering the huge stimulation observed in the previous study with 100 ng/ml of LPS, the latter was used at a lower concentration, *i.e.* 10 ng/ml.

In LPS-stimulated microglia, myelin debris significantly counteracted the increase in protein expression of the M1-like marker, NOS2, and the associated NO production (Fig. 4).

As shown in Fig. 5A and 6, TNF $\alpha$  up-regulated the gene expression of 3 out of 4 pro-inflammatory markers (CD86, NOS2, Ptgs2), and also increased the protein level of NOS2. Like in LPS-stimulated microglia, myelin debris prevented the M1-like activation induced by TNF $\alpha$ .

Co-treatment with myelin debris significantly increased the mRNA of M2a (IGF1 and Lgals3) and M2b (IL1Rn) markers, as compared with microglia incubated with TNF $\alpha$  alone.

**Under anti-inflammatory conditions, myelin debris increase the M2-like phenotype**

Considering the presence of a mixed population of microglia with both pro- and anti-inflammatory properties after TBI, we also investigated the effect of myelin debris on microglia stimulated with

IL-4, a well-known anti-inflammatory cytokine inducing M2-like microglial activation. Moreover, an increase in mRNA and/or protein expression of this cytokine has been observed in several experimental models of TBI (Dalgard *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2014; Ansari, 2015; Clausen *et al.*, 2018), as well as in the CSF of traumatized patients (Yan *et al.*, 2014).

mRNA expression of the M1-like marker, CD86, was decreased in IL-4-treated microglia (Fig. 7A).

Interestingly, the co-incubation of myelin debris with IL-4 up-regulated the gene expression of M2a markers (IGF1 and Lgals3) as compared to IL-4 alone (Fig. 7B and C).

### **Anti-inflammatory strategy, based on PARP inhibition, does not modify the effect of myelin debris in pro-inflammatory conditions**

Altogether, our results suggested that myelin debris, generated after WMI, like after TBI, could exert anti-inflammatory effect by promoting the M2-like phenotype. However, as this potential endogenous protection system is unable to ensure a full tissue repair after TBI, we then evaluated whether an anti-inflammatory strategy based on PARP inhibition could potentiate the myelin debris effect. Indeed, PARP is a well-known nuclear enzyme involved in microglial activation and more generally in neuroinflammation in acute and chronic CNS diseases (Besson *et al.*, 2009; Berger *et al.*, 2018).

We chose to study the effect of PJ34, a potent PARP inhibitor. Microglial cells were pre-treated with PJ34 for 1 hour followed by the addition of myelin debris with TNF $\alpha$ , and the microglial activation state was evaluated 24 hours after exposure by measuring mRNA of M1- and M2-like markers.

PJ34 did not change the gene expression of these markers in the presence of myelin debris and TNF $\alpha$  (Fig. 8), except an up-regulation of the M2b marker, IL1Rn. However, it is noteworthy that the incubation with PJ34 alone induced similar up-regulation.

### **PARP inhibition does not modify the mixed microglial population in a mouse model of TBI**

We then studied the effect of PJ34 in a well-characterized experimental model of TBI (Taib *et al.*, 2017), mixing the different conditions explored in our *in vitro* experiments. Indeed, this model induces a mixed microglial population from 6 hours to 3 days post-injury and a demyelination process initiated at 6 hours.

To determine whether PARP inhibition could maintain the M2-like phenotype beyond 3 days, PJ34 was administered either once, 1 day post-TBI or twice, 1 and 3 days post-TBI. Gene expression analysis of phenotype markers was then performed 3 and 7 days after TBI on CD11b<sup>+</sup> cells, isolated by magnetic bead separation (MACS).

As shown previously (Taib *et al.*, 2017), simultaneous expression of pro-inflammatory, anti-inflammatory and immunoregulatory markers indicated the presence of a mixed M1 and M2 microglial population 3 days after TBI (Fig. 9), which decreased after 7 days. None of these markers were modified by PJ34 treatment 3 or 7 days post-injury, except IL1-Rn that was decreased 7 days post-TBI after one injection of PJ34 (Fig. 9C).

### **Myelin debris induce a foamy-like morphology in primary microglial culture**

As one function of microglia is to phagocytize cellular debris, a phenomenon that could contribute to their anti-inflammatory properties, we evaluated whether, in our culture conditions, myelin debris were phagocytized.

First, microglial cells were incubated for 24 hours with myelin debris. The location of the latter and microglia morphology were visualized by immunofluorescence staining, using an anti-MBP antibody and a high-affinity F-actin probe (phalloidin), respectively. As shown on Fig. 10, by the co-labeling of MBP and phalloidin, microglia internalized myelin debris and adopted a typical myelin-laden cells with a foamy morphology (Boven *et al.*, 2006).

To confirm the phagocytosis of myelin debris in our pro- and anti-inflammatory conditions, microglial cells were then incubated for 24 hours with myelin debris in the presence of TNF $\alpha$  or IL-4, and the myelin debris internalization within lysosomes was visualized using lysotracker<sup>®</sup> Red. Whatever the treatment, MBP was co-localized with the lystotracker<sup>®</sup> Red-stained lysosomes into microglia (Fig. 11).

### **The inhibition of myelin debris phagocytosis decreases their anti-inflammatory effects in both pro- and anti-inflammatory conditions**

Microglial cells were pre-treated for 1 hour with cytochalasin D, a phagocytosis inhibitor, before incubation for 24 hours with myelin debris and TNF $\alpha$  or IL-4.

Cytochalasin D prevented the myelin debris internalization into the lysosomes (Fig. 12).

Under pro-inflammatory conditions, cytochalasin D reduced the down-regulation of 2 out of 3 pro-inflammatory markers (CD86 and Ptg2; Fig. 13A) and the up-regulation of 1 out of 2 anti-inflammatory markers (IGF1; Fig. 13B) that were induced by myelin debris (Fig. 5A and B). However, incubation with cytochalasin D alone also up-regulated CD86 mRNA (Fig. 13A), and down-regulated IGF1 mRNA (Fig. 13B) to the same extent. In addition, as compared to microglia co-incubated with myelin debris and TNF $\alpha$ , cytochalasin D up-regulated the mRNA of CD32 (Fig. 13A) and IL4R $\alpha$  (Fig. 13C), two markers that were not modified by myelin debris (Fig. 5A and C).

Under anti-inflammatory conditions, among the two M2a markers up-regulated by myelin debris (Fig. 7B), cytochalasin D decreased IGF1 mRNA (Fig. 14B), similarly to cytochalasin D alone. Moreover, cytochalasin D up-regulated the mRNA of NOS2 and down-regulated that of two anti-inflammatory markers (CD206 and Arg1), as compared to microglia only incubated with myelin debris and IL-4 (Fig. 14A and B).

### **Discussion**

TBI, one of the leading causes of death and disability in the world, induces neuroinflammation and WMI, associated with cognitive and emotional disorders (Kinnunen *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2013; Kou and VandeVord, 2014; Armstrong *et al.*, 2016). It has been suggested that neuroinflammation, originating from microglial activation, could promote WMI over time. The latter are characterized by both axonal damage and myelin pathology, and it was suggested that myelin debris from injured axons could in turn enhance the inflammatory response that would further increase WMI, thus forming a vicious circle (Yang *et al.*, 2011). However, conflicting reports challenge this hypothesis, showing that the role of microglia is much more complex than thought.

To our knowledge, there is to date no direct evidence of the myelin debris role in post-TBI neuroinflammation, and more specifically in microglial polarization. Indeed, the available data originate from *in vivo* studies performed in animal models of MS and SCI. In the cuprizone experimental model of MS, Clarner and colleagues (2012) have shown that the magnitude of myelin loss is positively correlated with microgliosis. The *in vivo* injection of myelin-enriched brain debris into the CNS promoted a massive microglial (Clarner *et al.*, 2012) and macrophage accumulation (Sun *et al.*, 2010). In addition, incubation of bone marrow-derived macrophages (BMDM) or primary microglial cells with myelin debris induced a production of pro-inflammatory molecules (Pinteaux-Jones *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010) and/or a down-regulation of anti-inflammatory cytokines (Sun *et al.*, 2010). Moreover, the sulfatide, a major lipid component of myelin sheath, was reported to activate microglia *in vitro* and to induce inflammation-associated molecules (Jeon *et al.*, 2008). On the contrary, others have shown that myelin debris can also polarize microglia and macrophages into an anti-inflammatory phenotype both *in vitro* and in animal model of MS (Liu *et al.*, 2006; Boven *et al.*, 2006; Kroner *et al.*, 2016). Altogether these data suggested unclear and misunderstood effects of myelin debris.

Therefore, to further clarify their effects on microglial polarization in a context of TBI and the mechanism(s) involved, we performed an *in vitro* study on primary mouse microglia.

First, in our experimental conditions, the incubation of microglia with myelin debris alone induced no modification of the mRNA and protein expression of M1- and M2-like markers compared to control, suggesting that, in healthy CNS, “resting” microglia are not activated in presence of myelin debris. In contrast, Pinteaux-Jones and colleagues (2008) have shown that incubation of primary rat microglia with myelin debris induced NOS2 expression, as well as pro-inflammatory molecule release. One explanation might be the different rodent species used in our respective experiments. Indeed, although similarities exist between rat and mouse in response to various stimuli, there is increasing evidence of differences (Lively and Schlichter, 2018; Lively *et al.*, 2018), suggesting that cell surface receptors used by microglia to detect changes in their environment might differ between these species. When considering the microglial environment in demyelinating pathologies such as MS or TBI, myelin debris are generated when microglia are already activated in response to their inflammatory

environment. Indeed, microglial activation often overlaps with WMI both in human and animal models of TBI (Flygt *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Loane *et al.*, 2014b; Taib *et al.*, 2017). In a CCI model, we have recently demonstrated that TBI induced a mixed population of microglial phenotypes from 6 hours to 3 days after the impact, and that this microglial activation was associated with a demyelinating process, initiated at 6 hours, and significant at 7 days up to 3 months post-TBI (Taib *et al.*, 2017).

Therefore, to better elucidate the role of myelin debris in the pathology of TBI, it is crucial to consider this inflammatory environment. In order to mimic a pro-inflammatory condition, microglia was incubated with myelin debris in the presence of LPS, the most commonly used pro-inflammatory stimulus (Lively and Schlichter, 2018). Interestingly, myelin debris prevented the LPS-induced M1-like activation, evaluated by the protein expression of NOS2 and the associated NO production. Our result is in accordance with a recent study performed on mouse BMDM and microglia cultures, in which cells were pre-stimulated with LPS for 24 hours and then washed before incubation with myelin debris for 16 hours (Kroner *et al.*, 2014). This myelin exposure decreased significantly M1-like markers. Moreover, Boven and colleagues (2006) have shown that human macrophages, pre-incubated with myelin debris for 24 hours, were unable to respond to subsequent LPS stimulation. Altogether, these results suggest that myelin debris could exert anti-inflammatory effects whenever they are produced, i.e. before, simultaneously or after microglial activation.

Because TBI occurs without a bacterial infection in the brain, we then studied the effect of a more relevant pro-inflammatory stimulus, TNF $\alpha$ , which level (mRNA and protein) is increased following TBI (Frugier *et al.*, 2010; Kumar and Loane, 2012; Woodcock and Morganti-Kossmann, 2013; Taib *et al.*, 2017). Myelin debris prevented the TNF $\alpha$ -induced M1 activation, like in LPS-treated cells, but in addition, they promoted the anti-inflammatory M2a phenotype. Similar results were described in primary mouse microglia pre-stimulated with IFN $\gamma$  (Liu *et al.*, 2006). This study described a biphasic temporal effect of myelin debris, i.e. an enhanced gene expression of proinflammatory mediators ( $\leq 6$  hours), followed by their suppression from 6 to 24 hours. Interestingly, these results strengthen the opposite effects of myelin debris.

Considering the presence of a mixed M1/M2 microglia population after TBI (Wang *et al.*, 2013, 2015a; Loane *et al.*, 2014a,b; Kumar *et al.*, 2016a; Taib *et al.*, 2017), we also evaluated the effect of myelin debris on microglia in the presence of IL-4, a well-known anti-inflammatory cytokine (Gadani *et al.*, 2012) that is also increased after TBI (Dalgard *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2014; Ansari, 2015; Clausen *et al.*, 2018). Although IL-4 was used at a concentration known to induce a M2a phenotype (Chhor *et al.*, 2013; Siddiqui *et al.*, 2016; Lively and Schlichter, 2018), it did not significantly increase the gene expression of specific markers in our experimental conditions. Nevertheless its co-incubation with myelin debris up-regulated the cytoprotective growth factor IGF1 and also Lgals3, which is a modulator of proliferation, and oligodendrocyte maturation and remyelination (Chhor *et al.*, 2013). This anti-inflammatory effect of myelin debris is not consistent with prior study reporting that the incubation of M2 polarized mouse BMDM (pre-stimulated with Macrophage Colony-Stimulating Factor) with myelin debris significantly decrease the expression of M2-like markers and increase the expression of M1-like markers (Wang *et al.*, 2015b). Similarly, Siddiqui and colleagues (2016) have shown that myelin debris decrease the gene expression of M2-like markers in primary rat microglia pre-stimulated with IL-4 and increase the M1 profile in microglia pre-incubated with IFN $\gamma$  + TNF $\alpha$ . Thus, myelin debris can promote M2-like markers on functional or non-functional IL4-stimulated M2-like microglia.

Altogether our results suggest that myelin debris, generated after TBI, could therefore represent a potential endogenous anti-inflammatory component able to promote a protective M2 microglial phenotype involved in tissue repair. However, as previously reported, this M2 phenotype is transient, while the deleterious M1 phenotype can persist after TBI (Wang *et al.*, 2013; Loan *et al.*, 2014b). Thus, it would be interesting to develop strategies that could maintain this M2 activation over time and/or reduce the cytotoxic M1 phenotype in traumatized patients.

Therefore, we then evaluated whether an anti-inflammatory strategy could potentiate the beneficial effect of myelin debris. We focused on the inhibition of PARP, a nuclear enzyme involved in microglial activation (Kauppinen *et al.*, 2005, 2011; Besson, 2009; d'Avila *et al.*, 2011; Stoica *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2017). Physiologically, PARP-1 exerts beneficial effects, but its overactivation has been demonstrated deleterious in animal models of TBI (LaPlaca *et al.*, 2001; Besson *et al.*, 2003a,b,

2005b; Satchell *et al.*, 2003; Stoica *et al.*, 2014). Several experimental studies have shown that PARP inhibition can reduce inflammation and promote recovery after TBI (Besson, 2009; Berger *et al.*, 2018). However, pretreatment with the potent PARP inhibitor, PJ34, did not modify herein the gene expression changes induced by myelin debris in TNF $\alpha$ -stimulated microglia. In line with this *in vitro* result, we also observed no modification of M1- and M2-like mRNA markers in TBI mice treated with PJ34.

Although, the role of PARP is well documented in various aspects of neuroinflammation, to our knowledge, no study has, to date, evaluated the role of PARP in microglial polarization following TBI. Indeed, treatment with PARP inhibitors was shown to reduce microglial activation in animal models of TBI, but without characterizing microglial phenotypes (Homsy *et al.*, 2010; d'Avila *et al.*, 2011; Siopi *et al.*, 2011; Stoica *et al.*, 2014). Nevertheless, minocycline, a pleiotropic molecule known for its PARP inhibition activity, down-regulated the M1-like phenotype without modifying the M2 one in experimental models of amyotrophic lateral sclerosis (Kobayashi *et al.*, 2013), or spinal cord injury (Papa *et al.*, 2016). Moreover, in a stroke model, minocycline reduced levels of pro-inflammatory markers, but also increased those of a M2 marker (Yang *et al.*, 2015). It was also reported *in vitro* that PJ34 reduced pro-inflammatory markers in LPS- and IFN $\gamma$ -treated BV2 or primary mouse microglia (Stoica *et al.*, 2014), but the effect of myelin debris was not evaluated in this study. Thus, our *in vitro* and *in vivo* results suggest that PARP inhibition might be inefficient to modulate microglial phenotype in the presence of myelin debris.

At last, considering that one of the main roles of microglia is to clear cellular and molecular debris by phagocytosis, and that this latter contributes to microglial activation (Neumann *et al.*, 2009; Sierra *et al.*, 2013), we then evaluated whether the anti-inflammatory effects of myelin debris observed in our *in vitro* studies might result from their phagocytosis. Myelin debris were internalized into microglial lysosomes regardless of the environment, i.e “physiological”, pro- or anti-inflammatory, and microglia adopted the typical foamy morphology, as described with macrophages (Boven *et al.*, 2006). While myelin debris clearance by microglia has been well described in animal models of demyelinating pathologies, such as MS (Li *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2015a; Zhu *et al.*, 2017), to our knowledge, the

study of Kelley and colleagues (2007) is the only one that described microglia containing myelin debris after TBI.

Several data suggest that the phagocytosis activity of microglia following injury is more than simply tidying up, but instead plays a fundamental role in inflammatory and regenerative processes (Neumann *et al.*, 2009). Indeed, phagocytosis can modulate the microglial activation state by the production of pro- or anti-inflammatory molecules (Neumann *et al.*, 2009; Sierra *et al.*, 2013). Pathogen phagocytosis that involves pathogen recognition receptors, such as TLR, induces the production of pro-inflammatory cytokine by microglia. By contrast, phagocytosis of apoptotic cells, which involves receptors such as phosphatidylserine receptors and triggering receptor expressed on myeloid cell 2, stimulates the production of anti-inflammatory cytokines. Therefore, the impact of phagocytosis can be totally different according to the receptor involved, which could explain the conflicting results on myelin phagocytosis.

A *post-mortem* study reported that myelin ingestion induced a foamy appearance and confers anti-inflammatory function to myeloid cells in MS lesions (Boven *et al.*, 2006). Recently, it has been shown that the promotion of remyelination in the cuprizone-induced demyelinating model is associated with more clearance of degraded myelin debris (Zhu *et al.*, 2017). In addition, during this clearance process, microglia are mostly in a phagocytic shape and tend to change their phenotype toward M2 phenotype, suggesting an anti-inflammatory effect of myelin debris phagocytosis in the CNS. Furthermore, even though it has not been clearly demonstrated, most of the studies mentioned above related the myelin anti- (Liu *et al.*, 2006; Boven *et al.*, 2006; Kroner *et al.*, 2016) or pro-inflammatory effects (Wang *et al.*, 2015a; Siddiqui *et al.*, 2016) to their phagocytosis by microglia/macrophages. However, it is noteworthy that myelin phagocytosis does not seem to be systematically associated with pro- or anti-inflammatory effects, as observed in our first experiment with myelin debris alone. Furthermore the different LPS- and TNF $\alpha$ -induced effects, observed in our experiments, suggest that myelin debris phagocytosis might involve various pathways, even more that these stimuli act on different receptors.

Using the phagocytosis inhibitor, cytochalasin D, we confirmed that the beneficial effects of myelin debris are, at least in part, mediated by their phagocytosis. Indeed, one hour cytochalasin D pretreatment prevented the phagocytosis of myelin debris and reduced the associated down-regulation of one TNF $\alpha$ -induced M1 phenotype marker (Ptgs2), as well as the up-regulation of one IL-4-induced M2a phenotype marker (Lgals3). Moreover, this inhibitor increased the gene expression of M1 and M2b markers, but also decreased that of M2a markers, that were not initially modified by the co-incubation of myelin debris with TNF $\alpha$  or IL-4.

It is noteworthy that cytochalasin D is a potent inhibitor of actin polymerization on which phagocytosis relies (Mortensen and Larsson, 2003), but phagocytic cells such as microglia internalize a wide variety of extracellular material *via* several mechanisms named endocytosis, and these endocytosis pathways are more or less actin-dependent (Solé-Domènech *et al.*, 2016). Therefore, although cytochalasin D did not totally suppress the anti-inflammatory effects of myelin debris on microglia, this does not exclude that they may also have been partially internalized by other mechanism(s) more or less dependent of actin polymerization. In line with our results, cytochalasin D partially inhibited the  $\beta$  amyloid peptide phagocytosis by primary cultures of microglia and astrocytes (Jones *et al.*, 2013). Besides, our results also showed that incubation with cytochalasin D alone modified some microglial phenotype markers, as observed by the significant increase of CD86 and IL1Rn, and decrease of CD32, CD206 and IGF1. These effects might result from the modulation of cell signaling pathway(s), especially that involving the GTPase protein RhoA (Ras homolog gene family, member A) that regulates the changes of filamentous actin (F-actin) (Muehlich *et al.*, 2017; Scheiblich and Gerd Bicker, 2017). Indeed, the inhibition of ROCK, the main target of protein RhoA, decreased NOS2 expression and increased that of Arg1 in IFN $\gamma$ -stimulated microglia (Chen *et al.*, 2014a).

At last, other mechanisms than endocytosis cannot be excluded. Indeed, the lipid components of myelin debris could also modulate microglial polarization, as it has already been shown that polyunsaturated fatty acids (PUFA) promote M2 phenotype in LPS or IFN $\gamma$ -stimulated microglia (Chen *et al.*, 2014b). Although the mechanisms involved are still not clear, the protective effects of omega-3 PUFA have been well described in animal models of TBI (Lucke-Wold *et al.*, 2018).

## **Conclusion**

The present study has identified myelin debris as potential endogenous anti-inflammatory components following demyelinating pathologies, such as TBI. Our results suggest that myelin debris might promote the M2-like phenotype, and this beneficial effect seems to be partly related to their phagocytosis by microglia. Future work will have to identify which endocytosis pathway(s) is(are) particularly involved and/or other mechanism(s), in order to find strategies that could promote the protective M2-like phenotype, and thus reduce post-TBI damage.

## **Abbreviations**

ANOVA: analysis of variance; Arg1: arginase 1; CCI: controlled cortical impact; CD: cluster of differentiation; CNS: central nervous system; DAI: diffuse axonal injury; DAPI: 4-6-diamidino-2-phenylindole; DMSO: dimethylsulfoxide; HG: high glucose; Iba-1: ionized calcium binding adapter molecule 1; IGF1: insulin growth factor 1; IL: interleukin; IL1Rn: interleukin 1 receptor antagonist; IL4R $\alpha$ : interleukin 4 receptor alpha; INF $\gamma$ : interferon gamma; LPS: lipopolysaccharide; MBP: myelin basic protein; MS: multiple sclerosis; NOS2: NO synthase 2; PARP: poly(ADP-ribose)polymerase; PBS: phosphate-buffered saline; Ptgs2: prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2; also known as, cyclooxygenase-2 or COX-2); PUFA: polyunsaturated fatty acids, RNA: ribonucleic acid; RhoA: Ras homolog gene family, member A; Rpl13a: ribosomal protein L13A; RT-qPCR: real time quantitative polymerase chain reaction; SCI: spinal cord injury; Socs3: suppressor of cytokine signaling 3; Sphk1: sphingosine kinase 1; TBI: traumatic brain injury; TBS: Tris-buffered saline; TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha; WM: white matter; WMI: WM injury

## **References**

- Ansari MA. (2015). Temporal profile of M1 and M2 responses in the hippocampus following early 24h of neurotrauma. *J Neurol Sci*, 357: 41-49.
- Armstrong RC, Mierzwa AJ, Marion CM, Sullivan GM. (2016). White matter involvement after TBI: Clues to axon and myelin repair capacity. *Exp Neurol*, 275: 328-333.

- Berger NA, Besson VC, Boulares AH, Bürkle A, Chiarugi A, Clark RS, Curtin NJ, Cuzzocrea S, Dawson TM, Dawson VL, Haskó G, Liaudet L, Moroni F, Pacher P, Radermacher P, Salzman AL, Snyder SH, Soriano FG, Strosznajder RP, Sümegi B, Swanson RA, Szabo C. (2018). Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases. *Br J Pharmacol*, 175: 192-222.
- Besson VC, Croci N, Boulu RG, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C. (2003a). Deleterious poly(ADP-ribose)polymerase-1 pathway activation in traumatic brain injury in rat. *Brain Res*, 989:58-66.
- Besson VC, Margaille I, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C. (2003b). Deleterious activation of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in brain after in vivo oxidative stress. *Free Radic Res*, 37: 1201-1208.
- Besson VC, Chen XR, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C. (2005a). Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, exerts neuroprotective effects in traumatic brain injury. *Neurosci Lett*, 388: 7-12.
- Besson VC. (2009). Drug targets for traumatic brain injury from poly(ADP-ribose)polymerase pathway modulation. *Br J Pharmacol*, 157(5): 695-704.
- Boven LA, Van Meurs M, Van Zwam M, Wierenga-Wolf A, Hintzen RQ, Boot RG, Aerts JM, Amor S, Nieuwenhuis EE, Laman JD. (2006). Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. *Brain*, 129: 517-526.
- Chen C, Li YH, Zhang Q, Yu JZ, Zhao YF, Ma CG, Xiao BG. (2014a). Fasudil regulates T cell responses through polarization of BV-2 cells in mice experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Pharmacol Sin*, 35: 1428-1438.
- Chen S, Zhang H, Pu H, Wang G, Li W, Leak RK, Chen J, Liou AK, Hu X. (2014b). n-3 PUFA supplementation benefits microglial responses to myelin pathology. *Sci Rep*, 4:7458
- Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*, 11: 98.

- Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, Oré MV, Celador IL, Josserand J, Degos V, Jacotot E, Hagberg H, Sävmán K, Mallard C, Gressens P, Fleiss B. (2013). Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behav Immun*, 32: 70-85.
- Clarner T, Diederichs F, Berger K, Denecke B, Gan L, van der Valk P, Beyer C, Amor S, Kipp M. (2012). Myelin debris regulates inflammatory responses in an experimental demyelination animal model and multiple sclerosis lesions. *Glia*, 60: 1468-1480.
- Clausen F, Marklund N, Hillered L. (2018). Acute Inflammatory Biomarker Responses to Diffuse Traumatic Brain Injury in the Rat Monitored by a Novel Microdialysis Technique. *J Neurotrauma*, doi:10.1089/neu.2018.5636.
- Colton CA. (2009). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*, 4: 399-418.
- Curtin NJ, Szabo C. (2013). Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond. *Mol Aspects Med*, 34: 1217-1256.
- Dalgard CL, Cole JT, Kean WS, Lucky JJ, Sukumar G, McMullen DC, Pollard HB, Watson WD. (2012). The cytokine temporal profile in rat cortex after controlled cortical impact. *Front Mol Neurosci*, 5:6.
- d'Avila JC, Lam TI, Bingham D, Shi J, Won SJ, Kauppinen TM, Massa S, Liu J, Swanson RA. (2012). Microglial activation induced by brain trauma is suppressed by post-injury treatment with a PARP inhibitor. *J Neuroinflammation*, 9: 31.
- Donat CK, Scott G, Gentleman SM, Sastre M. (2017). Microglial activation in traumatic brain injury. *Front. Aging Neurosci*, 9: 208.
- Frugier T, Morganti-Kossmann MC, O'Reilly D, McLean CA. (2010). In situ detection of inflammatory mediators in post mortem human brain tissue after traumatic injury. *J Neurotrauma*, 27(3):497-507.
- Gadani SP, Cronk JC, Norris GT, Kipnis J. (2012). IL-4 in the brain: a cytokine to remember. *J Immunol*, 189(9):4213-9.
- Geoffroy CG, Zheng B. (2014). Myelin-associated inhibitors in axonal growth after CNS injury. *Curr Opin Neurobiol*, 27: 31-38.

- Homsi S, Piaggio T, Croci N, Noble F, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. (2010). Blockade of acute microglial activation by minocycline promotes neuroprotection and reduces locomotor hyperactivity after closed head injury in mice: a twelve-week follow-up study. *J Neurotrauma*, 27(5): 911-921.
- Jeon SB, Yoon HJ, Park SH, Kim IH, Park EJ. (2008). Sulfatide, a major lipid component of myelin sheath, activates inflammatory responses as an endogenous stimulator in brain-resident immune cells. *J Immunol*, 181: 8077-8087.
- Johnson VE, Stewart JE, Begbie FD, Trojanowski JQ, Smith DH, Stewart W. (2013). Inflammation and white matter degeneration persist for year after a single traumatic brain injury. *Brain*, 136: 28-42.
- Jones RS, Minogue AM, Connor TJ, Lynch MA. (2013). Amyloid- $\beta$ -induced astrocytic phagocytosis is mediated by CD36, CD47 and RAGE. *J Neuroimmune Pharmacol*, 8(1): 301-1.
- Kauppinen TM, Swanson RA. (2005). Poly(ADP-ribose)polymerase-1 promotes microglial activation, proliferation, and matrix metalloproteinase-9-mediated neuron death. *J Immunol*, 174: 2288-2296.
- Kauppinen TM, Suh SW, Higashi Y, Berman AE, Escartin C, Won SJ, Wang C, Cho SH, Gan L, Swanson RA. (2011). Poly(ADP-ribose)polymerase-1 modulates microglial responses to amyloid  $\beta$ . *J Neuroinflammation*, 8:152.
- Kelley B.J, Lifshitz J, Povlishock J.T. (2007). Neuroinflammatory responses after experimental diffuse traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 66: 989-1001.
- Kinnunen KM, Greenwood R, Powell JH, Leech R, Hawkins PC, Bonnelle V, Patel MC, Counsell SJ, Sharp DJ. (2011). White matter damage and cognitive impairment after traumatic brain injury. *Brain*, 134: 449-463.
- Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, Hirakawa A, Takeuchi H, Suzumura A, Ishiguro N, Kadomatsu K. (2013). Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis*, 4: e525.
- Kotter MR, Li WW, Zhao C, Franklin RJ. (2006). Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. *J Neurosci*, 26: 328-332.

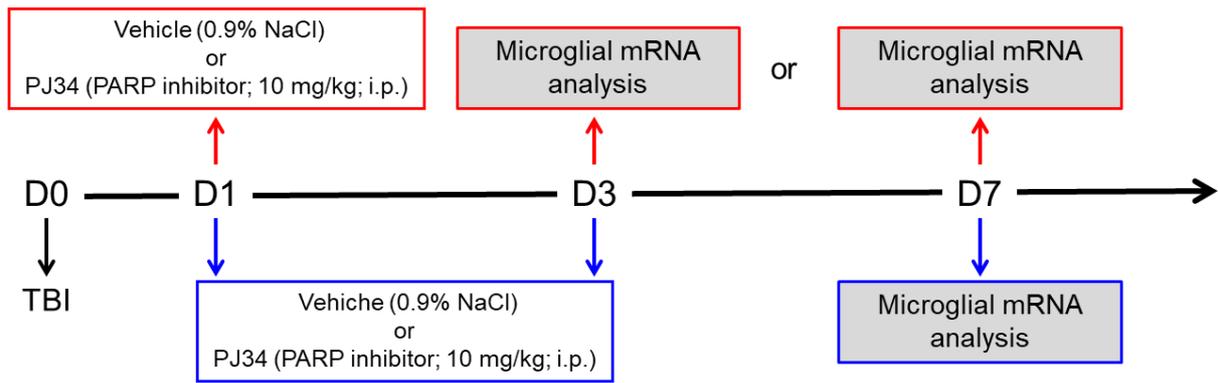
- Kou, Z, VandeVord PJ. (2014). Traumatic white matter injury and glial activation: from basic science to clinics. *Glia*, 62: 1831-1855.
- Kroner A, Greenhalgh AD, Zarruk JG, Passos Dos Santos R, Gaestel M, David S. (2014). TNF and increased intracellular iron alter macrophage polarization to a detrimental M1 phenotype in the injured spinal cord. *Neuron*, 83: 1098-1116.
- Kumar A, Loane DJ. (2012). Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav Immun*, 26: 1191-1201.
- Kumar A, Alvarez-Croda DM, Stoica BA, Faden AI, Loane DJ. (2016a). Microglial/Macrophage polarization dynamics following traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 33: 1732-1750.
- Lampron A, Larochelle A, Laflamme N, Préfontaine P, Plante MM, Sánchez MG, Yong VW, Stys PK, Tremblay MÈ, Rivest S. (2015). Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes. *J Exp Med*, 212: 481-495.
- Li H, Cuzner ML, Newcombe J. (1996). Microglia-derived macrophages in early multiple sclerosis plaques. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 22: 207-215.
- Lively S, Schlichter LC. (2018). Microglia responses to pro-inflammatory stimuli (LPS, IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ ) and reprogramming by resolving cytokines (IL-4, IL-10). *Front Cell Neurosci*, 12:215.
- Lively S, Lam D, Wong R, Schlichter LC. (2018). Comparing effects of transforming growth factor  $\beta$ 1 on microglia from rat and mouse: transcriptional profiles and potassium channels. *Front Cell Neurosci*, 12:115.
- Liu Y, Hao W, Letiembre M, Walter S, Kulanga M, Neumann H, Fassbender K. (2006). Suppression of microglial inflammatory activity by myelin phagocytosis: role of p47-PHOX-mediated generation of reactive oxygen species. *J Neurosci*, 26: 12904-12913.
- Loane DJ, Stoica BA, Tchanchou F, Kumar A, Barrett JP, Akintola T, Xue F, Conn PJ, Faden AI. (2014a). Novel mGluR5 positive allosteric modulator improves functional recovery, attenuates neurodegeneration, and alters microglial polarization after experimental traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, 11: 857-869.

- Loane DJ, Kumar A, Stoica BA, Cabatbat R, Faden AI. (2014b). Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma: association with chronic microglial activation. *J Neuropathol Exp Neurol*, 73: 14-29.
- Loane DJ, Kumar.A. (2016). Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol*, 275: 316-327.
- LaPlaca MC, Zhang J, Raghupathi R, Li JH, Smith F, Bareyre FM, Snyder SH, Graham DI, McIntosh TK. (2001). Pharmacologic inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase is neuroprotective following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*, 18: 369-376.
- Lucke-Wold BP, Logsdon AF, Nguyen L, Eltanahay A, Turner RC, Bonasso P, Knotts C, Moeck A, Maroon JC, Bailes JE, Rosen CL. (2018). Supplements, nutrition, and alternative therapies for the treatment of traumatic brain injury. *Nutr Neurosci*, 21(2):79-91.
- Maas A.I.R, Menon DK, Adelson PD, Andelic N, Bell MJ, Belli A, Bragge P, Brazinova A, Büki A, Chesnut R.M, Citerio G, Coburn M, Cooper D.J, Crowder A.T, Czeiter E, Czosnyka M, Diaz-Arrastia R, Dreier J.P, Duhaime A.C, Ercole A, van Essen T.A, Feigin VL, Gao G, Giacino J, Gonzalez-Lara LE, Gruen RL, Gupta D, Hartings JA, Hill S, Jiang JY, Ketharanathan N, Kompanje EJO, Lanyon L, Laureys S, Lecky F, Levin H, Lingsma HF, Maegele M, Majdan M, Manley G, Marsteller J, Mascia L, McFadyen C, Mondello S, Newcombe V, Palotie A, Parizel PM, Peul W, Piercy J, Polinder S, Puybasset L, Rasmussen TE, Rossaint R, Smielewski P, Söderberg J, Stanworth SJ, Stein MB, von Steinbüchel N, Stewart W, Steyerberg EW, Stocchetti N, Synnot A, Te Ao B, Tenovuo O, Theadom A, Tibboel D, Videtta W, Wang KKW, Williams WH, Wilson L, Yaffe K, InTBIR Participants and Investigators. (2017). Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol*, 16: 987-1048.
- McConeghy KW, Hatton J, Hughes L, Cook AM. (2012). A review of neuroprotection pharmacology and therapies in patients with acute traumatic brain injury. *CNS Drugs*, 26: 613-636.
- Miklossy J, Van der Loos H. (1991). The long-distance effects of brain lesions: visualization of myelinated pathways in the human brain using polarizing and fluorescence microscopy. *J Neuropathol. Exp Neurol*, 50: 1-15.

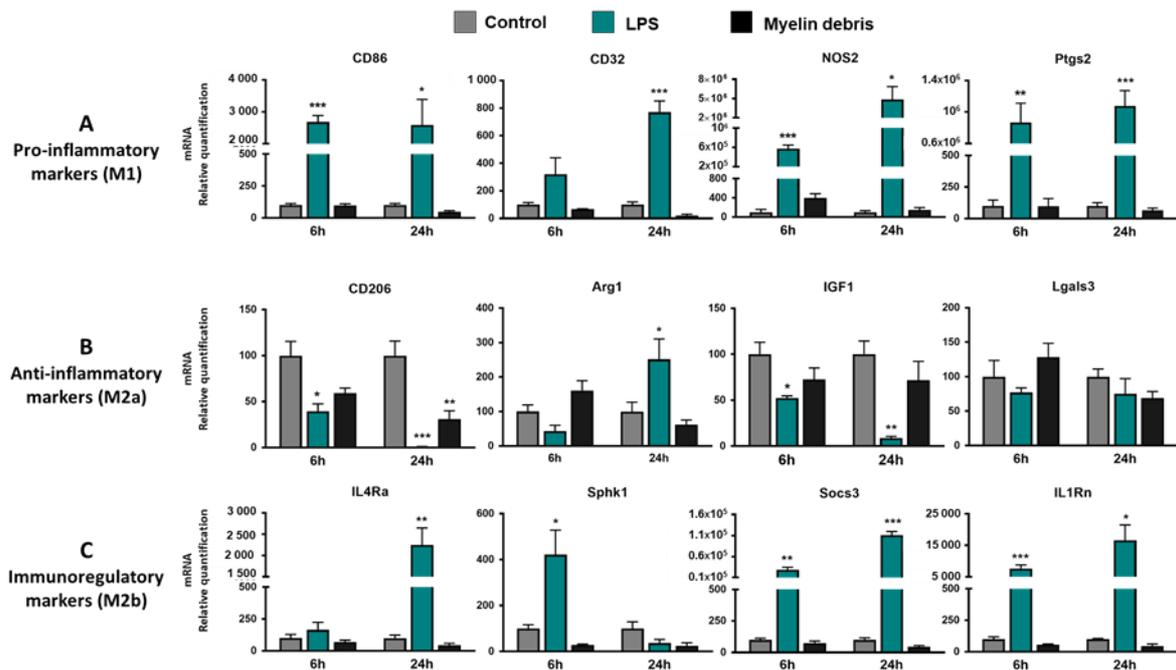
- Mortensen K, Larsson LI. (2003). Effects of cytochalasin D on the actin cytoskeleton: association of neoformed actin aggregates with proteins involved in signaling and endocytosis. *Cell Mol Life Sci*, 60(5):1007-12.
- Muehlich S, Rehm M, Ebenau A, Goppelt-Struebe M. (2017). Synergistic induction of CTGF by cytochalasin D and TGF $\beta$ -1 in primary human renal epithelial cells: Role of transcriptional regulators MKL1, YAP/TAZ and Smad2/3. *Cell Signal*, 29:31-40.
- Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ. (2009). Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain*, 132: 288-295.
- Ni M, Aschner M. (2010). Neonatal rat primary microglia: isolation, culturing, and selected applications. *Curr Protoc Toxicol*, Chapter 12: Unit 12.17.
- Norton WT, Poduslo SE. (1973). Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J Neurochem*, 21: 749-757.
- Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*, 173: 649–665.
- Papa S, Caron I, Erba E, Panini N, De Paola M, Mariani A, Colombo C, Ferrari R, Pozzer D, Zanier ER, Pischiutta F, Lucchetti J, Bassi A, Valentini G, Simonutti G, Rossi F, Moscatelli D, Forloni G, Veglianesi P. (2016). Early modulation of pro-inflammatory microglia by minocycline loaded nanoparticles confers long lasting protection after spinal cord injury. *Biomaterials*, 75: 13-24.
- Pinteaux-Jones F, Sevastou IG, Fry VA, Heales S, Baker D, Pocock JM. (2008). Myelin-induced microglial neurotoxicity can be controlled by microglial metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem*, 106: 442-454.
- Robinson S, Miller RH. (1999). Contact with central nervous system myelin inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Dev Biol*, 216: 359-368.
- Satchell MA, Zhang X, Kochanek PM, Dixon CE, Jenkins LW, Melick J, Szabó C, Clark RS. (2003). A dual role for poly-ADP-ribosylation in spatial memory acquisition after traumatic brain injury in mice involving NAD<sup>+</sup> depletion and ribosylation of 14-3-3 $\gamma$ . *J Neurochem*, 85: 697-708.
- Scheiblich H, Bicker G. (2017). Regulation of Microglial phagocytosis by RhoA/ROCK-Inhibiting Drugs. *Cell Mol Neurobiol*, 37(3):461-473.

- Siddiqui TA, Lively S, Schlichter LC. (2016). Complex molecular and functional outcomes of single versus sequential cytokine stimulation of rat microglia. *J Neuroinflammation*, 13: 66.
- Sierra A, Abiega O, Shahraz A, Neumann H. (2013). Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front Cell Neurosci*, 7: 6.
- Siopi E, Cho AH, Homsy S, Croci N, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. (2011). Minocycline restores sAPP $\alpha$  levels and reduces the late histopathological consequences of traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma*, 28(10): 2135-43.
- Solé-Domènech S, Cruz DL, Capetillo-Zarate E, Maxfield FR. (2016). The endocytic pathway in microglia during health, aging and Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*, 32:89-103.
- Stoica BA, Loane DJ, Zhao Z, Kabadi SV, Hanscom M, Byrnes KR, Faden AI. (2014). PARP-1 inhibition attenuates neuronal loss, microglia activation and neurological deficits after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 31: 758-772.
- Su Y, Fan W, Ma Z, Wen X, Wang W, Wu Q, Huang H. (2014). Taurine improves functional and histological outcomes and reduces inflammation in traumatic brain injury. *Neuroscience*, 266:56-65.
- Sun X, Wang X, Chen T, Li T, Cao K, Lu A, Chen Y, Sun D, Luo J, Fan J, Young W, Ren Y. (2010). Myelin activates FAK/Akt/NF-kappaB pathways and provokes CR3 dependent inflammatory response in murine system. *PLoS One*, 5: e9380.
- Taib T, Leconte C, Van Steenwinckel J, Cho AH, Palmier B, Torsello E, Lai Kuen R, Onyeomah S, Ecomard K, Benedetto C, Coqueran B, Novak AC, Deou E, Plotkine M, Gressens P, Marchand-Leroux C, Besson VC. (2017). Neuroinflammation, myelin and behavior: Temporal patterns following mild traumatic brain injury in mice. *PLoS One*, 12(9): e0184811.
- Wang G, Zhang J, Hu X, Zhang L, Mao L, Jiang X, Liou AK, Leak RK, Gao Y, Chen J. (2013). Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33(12): 1864-74.
- Wang G, Shi Y, Jiang X, Leak RK, Hu X, Wu Y, Pu H, Li WW, Tang B, Wang Y, Gao Y, Zheng P, Bennett MV, Chen J. (2015a). HDAC inhibition prevents white matter injury by modulating

- microglia/macrophage polarization through the GSK3 $\beta$ /PTEN/Akt axis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(9): 2853-8.
- Wang X, Cao K, Sun X, Chen Y, Duan Z, Sun L, Guo L, Bai P, Sun D, Fan J, He X, Young W, Ren Y. (2015b). Macrophages in spinal cord injury: phenotypic and functional change from exposure to myelin debris. *Glia*, 63(4): 635-51.
- Wen L, Xu J, Zhan T, Wang H, Huang X, Liu W, Yang X, Zhan Z. (2014). The occurrence of diffuse axonal injury in the brain: associated with the accumulation and clearance of myelin debris. *Neural Regen Res*, 9(21): 1902–1906.
- Woodcock T, Morganti-Kossmann MC. (2013). The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Front Neurol*, 4: 18.
- Xu J, Wang HWon SJ, Basu J, Kapfhamer D, Swanson RA. (2016). Microglial activation induced by the alarmin S100B is regulated by poly(ADP-ribose). polymerase-1. *Glia*, 64(11): 1869-78.
- Yan EB, Satgunaseelan L, Paul E, Bye N, Nguyen P, Agyapomaa D, Kossmann T, Rosenfeld JV, Morganti-Kossmann MC. (2014). Post-traumatic hypoxia is associated with prolonged cerebral cytokine production, higher serum biomarker levels, and poor outcome in patients with severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 31(7):618-29.
- Yang XF, Wang H, Wen L. (2011). From myelin debris to inflammatory responses: a vicious circle in diffuse axonal injury. *Med Hypotheses*, 77(1): 60-2.
- Yang Y, Salayandia VM, Thompson J F, Yang L Y, Estrada E Y, Yang Y. (2015). Attenuation of acute stroke injury in rat brain by minocycline promotes blood–brain barrier remodeling and alternative microglia/macrophage activation during recovery. *J Neuroinflammation*, 12: 26.
- Zhu K, Sun J, Kang Z, Zou Z, Wu G, Wang J. (2017). Electroacupuncture promotes remyelination after cuprizone treatment by enhancing myelin debris clearance. *Front Neurosci*, 10: 613.



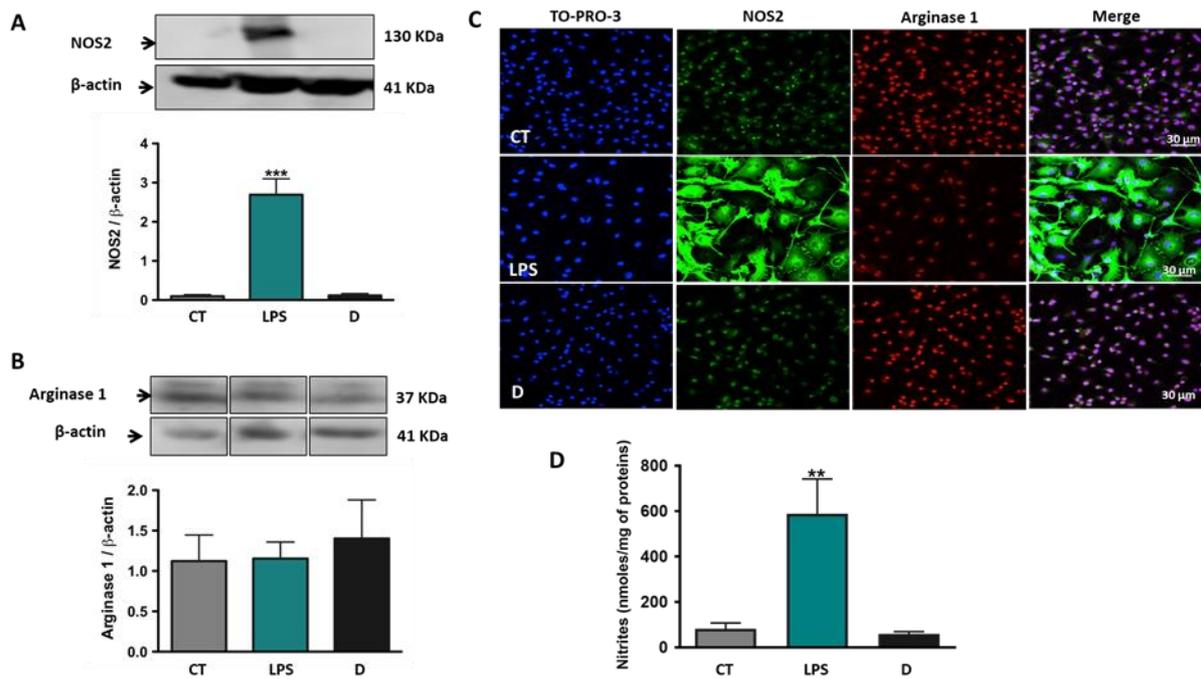
**Figure 35: Outline of the *in vivo* experimental study and the time points of microglia/macrophage phenotype assessment by RT-qPCR.**



**Figure 2: Effects of myelin debris on gene expression of M1 and M2-like phenotype markers on unstimulated microglia.**

Microglia were incubated, for 6 or 24 hours, with vehicle (0.5 mM Tris-HCl, pH 7.4; control), LPS (100 ng/ml; positive control of M1-like phenotype) or myelin debris (40  $\mu$ g/ml). Phenotype markers were grouped as (A) pro-inflammatory M1, (B) anti-inflammatory M2a and (C) immunoregulatory M2b. mRNA shown relative to CT (normalized to 100%).

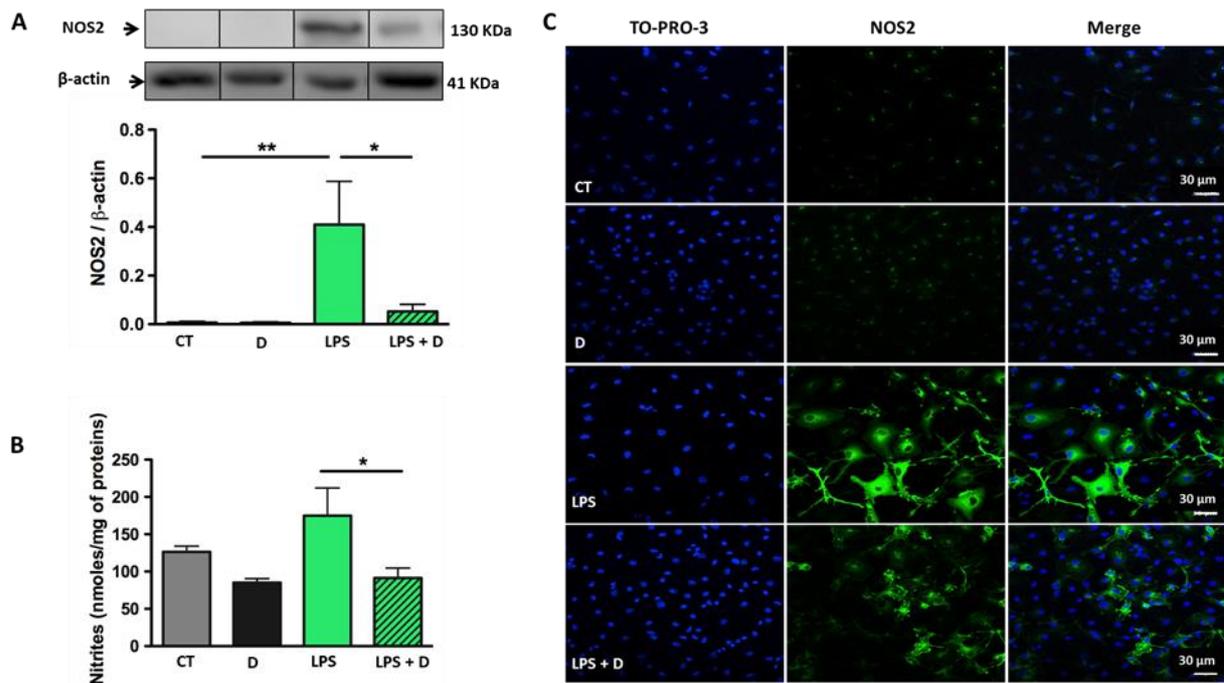
Data from 3 experiments are expressed as mean  $\pm$  sem. One-way ANOVA followed by a Dunnett test: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  versus CT.



**Figure 3: Effects of myelin debris on protein expression of M1- and M2-like phenotype markers (NOS2 and arginase 1) and NO production on unstimulated microglia.**

Microglia were incubated for 24 hours with vehicle (0.5 mM Tris-HCl, pH 7.4; control, CT), LPS (100 ng/ml; positive control of M1-like phenotype) or myelin debris (40 μg/ml; D). (A) NOS2 and (B) arginase 1 protein expressions assessed by western blotting, and shown relative to β-actin. (C) Representative confocal images showing the expression of NOS2 (green) and arginase 1 (red) in microglia, with nuclei labeled with TO-PRO-3 (blue), (D) Nitrites measurement in the supernatants of microglia cultures.

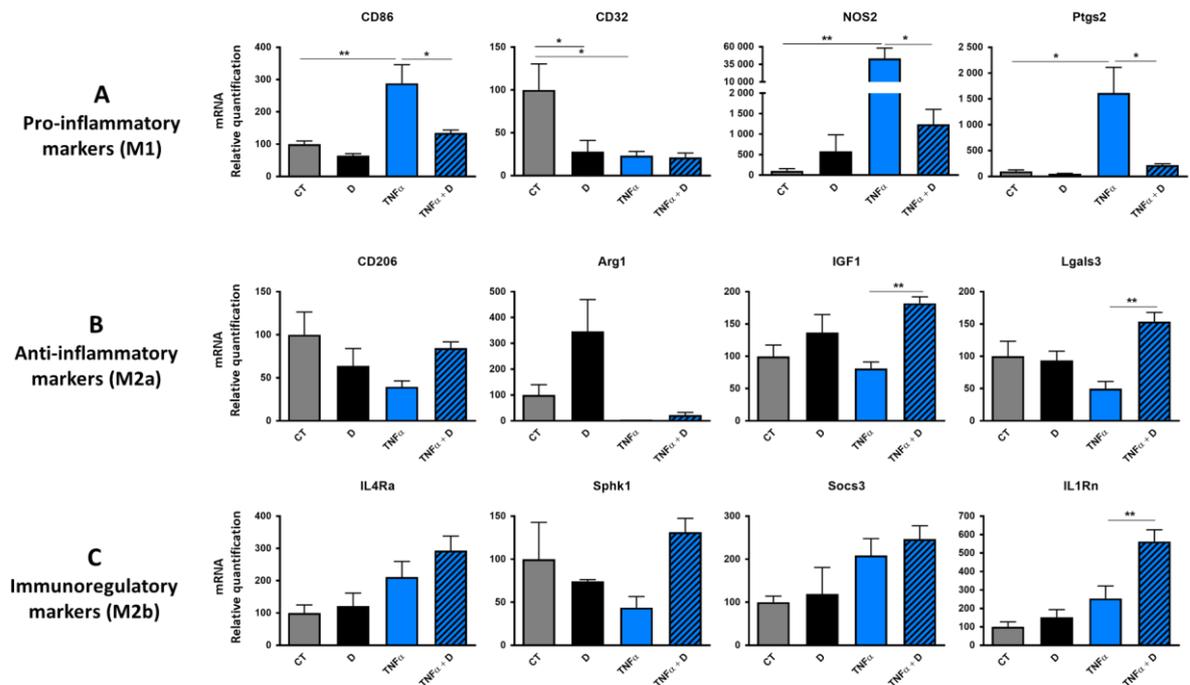
Data from at least 3 experiments (3-5) are expressed as mean ± sem. One-way ANOVA followed by a Dunnett test: \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 *versus* CT.



**Figure 4: Effects of myelin debris on NOS2 protein expression and NO production by LPS-stimulated microglia**

Microglia were incubated for 24 hours with vehicle (0.5 mM Tris-HCl, pH 7.4; control, CT), myelin debris (40  $\mu$ g/ml; D), LPS (10 ng/ml), or LPS + myelin debris. (A) Protein expression of NOS2 assessed by western blotting and shown relative to  $\beta$ -actin. (B) Nitrites measurement in the supernatants of microglia cultures. (C) Representative confocal images showing the expression of NOS2 (green) in microglia, with nuclei labeled with TO-PRO-3 (blue).

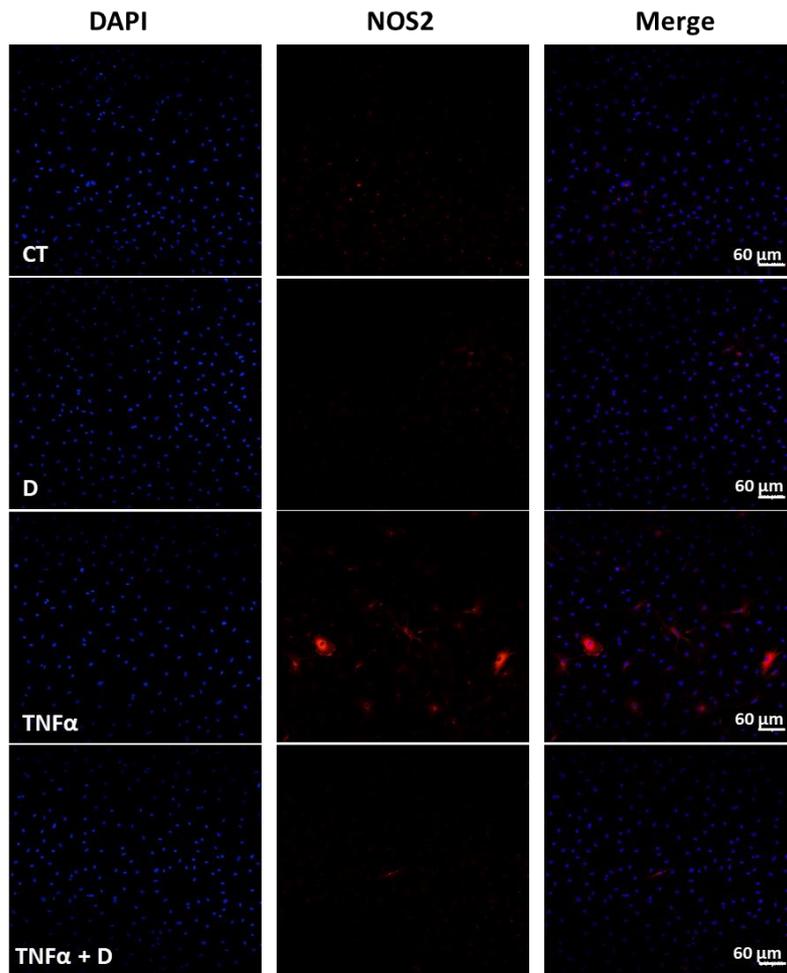
Data from 5 experiments are expressed as mean  $\pm$  sem. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test: \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ .



**Figure 5: Effects of myelin debris on gene expression of M1- and M2-like phenotype markers by TNF $\alpha$ -stimulated microglia.**

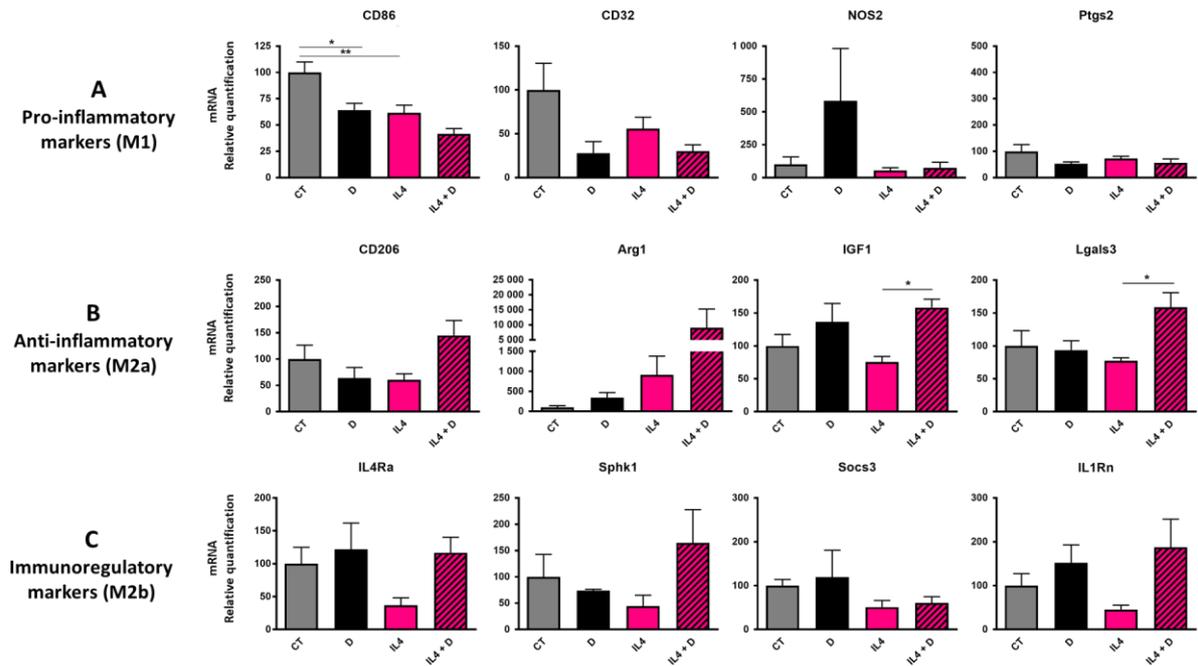
Microglia were incubated for 24 hours with vehicle (0.5 mM Tris-HCl, pH 7.4; control, CT), myelin debris (40  $\mu$ g/ml; D), TNF $\alpha$  (50 ng/ml) or TNF $\alpha$  + myelin debris. Phenotype markers are grouped as (A) pro-inflammatory M1, (B) anti-inflammatory M2a and (C) immunoregulatory M2b. mRNA shown relative to CT (normalized to 100%).

Data from at least 4 experiments (4-5) are expressed as mean  $\pm$  sem. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test; \*P<0.05 and \*\*P<0.01.



**Figure 6: Effects of myelin debris on the protein expression of NOS2 by TNF $\alpha$ -stimulated microglia.**

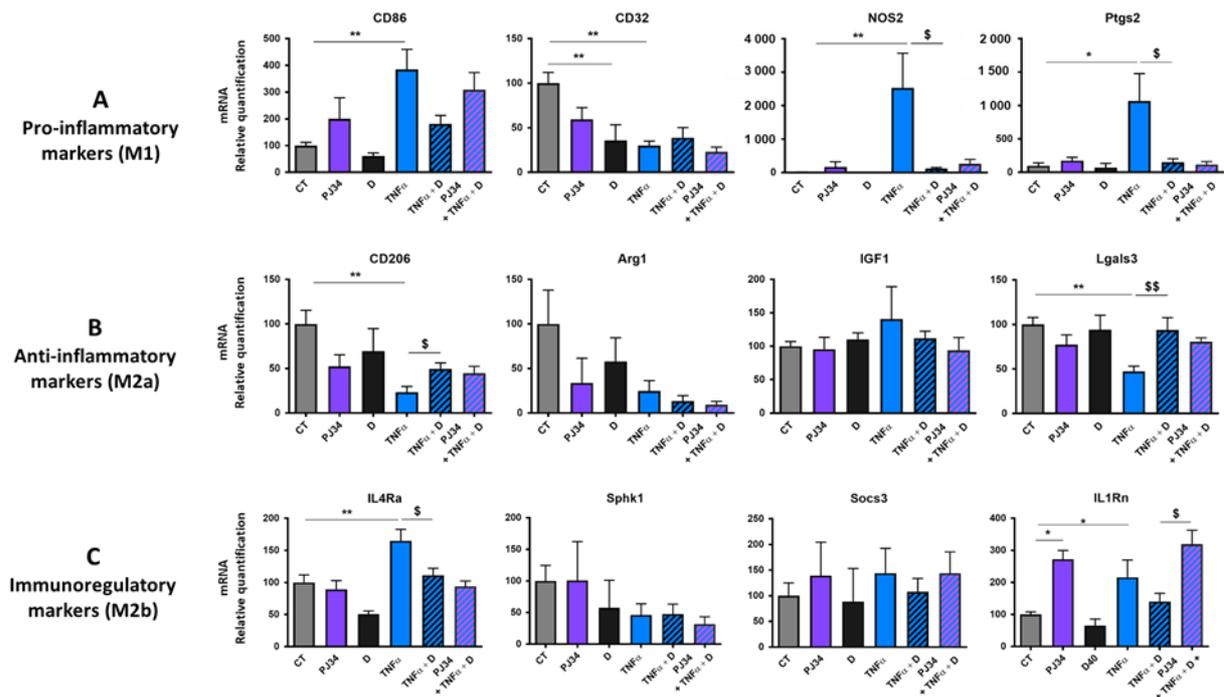
Representative confocal images showing the protein expression of NOS2 (red), with nuclei labeled with DAPI (blue). Microglia were incubated for 24 hours with vehicle (0.5 mM Tris-HCl, pH 7.4; control, CT), myelin debris (40  $\mu$ g/ml; D), TNF $\alpha$  (50 ng/ml) or TNF $\alpha$  + myelin debris.



**Figure 7: Effects of myelin debris on gene expression of M1- and M2-like phenotype markers by IL-4-stimulated microglia.**

Microglia were incubated for 24 hours with vehicle (0.5 mM Tris-HCl, pH 7.4; control, CT), myelin debris (40  $\mu$ g/ml; D), IL-4 (20 ng/ml) or IL-4 + myelin debris. Phenotype markers are grouped as (A) pro-inflammatory M1, (B) anti-inflammatory M2a and (C) immunoregulatory M2b. mRNA shown relative to CT (normalized to 100%).

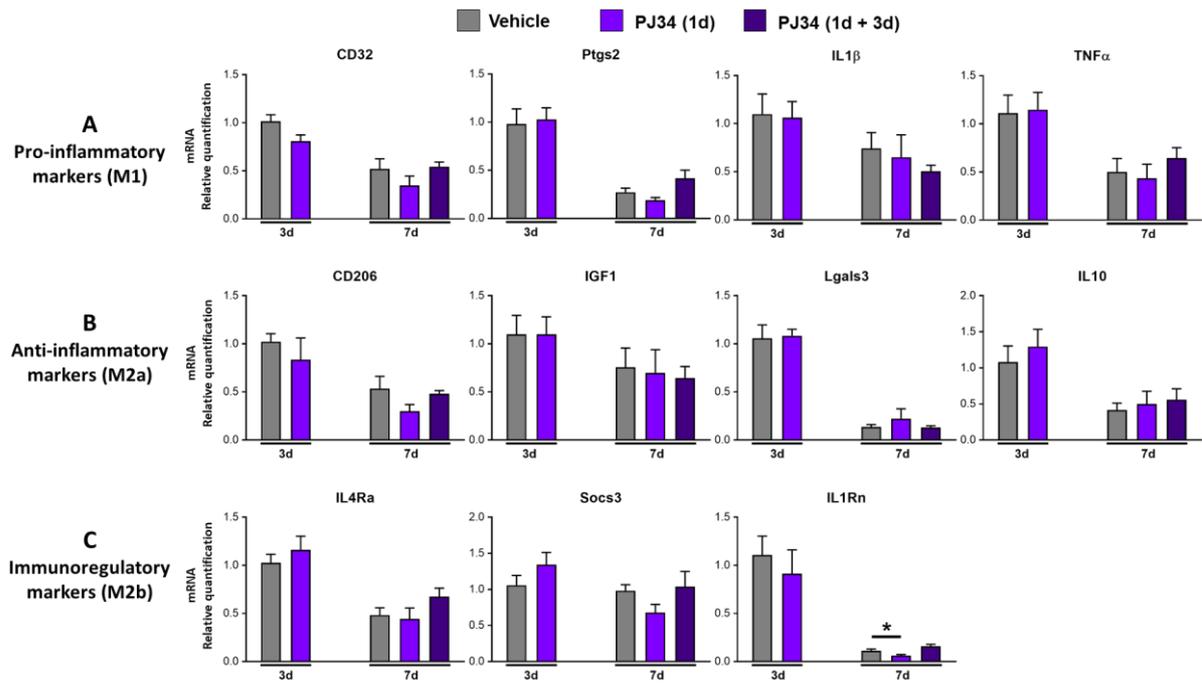
Data from at least 4 experiments (4-5) are expressed as mean  $\pm$  sem. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test: \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$



**Figure 8: Effects of PARP inhibition on the myelin debris-induced phenotype changes in TNF $\alpha$ -stimulated microglia.**

Microglia were incubated for 24 hours with vehicle (0.5 mM Tris-HCl, pH 7.4; control, CT), PJ34 (20  $\mu$ M), myelin debris (40  $\mu$ g/ml; D), TNF $\alpha$  (50 ng/ml), TNF $\alpha$  + myelin debris or pre-treated with PJ34 for 1 hour before incubation with TNF $\alpha$  + myelin debris. Phenotype markers are grouped as (A) pro-inflammatory M1, (B) anti-inflammatory M2a and (C) immunoregulatory M2b. mRNA shown relative to CT (normalized to 100%).

Data from at least 3 experiments (3-7) are expressed as mean  $\pm$  sem. One-way ANOVA followed by a Dunnett test: \*P<0.05 and \*\*P<0.01 *versus* CT; \$P<0.05 and \$\$P<0.01 *versus* TNF $\alpha$  + D.

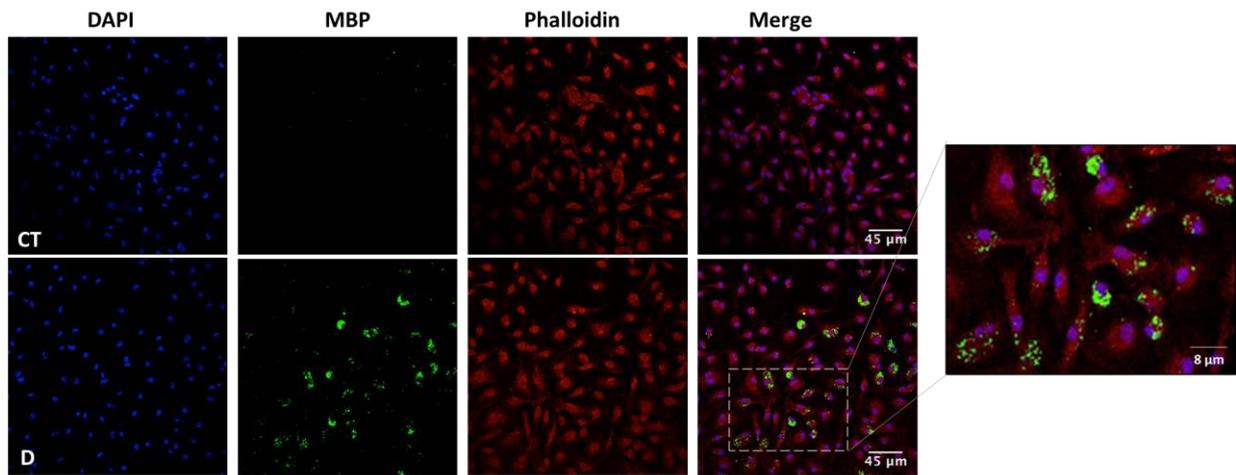


**Figure 9: Effects of PARP inhibition on gene expression of microglia/macrophage M1- and M2-like phenotype markers following TBI.**

Phenotype markers are grouped as (A) pro-inflammatory M1, (B) anti-inflammatory M2a and (C) immunoregulatory M2b. CD11b<sup>+</sup> brain cells were magnetically isolated 3 or 7 days after TBI.

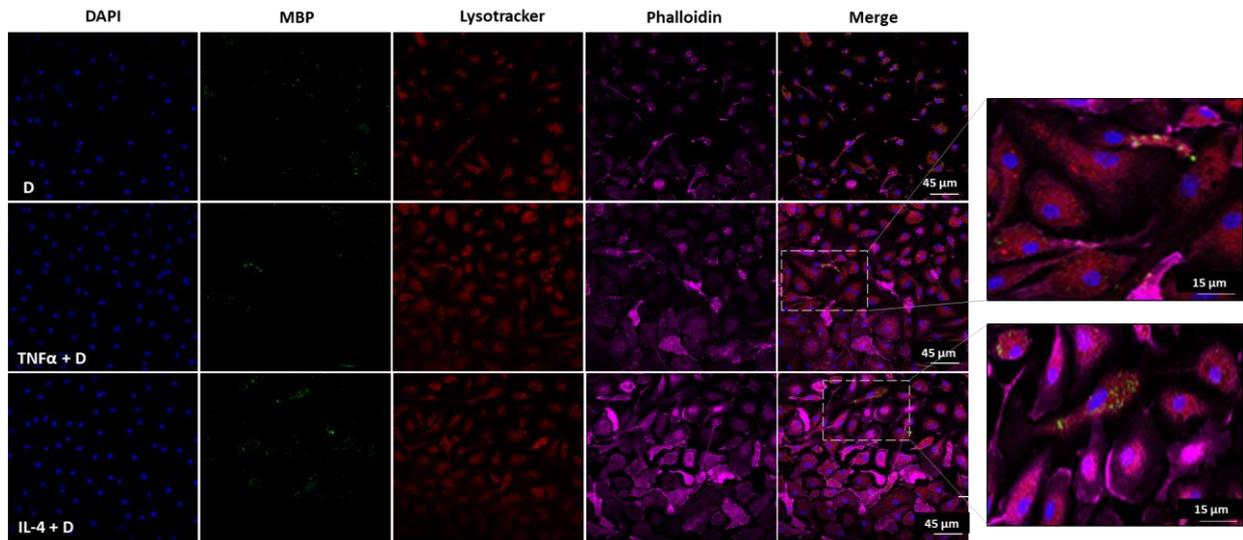
PARP inhibitor, PJ34 (10 mg/kg), was intraperitoneally administered (10 ml/kg) either just 1 day after TBI or twice, 1 and 3 days post-TBI. Animals were euthanized 3 or 7 days after TBI. Control TBI mice received the vehicle of PJ34 (0.9% NaCl).

Data are expressed as mean  $\pm$  sem. One-way ANOVA followed by a Dunnett test: \* $P < 0.05$  versus vehicle.



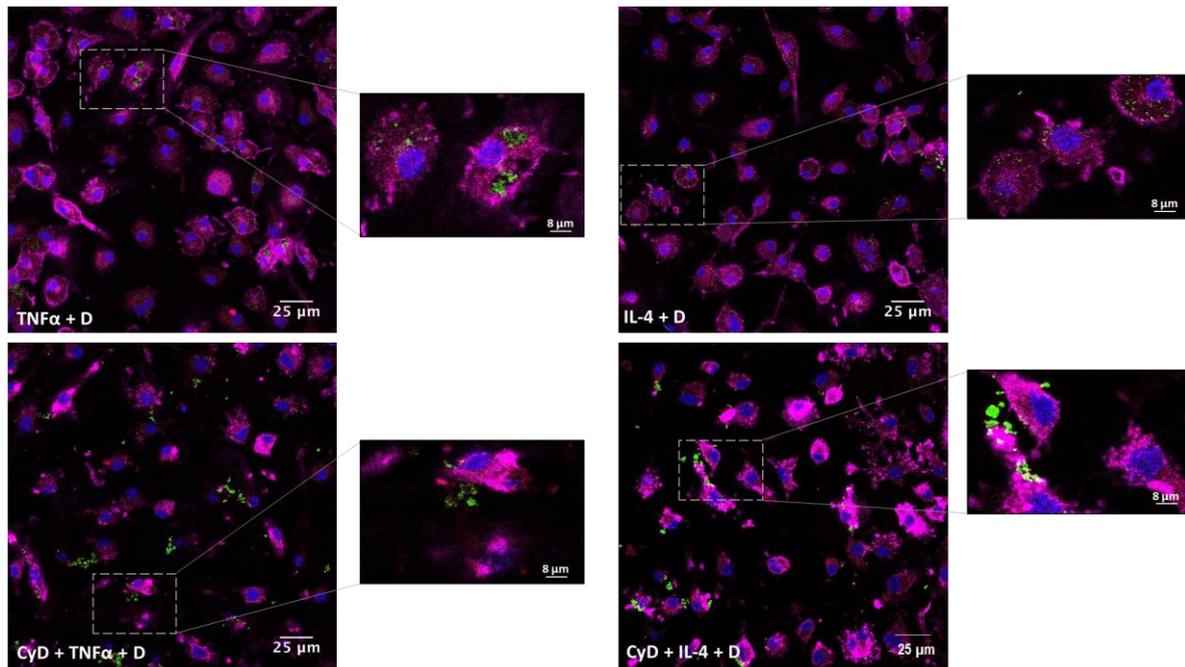
**Figure 10: Internalization of myelin debris by unstimulated microglia**

Representative confocal images showing myelin debris (MBP, green) and microglial cytoskeleton (phalloidin, red), with nuclei labeled with DAPI (blue). Microglia were incubated for 24 hours with vehicle (0.5 mM Tris-HCl, pH 7.4; control; CT) or myelin debris (40  $\mu\text{g/ml}$ ; D).



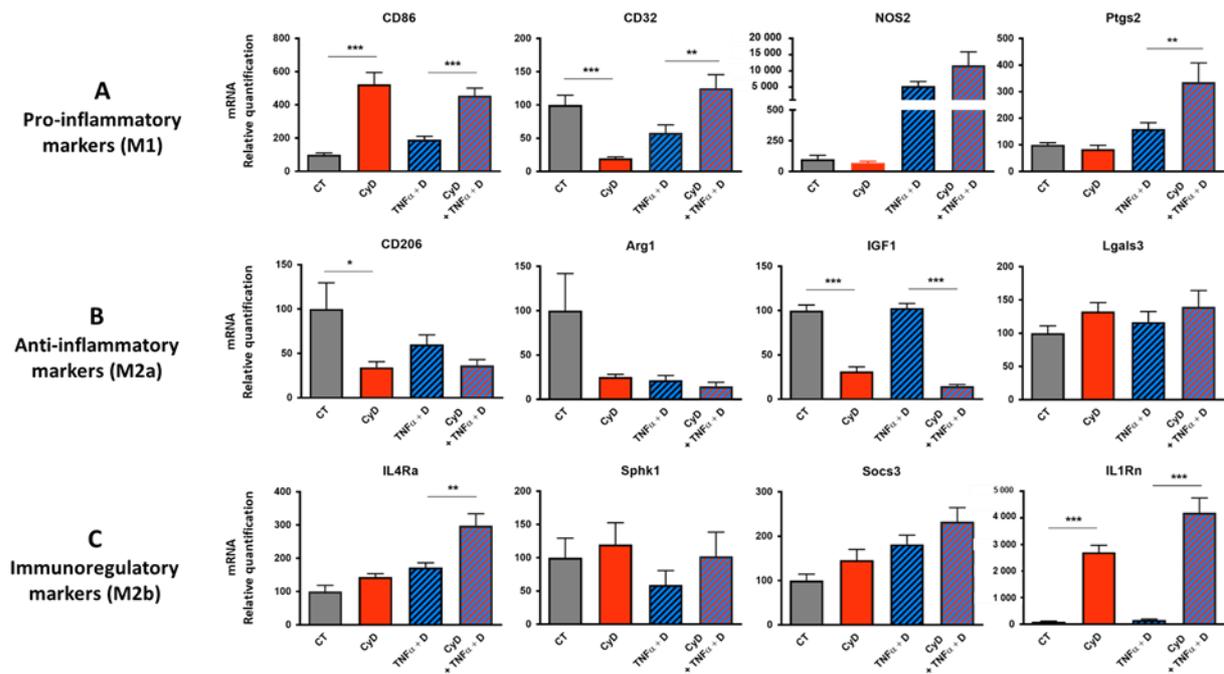
**Figure 11: Phagocytosis of myelin debris by unstimulated, TNF $\alpha$ -stimulated or IL-4 stimulated microglia.**

Representative confocal images showing myelin debris (MBP, green), microglial lysosomes (lysotracker, red) and cytoskeleton (phalloidin, magenta), with nuclei labeled with DAPI (blue). Microglia were incubated for 24 hours with myelin debris (40  $\mu$ g/ml; D) alone or in association with TNF $\alpha$  (50 ng/ml) or IL-4 (20 ng/ml).



**Figure 12: Inhibition of myelin debris phagocytosis by TNF $\alpha$ - or IL-4-stimulated microglia**

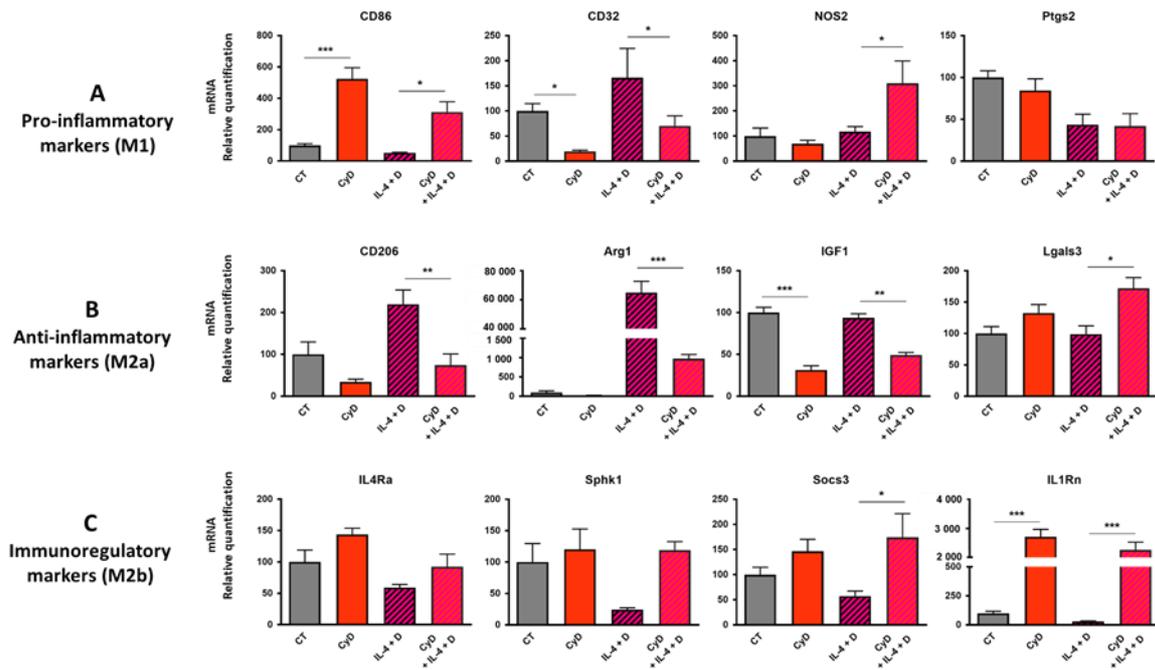
Representative confocal images showing myelin debris (MBP, green), microglial lysosomes (lysotracker, red) and cytoskeleton (phalloidin, magenta), with nuclei labeled with DAPI (blue). Microglia were co-incubated for 24 hours with myelin debris (40  $\mu\text{g/ml}$ ; D) and TNF $\alpha$  (50 ng/ml) or IL-4 (20 ng/ml). Phagocytosis was inhibited by pre-treating cells for 1 hour with cytochalasin D (5  $\mu\text{M}$ ; CyD).



**Figure 13: Effects of phagocytosis inhibition on the myelin debris-induced phenotype changes in TNF $\alpha$ -stimulated microglia**

Microglia were incubated for 24 hours with vehicle (0.05% DMSO; control, CT), cytochalasin D (5  $\mu$ M; CyD), TNF $\alpha$  (50 ng/ml) + myelin debris (40  $\mu$ g/ml; D) or pre-treated with cytochalasin D for 1 hour before incubation with TNF $\alpha$  + myelin debris. Phenotypic markers are grouped as (A) pro-inflammatory M1, (B) anti-inflammatory M2a and (C) immunoregulatory M2b. mRNA shown relative to CT (normalized to 100%).

Data from at least 3 experiments (3-6) are expressed as mean  $\pm$  sem. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test: \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001



**Figure 14: Effects of phagocytosis inhibition on the myelin debris-induced phenotype changes in IL-4-stimulated microglia**

Microglia were incubated for 24 hours with vehicle (0.05% DMSO; control, CT), cytochalasin D (5  $\mu$ M; CyD), IL-4 (20 ng/ml) + myelin debris (40  $\mu$ g/ml; D) or pre-treated with cytochalasin D for 1 hour before incubation with IL-4 + myelin debris. Phenotypic markers are grouped as **(A)** pro-inflammatory M1, **(B)** anti-inflammatory M2a and **(C)** immunoregulatory M2b. mRNA shown relative to CT (normalized to 100%).

Data from at least 3 experiments (3-6) are expressed as mean  $\pm$  sem. One-way ANOVA followed by a Bonferroni test: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

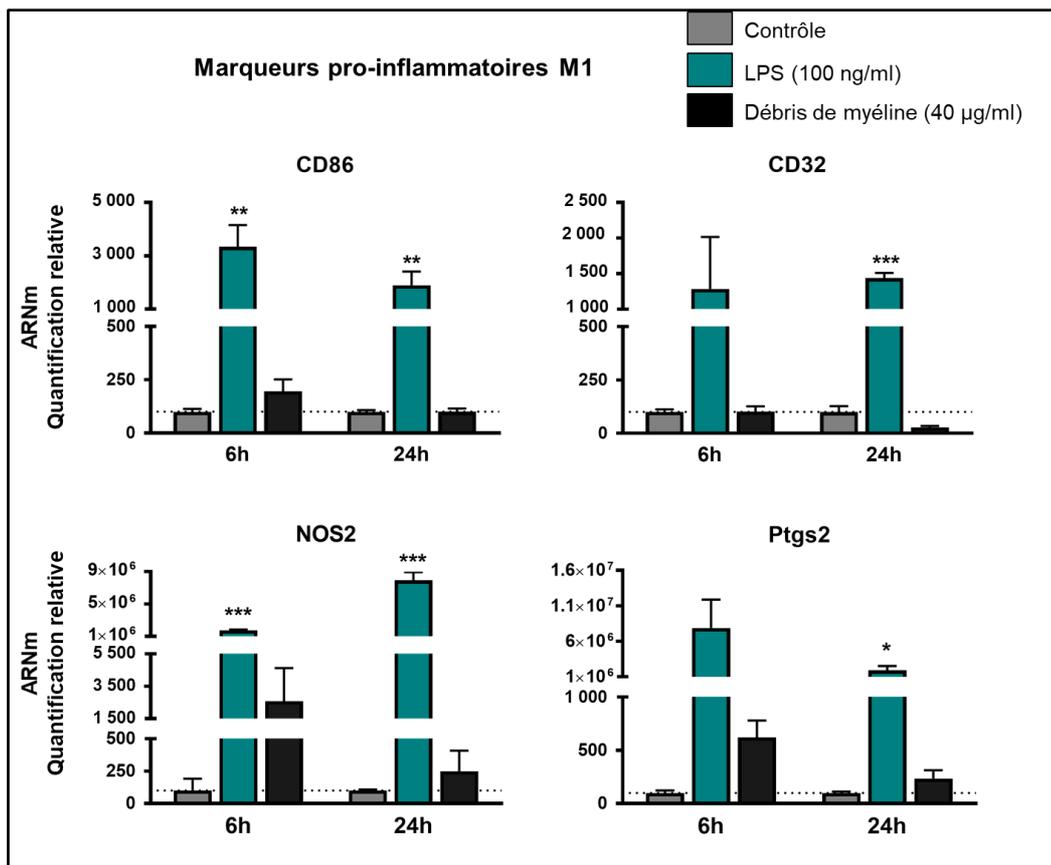
**Table 1: Primer sequences**

<b>Target gene</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
Cluster of differentiation 86 (CD86)	GAG CGG GAT AGT AAC GCT GA	GGC TCT CAC TGC CTT CAC TC
Cluster of differentiation 32 (CD32)	CTG GAA GAA GCT GCC AAA AC	CCA ATG CCA AGG GAG ACT AA
NO synthase 2 (NOS2)	CCC TTC AAT GGT TGG TAC ATG G	ACA TTG ATC TCC GTG ACA GCC
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (P <sub>ts</sub> 2 = cyclooxygenase 2)	TCA TTC ACC AGA CAG ATT GCT	AAG CGT TTG CGG TAC TCA TT
Interleukin 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	GGG CCT CAA AGG AAA GAA TC	TCT TCT TTG GGT ATT GCT TGG
Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ )	GCC TCT TCT CAT TCC TGC TT	AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT
Cluster of differentiation 206 (CD206)	CTT CGG GCC TTT GGA ATA AT	TAG AAG AGC CCT TGG GTT GA
Arginase 1 (Arg1)	GTG AAG AAC CCA CGG TCT GT	GCC AGA GAT GCT TCC AAC TG
Insulin like growth factor 1 (IGF1)	TGG ATG CTC TTC AGT TCG TG	GCA ACA CTC ATC CAC AAT GC
Lectin galactoside-binding soluble 3 (Lgals3)	GAT CAC AAT CAT GGG CAC AG	ATT GAA GCG GGG GTT AAA GT
Interleukin 10 (IL-10)	CTC CCC TGT GAA AAT AAG AGC	GCC TTG TAG ACA CCT TGG TC
Interleukin 4 receptor alpha (IL-4R $\alpha$ )	GGA TAA GCA GAC CCG AAG C	ACT CTG GAG AGA CTT GGT TGG
Sphingosine kinase 1 (Sphk1)	TCC AGA AAC CCC TGT GTA GC	CAG CAG TGT GCA GTT GAT GA
Suppressor of cytokines 3 (Socs3)	CGT TGA CAG TCT TCC GAC AA	TAT TCT GGG GGC GAG AAG
Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Rn)	TTG TGC CAA GTC TGG AGA TG	TTC TCA GAG CGG ATG AAG GT
Ribosomal protein L13 (Rpl13)	ACA GCC ACT CTG GAG GAG AA	GAG TCC GTT GGT CTT GAG GA

### 2.2.2. Autre résultat: Etude des effets de débris de myéline en présence de SVF

Dans la première étude visant à étudier l'effet propre des débris de myéline, les expériences ont été réalisées en présence ou en absence de SVF, mais seuls les résultats obtenus en absence de SVF ont été inclus dans l'article. Le fait de réaliser cette expérience, en présence ou en absence de SVF, a permis de s'assurer que l'absence de facteur sérique dans le milieu de culture n'était pas indispensable à l'action des débris de myéline sur la microglie. En effet, une étude avait décrit que l'activation microgliale par des débris de myéline était dépendante de la voie du complément (Sun *et al.*, 2010). De plus, les études *in vitro*, sur lesquelles nous nous sommes basées, ont mis en évidence un effet pro-inflammatoire des débris de myéline sur des cultures primaires de microglies traitées en présence de SVF (Pinteaux-Jones *et al.*, 2008; Siddiqui *et al.*, 2016).

L'expression génique des marqueurs pro-inflammatoires M1 est fortement augmentée après traitement par le LPS à 100 ng/ml par rapport au contrôle (Tris-HCl à 0,5 mM pH 7,4), que ce soit après 6 ou 24 heures (Figure 35). Par contre, les débris de myéline, n'entraînent aucune modification de l'expression des ARNm.

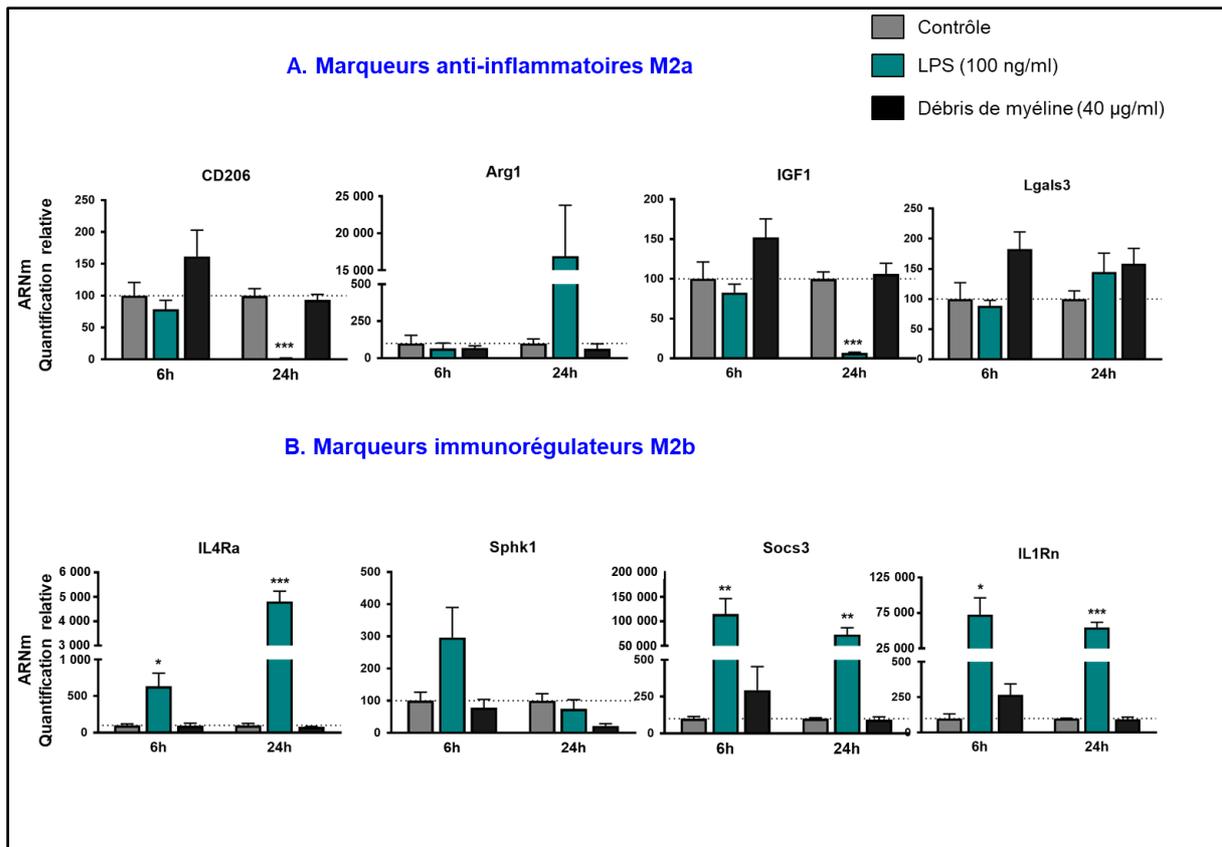


**Figure 35: Caractérisation du phénotype microglial M1 après 6 ou 24 heures de traitement par des débris de myéline en présence de SVF dans le milieu de culture**

Les contrôles sont des microglies traitées par le solvant des débris de myéline (Tris-HCl 0,5 mM pH=7,4). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  esm. Les données, issues de 3 cultures différentes (N=3), ont été analysées par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,001$  versus contrôle.

Abréviations: CD, cluster of differentiation; LPS, lipopolysaccharide; NOS2, NO-synthase de type 2; Ptgs2, COX2 ou cyclo-oxygénase de type 2; Rpl13a, ribosomal protein L 13a

L'expression génique des marqueurs anti-inflammatoires (M2a) et immunorégulateurs (M2b) a également été mesurée en présence de SVF. Une diminution significative de l'expression de certains marqueurs anti-inflammatoires (CD206 et IGF1) est observée après 24 heures de traitement par le LPS (Figure 36A). A l'exception de Sphk1, tous les marqueurs immunorégulateurs sont augmentés après 6 ou 24 heures de traitement par le LPS (Figure 36B). Par contre, aucune modification n'est observée avec les débris de myéline que ce soit après 6 heures ou 24 heures de traitement.



**Figure 36: Caractérisation du phénotype microglial M2 après 6 ou 24 heures de traitement par des débris de myéline en présence de SVF dans le milieu de culture**

Les contrôles sont des microglies traitées par le solvant des débris de myéline (Tris-HCl 0,5 mM pH=7,4). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  esm. Les données, issues de 3 cultures différentes (N=3), ont été analysées par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,001$  versus contrôle.

Abréviations: Arg1, arginase 1; CD, cluster of differentiation; IGF1, insulin growth factor; IL-1Ra, interleukine 1 receptor antagonist; IL-4Ra, interleukine 4 receptor alpha; Lgals3, galectin 3; Rpl13a, ribosomal protein L 13a; Socs3, suppressor of cytokine signaling 3; SphK1, sphingosine kinase 1

Pour conclure, ces résultats montrent une plus grande variabilité des valeurs, au sein de chaque groupe, lorsque les traitements sont réalisés en présence de SVF. Nous avons donc poursuivi nos expériences en l'absence de SVF dans le milieu de culture.

Par ailleurs, les résultats de cette étude confirment ceux obtenus en absence de SVF. Ainsi, contrairement à notre hypothèse de départ, les débris de myéline seuls n'induisent pas d'activation microgliale en phénotype M1.

## 2.3. Etude des conséquences de l'inhibition de la PARP sur l'orientation du phénotype microglial induite par les débris de myéline

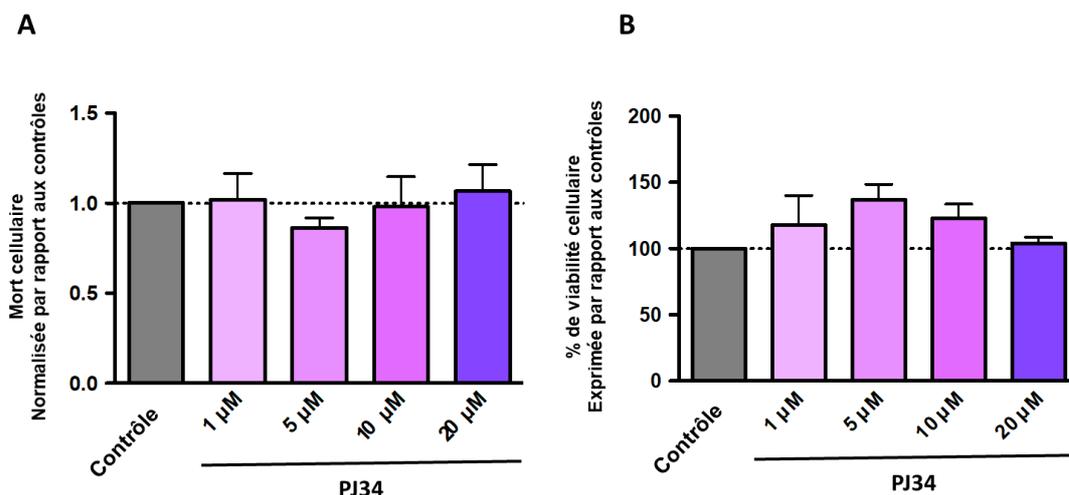
Au vu de nos résultats suggérant un effet plutôt anti-inflammatoire des débris de myéline sur la microglie, nous avons voulu déterminer si l'inhibition pharmacologique de la PARP pouvait potentialiser cet effet, notamment en augmentant l'activation microgliale M2. L'inhibition pharmacologique de la PARP microgliale est réalisée avec le PJ34 à la concentration de 20  $\mu\text{M}$ . Le choix de cette concentration est basé sur l'étude de Stoica et collaborateurs (2014), dans laquelle cette concentration a permis d'inhiber l'activation microgliale.

Avant de commencer notre étude, nous nous sommes assurés de l'absence de toxicité du PJ34 à cette concentration.

### 2.3.1. Etude des effets du PJ34 sur la mort et de la viabilité cellulaire

Les mesures de mort et de viabilité cellulaire ont été réalisées, respectivement, avec les tests de la LDH et du MTT, sur les mêmes cultures cellulaires, après 24 heures de traitement par une gamme de concentrations de PJ34 allant de 1 à 20  $\mu\text{M}$ .

Quelle que soit la concentration, le PJ34 n'induit aucune mort cellulaire par rapport aux cellules contrôles (PBS) et ne modifie pas la viabilité cellulaire (Figure 37).



**Figure 37: Evaluation de la mort (A) et de la viabilité (B) cellulaires après 24 heures de traitement par le PJ34**

Les contrôles sont des microglies traitées par le solvant du LPS (PBS). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  esm. Les données sont issues de 3 cultures différentes ( $N=3$ ).

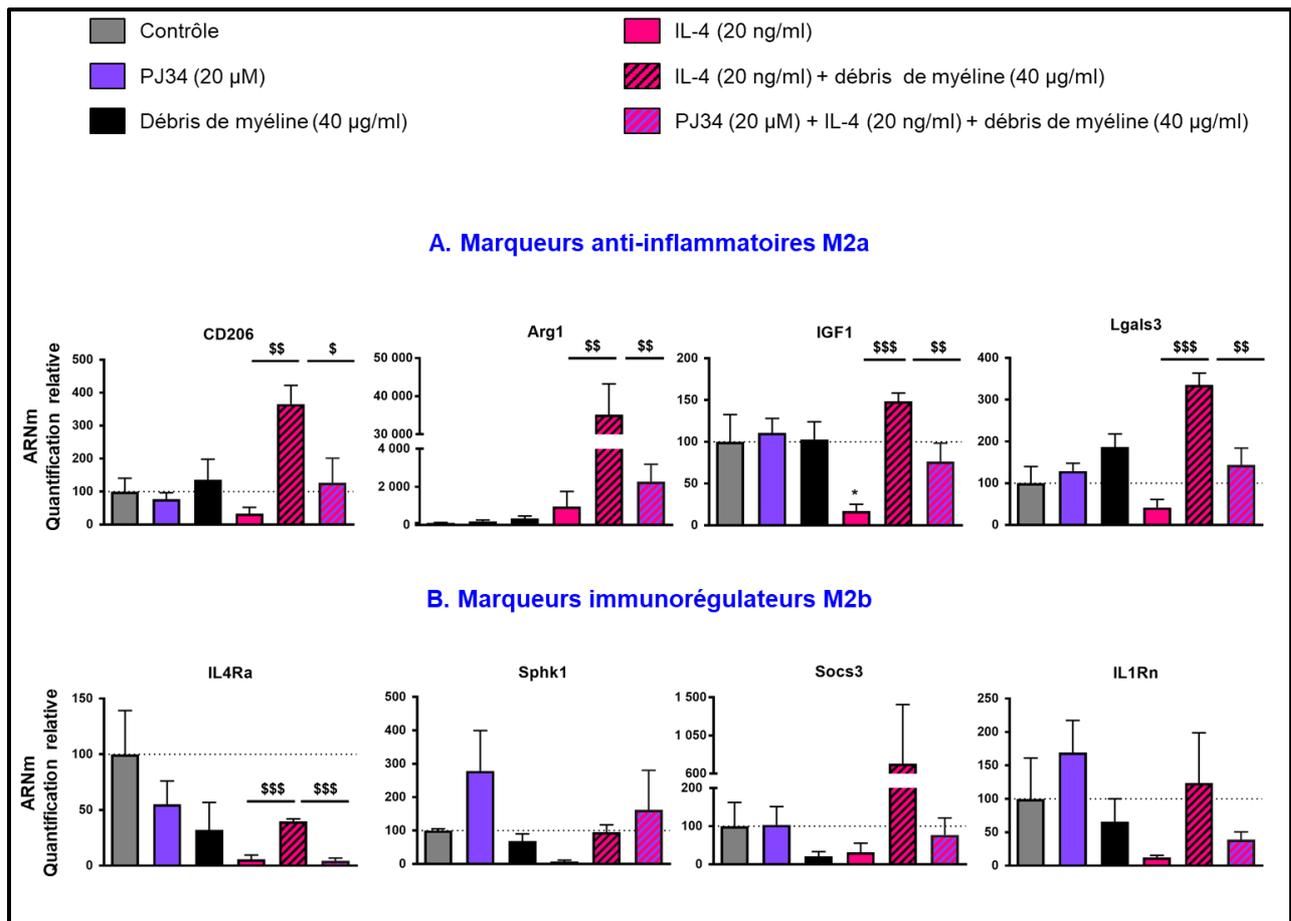
### 2.3.2. Etude des effets de l'inhibition de la PARP sur le phénotype microglial

Parallèlement à l'étude de l'inhibition de la PARP sur l'orientation du phénotype microglial induite par les débris de myéline en présence d'un stimulus pro-inflammatoire (TNF $\alpha$ ), nous avons également étudié les conséquences de cette inhibition en présence d'un stimulus anti-inflammatoire, l'IL-4.

L'IL-4 ne modifie toujours pas l'ARNm des marqueurs du phénotype M2a (Figure 38A). Le co-traitement des débris de myéline avec l'IL-4 induit une augmentation de l'expression de l'ensemble des marqueurs anti-inflammatoires (CD206, Arg1, IGF1 et Lgals3) par rapport aux cellules traitées par l'IL-4 seule. L'inhibition de la PARP par le PJ34 s'oppose à cette augmentation. Ces résultats suggèrent un rôle de la PARP dans la promotion du phénotype M2a induite par les débris de myéline présents dans un environnement anti-inflammatoire.

L'expression des marqueurs immunorégulateurs semble également augmentée en cas de co-traitement des débris de myéline avec l'IL-4 par rapport aux cellules traitées uniquement avec l'IL-4, mais seule l'expression de l'IL4R $\alpha$  est augmentée significativement (Figure 38B). Le PJ34 s'oppose à cette augmentation.

Pour résumer, les résultats de cette deuxième étude montrent que l'inhibition de la PARP ne potentialise pas l'effet anti-inflammatoire observé avec les débris de myéline dans un environnement pro-inflammatoire mimé par le TNF $\alpha$ . Au contraire, la PARP semble intervenir dans la promotion du phénotype anti-inflammatoire induite par les débris de myéline dans un environnement anti-inflammatoire (IL-4). Ainsi, lorsque la PARP n'est pas hyperactivée, cette dernière semble jouer un rôle physiologique plutôt bénéfique en modulant l'expression génique des marqueurs M2a et M2b en présence de débris de myéline.



**Figure 38: Etude des conséquences de l'inhibition de la PARP par le PJ34 sur le phénotype microglial M2 induit par les débris de myéline après 24 heures de traitement**

Les cellules sont traitées par du Tris-HCl (contrôle à 100%), du PJ34, des débris de myéline ou de l'IL-4. Les cellules sont prétraitées pendant 1 heure avec du PJ34 avant l'ajout simultanée de l'IL-4 et des débris de myéline.

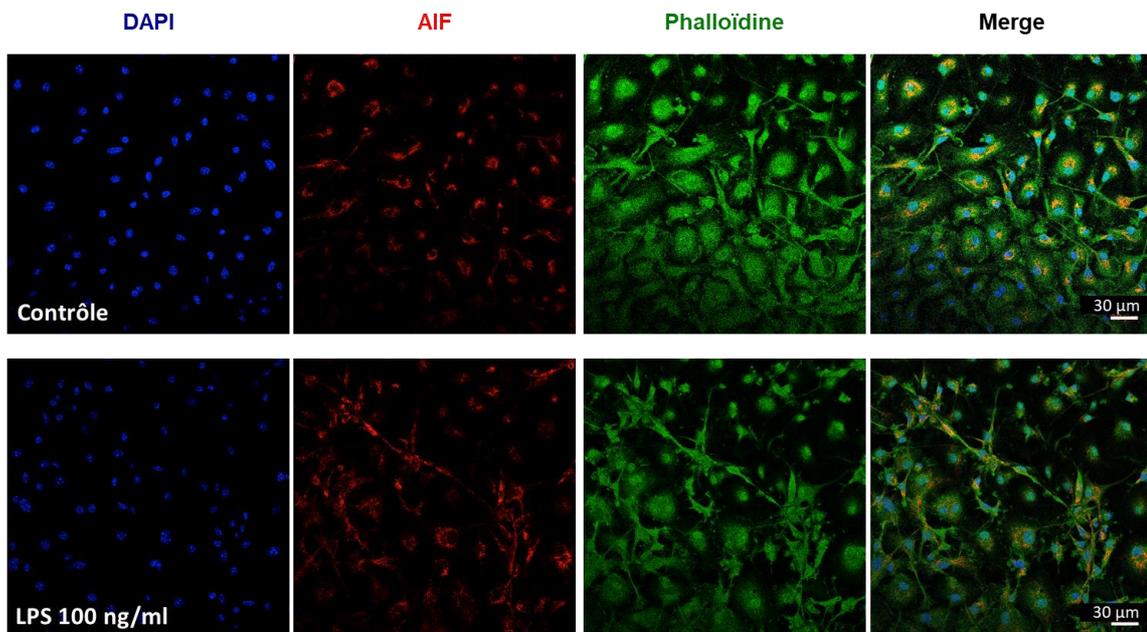
Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  esm. Les données, issues de 5 cultures différentes (N=5), ont été analysées par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett: \* $p < 0,05$  versus contrôle; \$ $p < 0,05$ , \$\$ $p < 0,01$  et \$\$\$ $p < 0,001$  versus IL-4 + débris de myéline.

Abréviations: Arg1, arginase 1; CD, cluster of differentiation; IGF1, insulin growth factor 1; IL1Ra, Interleukine 1 receptor antagonist; IL-4Ra, interleukine 4 receptor; Lgals3, L- galectin 3; Rpl13a, ribosomal protein L 13a; Socs3, suppressor of cytokine signaling 3; SphK1, sphingosine kinase 1

### 2.3.3. Mise en évidence de l'activation de la PARP

En parallèle des expériences précédentes, nous avons commencé à mettre au point des techniques permettant de mettre en évidence l'activation de la PARP. Cette activation peut être visualisée de 2 manières: (1) la mesure directe des PAR, produits par la PARP, et (2) l'étude de la translocation cellulaire d'AIF, de la mitochondrie vers le noyau, induite par les PAR.

Ne disposant pas d'Ac I suffisamment efficaces pour la quantification des PAR par WB, nous avons essayé de visualiser la translocation d'AIF par immunocytochimie. Pour la mise au point de la technique, nous avons réalisé une première expérience sur des cellules traitées par le LPS à 100 ng/ml pendant 24 heures. Après stimulation par la LPS, la localisation d'AIF semble être plus diffuse dans le cytoplasme par rapport aux cellules contrôles (PBS) (Figure 39). Toutefois, il ne semble pas y avoir la présence d'AIF dans les noyaux, témoignant de sa translocation.

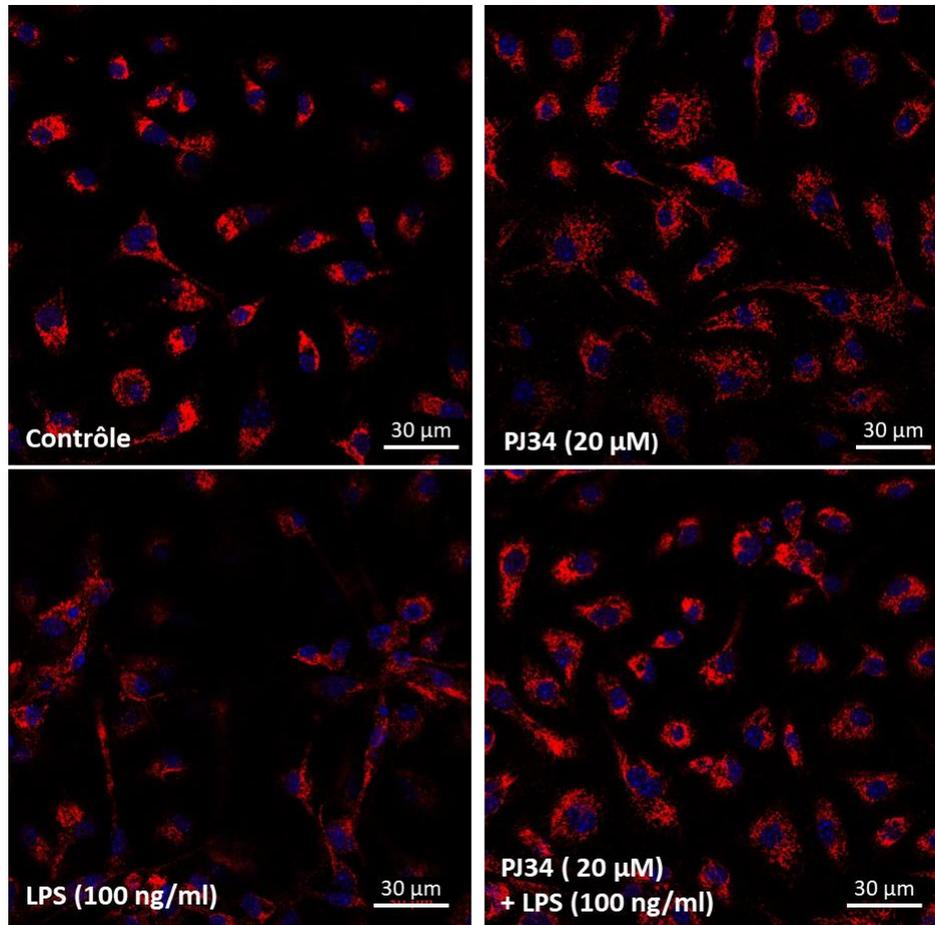


**Figure 39: Photos représentatives de la translocation d'AIF après 24 heures de traitement par le LPS par immunocytochimie DAPI/AIF/phalloïdine**

*Les photos, prises à l'aide d'un microscope confocal (grossissement x40), montrent le marquage des noyaux par le DAPI, d'AIF et du cytosquelette par la phalloïdine, ainsi que le co-marquage (merge); N=1. Les contrôles sont des microglies traitées par le solvant du LPS (PBS).*

*Abréviation: AIF, apoptosis inducing factor*

Afin de confirmer ce résultat, nous avons refait la même expérience en présence de PJ34. Des résultats similaires sont obtenus avec le LPS et l'inhibition de la PARP par le PJ34 ne semble pas induire de modification (Figure 40).



**Figure 40: Photos représentatives de la translocation d'AIF après 24 heures de traitement par le LPS, en présence ou en absence de PJ34, par immunocytochimie DAPI/AIF**

*Les photos, prises à l'aide d'un microscope confocal (grossissement x40), montrent le co-marquage des noyaux par le DAPI (bleu) et d'AIF (rouge); N=1. Les contrôles sont des microglies traitées par le solvant du LPS (PBS).*

*Les cellules sont prétraitées par le PJ34 pendant 1 heure, avant d'ajouter le LPS.*

Malheureusement, cette étude de la translocation d'AIF par immunocytochimie n'a pas permis de mettre en évidence l'activation de la PARP après 24 heures de stimulation par le LPS. Toutefois, les PAR étant très rapidement dégradés par la PARG, elles ont une durée de vie très courte (Sodhi *et al.*, 2010; Ray Chaudhuri et Nussenzweig, 2017). Ainsi, une étude réalisée sur des cultures primaires de microglies et d'astrocytes, stimulées par le

TNF $\alpha$ , montre une accumulation des PAR, mis en évidence par immunocytochimie, à partir de 10 minutes d'incubation jusqu'à 1 heure. De plus, cette accumulation de PAR s'accompagne d'un changement morphologique des microglies, signe de leur activation (Vuong *et al.*, 2015). Pour la suite de ce travail, il sera intéressant d'étudier la translocation d'AIF à des temps plus précoces pour pouvoir mettre en évidence l'activation de la PARP.

## 2.4. Discussion

Le TC représente la première cause de mortalité chez le jeune adulte et l'une des causes majeures de mort et de handicap à tous les âges dans le monde (Maas *et al.*, 2017). Malgré des répercussions économiques et sociales importantes, la prise en charge du TC reste symptomatique et l'équipe médicale ne dispose, à ce jour, d'aucun traitement neuroprotecteur. En effet, toutes les stratégies pharmacologiques qui se sont montrées neuroprotectrices dans les modèles expérimentaux de TC furent un échec en clinique.

L'un des phénomènes physiopathologiques contribuant considérablement aux lésions post-TC est la neuro-inflammation. La microglie, qui constitue la première ligne de défense innée dans le cerveau, joue un rôle particulièrement important dans cette réponse inflammatoire post-TC. Une activation microgliale a lieu précocement, et persiste pendant plusieurs années après le TC (voir le paragraphe « 3.3.1. La microglie » du « Chapitre II: La neuro-inflammation post-traumatique » de la partie « Rappels bibliographiques »). Le caractère prolongé de cette activation laisse place à une large fenêtre d'opportunité thérapeutique en vue d'une intervention pharmacologique. Bien qu'elle soit souvent associée aux lésions post-TC, la microglie est également indispensable à l'élimination des débris cellulaires, ainsi qu'à la réparation et la régénération tissulaires. Ce double rôle de la microglie est actuellement reconnu comme étant associé à l'existence de plusieurs états d'activation microgliale (voir le paragraphe « 5.2. Hétérogénéité de l'activation microgliale dans le SNC » du « Chapitre II: La neuro-inflammation post-traumatique » de la partie « Rappels bibliographiques »). En effet, en fonction de son environnement, une microglie activée peut adopter différents phénotypes classifiés de manière simplifiée en un phénotype cytotoxique M1 et un phénotype protecteur M2. Les données de la littérature et de notre laboratoire montrent la présence des deux phénotypes après un TC. Toutefois, le phénotype pro-inflammatoire M1 semble prédominer et persister plus longtemps que le phénotype M2, pouvant ainsi contribuer à la neurodégénérescence post-TC (voir le paragraphe « 5.3. Polarisation microgliale après un traumatisme crânien » du « Chapitre II: La neuro-inflammation post-traumatique » de la partie « Rappels bibliographiques »). La compréhension des mécanismes endogènes modulant ces phénotypes microgliaux pourrait faciliter le développement de stratégies pharmacologiques en vue de réduire les lésions post-TC, plus particulièrement les lésions de la SB. En effet, longtemps

sous-estimées, ces lésions peuvent persister des années après le TC (Johnson *et al.*, 2013a) et contribuent considérablement aux séquelles cliniques observées chez les patients (voir le paragraphe « 2. Les lésions de la substance blanche après un traumatisme crânien » du

« Chapitre III: Les lésions de la substance blanche et rôle des débris de myéline dans la neuro-inflammation » de la partie « Rappels bibliographiques »). De plus, ces lésions de la SB sont souvent associées à la neuro-inflammation chez les patients traumatisés crâniens, ainsi que dans les modèles expérimentaux de TC (Johnson *et al.*, 2013a; Loane *et al.*, 2014b; Wang *et al.*, 2015a). Par ailleurs, il a été suggéré que les débris de myéline, issus des lésions axonales et de la mort oligodendrocytaire, pourraient à leur tour initier une réponse inflammatoire, notamment en induisant le phénotype cytotoxique M1, créant ainsi un cercle vicieux (Yang *et al.*, 2011). Toutefois, il existe très peu d'études définissant clairement le rôle de ces débris de myéline dans la neuro-inflammation post-TC. En effet, la majorité des données dont l'on dispose actuellement sont issues d'études réalisées dans des modèles expérimentaux de sclérose en plaques ou de lésions de la moelle épinière (voir le paragraphe « 3.2. Effets délétères des débris de myélines » du « Chapitre III: Les lésions de la substance blanche et rôle des débris de myéline dans la neuro-inflammation » de la partie « Rappels bibliographiques »). Bien que suggérant un rôle pro-inflammatoire des débris de myéline, ces études ne permettent pas de conclure quant à leurs effets sur l'activation microgliale. Toutefois, des données suggèrent, au contraire, un effet anti-inflammatoire des débris de myéline sur les microglies et les macrophages, à la fois *in vitro* et dans des modèles expérimentaux de sclérose en plaques (Boven *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Kroner *et al.*, 2014). L'ensemble de ces données montre ainsi la complexité des effets que peuvent induire les débris de myéline.

Dans ce contexte, nous avons souhaité clarifier, grâce à des études *in vitro* réalisées sur des cultures primaires de microglies de souris, les effets des débris de myéline sur l'activation microgliale, et plus précisément, sur les phénotypes microgliaux.

Pour cela, nous avons, tout d'abord, réalisé une préparation enrichie en débris de myéline à partir de cerveaux de souris, en nous basant sur des protocoles de la littérature. Initialement, deux protocoles, assez similaires, décrivaient l'extraction de la myéline selon un gradient de sucrose, afin d'obtenir une préparation « pure » de débris de myéline à partir de cerveaux de rats (Norton et Poduslo, 1973) ou de souris adultes (Sheads *et al.*, 1977). Ce principe d'extraction a été utilisé par de nombreuses équipes, afin d'étudier le rôle des débris de myéline dans des pathologies associées à une démyélinisation (Boven *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2010; Clarner *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015b; Siddiqui *et al.*, 2016). Nous avons utilisé le protocole de Pinteaux-Jones et collaborateurs (2008), adapté de

celui de Norton et Poduslo (1973), permettant d'obtenir un extrait « pur » de débris de myéline à partir de cerveaux de rats adultes, mais en partant de cerveaux de souris adultes.

Dans une première étude, nous avons évalué l'effet propre de cette préparation de débris de myéline sur le phénotype microglial, dans un environnement non inflammatoire, c'est-à-dire dans des conditions « physiologiques ». Cette étude a été réalisée en mesurant, (1) l'ARNm de marqueurs spécifiques de chaque phénotype (M1, M2a et M2b) après 6 et 24 heures de traitement, et à 24 heures (2) l'expression protéique de la NOS2 et de l'arginase 1, ainsi que (3) la production de NO par les microglies dans les milieux de culture. De manière intéressante, nous n'avons constaté aucun effet propre des débris de myéline sur la microglie, que ce soit après 6 ou 24 heures d'incubation, contrairement à l'étude de Pinteaux-Jones et collaborateurs (2008) sur laquelle nous nous étions basée. En effet, ces auteurs ont décrit une activation microgliale pro-inflammatoire, mise en évidence par une augmentation de l'expression protéique de CD68 et de la NOS2, ainsi que la libération de  $TNF\alpha$ , de glutamate et de NO dans le milieu de culture après 24 heures d'incubation. Cette divergence de résultats pourrait, notamment, être liée aux différentes espèces animales (souris *versus* rat) utilisées à la fois pour la préparation des cultures primaires de microglies et des débris de myéline. En effet, bien que la souris et le rat semblent répondre de façon similaire à de nombreux stimuli, de plus en plus d'études montrent également des différences de réactivité (Lively et Schlichter, 2018; Lively *et al.*, 2018). Ainsi, à titre d'exemple, une différence de réactivité entre les cultures primaires de microglies de souris et de rat a été observée vis-à-vis du LPS (principal stimulus pro-inflammatoire utilisé dans les études expérimentales *in vivo* et *in vitro*). Cette différence souris/rat pourrait notamment être liée à l'expression de récepteurs membranaires différents et/ou en proportions différentes. Par ailleurs, à notre connaissance, il s'agit de la seule étude ayant rapportée un effet pro-inflammatoire des débris de myéline seuls sur la microglie *in vitro*.

Nos résultats montrent donc une absence d'effet propre des débris de myéline, en conditions « physiologiques », mais ne permettent pas de conclure en ce qui concerne leurs effets sur la microglie dans des conditions inflammatoires, comme à la suite d'un TC. En effet, comme nous l'avons souligné précédemment, l'environnement inflammatoire post-TC pourrait conditionner l'action des débris de myéline sur la microglie. Ainsi, les lésions de la SB sont souvent observées parallèlement à la neuro-inflammation chez l'Homme (Johnson *et al.*, 2013a) et dans les modèles expérimentaux de TC (Flygt *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Loane *et al.*, 2014b; Taib *et al.*, 2017). Au laboratoire, dans un modèle de TC par ICC chez la souris, il a été mis en évidence une activation microgliale mixte M1/M2 entre 6 heures et 3 jours, ainsi qu'une démyélinisation dès 6 heures qui dure jusqu'au moins 3 mois (Taib *et al.*, 2017).

Afin de tenir compte de l'environnement inflammatoire post-TC, nous avons ensuite étudié l'effet des débris de myéline en présence simultanée de molécules pro-inflammatoires.

Une première étude a consisté à co-traiter, pendant 24 heures, les microglies avec les débris de myéline et du LPS (10 ng/ml), une endotoxine bactérienne classiquement utilisée pour induire une activation microgliale M1 (Orihuela *et al.*, 2016; Loane et Kumar, 2016), puis à mesurer l'expression d'une protéine pro-inflammatoire, la NOS2, ainsi que la production de NO associée. Nous avons montré que les débris de myéline s'opposent à l'augmentation de l'expression et de la production de ces molécules pro-inflammatoires induite par le LPS, et donc à l'activation microgliale M1 induite par le LPS. Ce résultat est en accord avec une étude réalisée sur des cultures primaires de macrophages et de microglies de souris (Kroner *et al.*, 2014), dans laquelle les cellules ont été préalablement stimulées pendant 24 heures avec du LPS (100 ng/ml) avant d'être lavées, puis incubées avec des débris de myéline (50 µg/ml) pendant 16 heures. Ainsi, contrairement à nous, cette étude n'évalue pas les conséquences d'une exposition simultanée de la microglie à des débris de myéline et de stimuli pro-inflammatoires, mais les effets des débris de myéline sur une microglie déjà activée en phénotype M1. De plus, Boven et collaborateurs (2006) ont montré que des macrophages humains, préalablement incubés pendant 24 heures avec des débris de myéline, sont incapables d'adopter un phénotype pro-inflammatoire M1 quand ils sont ensuite mis en présence de LPS. L'ensemble de ces résultats suggère donc que les débris de myéline, générés par les lésions de la SB, pourraient exercer des effets anti-inflammatoires quel que soit le moment de leur apparition, en amont, simultanément ou en aval de l'activation microgliale.

La neuro-inflammation post-traumatique étant stérile, c'est-à-dire n'impliquant pas d'agent infectieux pathogène, il nous est apparu plus approprié, pour la suite de ce travail, d'utiliser à la place du LPS, le  $TNF\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire dont le rôle est largement décrit dans le TC (voir le paragraphe « 4.1. Les cytokines pro-inflammatoires » du « Chapitre II: La neuro-inflammation post-traumatique » de la partie « Rappels bibliographiques »). Une étude réalisée au laboratoire a d'ailleurs montré une augmentation de l'ARNm de cette cytokine par les microglies/macrophages dès le premier jour après le TC et ceci jusqu'à 3 jours (Taib *et al.*, 2017). Nous avons ainsi évalué l'expression génique de marqueurs spécifiques de chaque phénotype microglial au bout de 24 heures d'incubation. Comme avec le LPS, les débris de myéline se sont opposés à l'induction du phénotype M1 induit par le  $TNF\alpha$ , mais, de manière intéressante, ils ont également favorisé le phénotype M2. Ces données suggèrent donc, que dans un environnement pro-inflammatoire, les débris de myéline exerceraient un effet anti-inflammatoire. Des résultats similaires ont été observés sur des cultures primaires de microglies de souris pré-stimulées pendant 24 heures par de

l'IFN $\gamma$ , puis incubées simultanément avec les débris de myéline pendant 1, 3, 6, 24 ou 48 heures (Liu *et al.*, 2006). Cette étude décrit une action temporelle biphasique des débris de myéline avec une augmentation de l'ARNm de médiateurs pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) durant les 6 premières heures, suivie de leur diminution entre 6 et 24 heures. Ces résultats renforcent donc l'idée que les débris de myéline peuvent exercer des effets opposés.

Etant donné la présence d'une population microgliale mixte M1/M2 à la suite d'un TC (Wang *et al.*, 2013, 2015; Loane *et al.*, 2014a et b; Kumar *et al.*, 2016a; Taib *et al.*, 2017), nous avons aussi évalué l'effet des débris de myéline en présence d'IL-4, une cytokine anti-inflammatoire (Gadani *et al.*, 2012), qui est également augmentée après un TC (Dalgard *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2014; Ansari, 2015; Clausen *et al.*, 2018). Les microglies ont été co-traitées pendant 24 heures par des débris de myéline et de l'IL-4, puis l'ARNm des marqueurs de chaque phénotype a été quantifié. Bien que l'IL-4 ait été utilisée à une concentration décrite comme induisant un phénotype anti-inflammatoire M2 (Chhor *et al.*, 2013; Siddiqui *et al.*, 2016), elle n'a pas permis d'augmenter de manière significative l'ARNm de marqueurs M2 dans nos conditions expérimentales. Néanmoins, sa co-incubation avec les débris de myéline a permis d'augmenter l'expression du facteur de croissance cytoprotecteur IGF1, ainsi que celle de Lgals3, un modulateur de prolifération, de maturation des oligodendrocytes et de remyélinisation (Chhor *et al.*, 2013). En présence d'IL-4, les débris de myéline semblent donc favoriser l'expression de molécules anti-inflammatoires par la microglie. Il existe dans la littérature des données expérimentales décrivant, au contraire, un effet pro-inflammatoire des débris de myéline. En effet, une étude réalisée sur des cultures primaires de microglies de rat montre que les débris de myéline augmentent l'expression génique de marqueurs pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  et IL-6) par les microglies polarisées en phénotype M1 et diminuent celle de marqueurs anti-inflammatoires (MRC1, CD163 et c-myc) par les microglies polarisées en phénotype M2 (Siddiqui *et al.*, 2016). A la différence de notre étude, les cellules sont d'abord orientées en phénotype M1 ou M2, par une pré-incubation pendant 24 heures avec, respectivement, l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$ , ou l'IL-4, avant d'être exposées pendant 6 heures aux débris de myéline. Dans une autre étude, l'incubation de macrophages de souris, préalablement orientés en phénotype M2 par le M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), avec des débris de myéline diminue l'expression de marqueurs M2 (YM1, FZZ1 et Arg-1) et augmente l'expression de marqueurs M1 (IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF $\alpha$ ...; Wang *et al.*, 2015b). Ainsi, quand des microglies orientées en phénotype M2, de manière fonctionnelle ou non par l'IL-4, sont en présence de débris de myéline, ces derniers permettent de promouvoir ce phénotype M2.

L'ensemble de nos résultats suggère que, contrairement à l'hypothèse du cercle vicieux émise par Yang et collaborateurs (2011), les débris de myéline, générés à la suite d'un TC, pourraient constituer des composants endogènes capables de promouvoir la régénération tissulaire, en diminuant le phénotype cytotoxique M1 et en favorisant le phénotype protecteur M2. Cependant, l'activation microgliale en phénotype M2 n'est que transitoire à la suite d'un TC, alors que le phénotype M1 peut persister beaucoup plus longtemps (Wang *et al.*, 2013; Loan *et al.*, 2014b). Ainsi, l'importance des séquelles cliniques cognitives et psychiques du TC témoigne de l'inefficacité de ces systèmes de réparation endogènes à assurer une récupération complète. Il serait donc intéressant de développer des stratégies pharmacologiques pouvant prolonger l'activation microgliale M2 et/ou diminuer le phénotype M1 chez les patients victimes d'un TC.

Dans ce contexte, nous avons ensuite évalué si une stratégie pharmacologique anti-inflammatoire, basée plus particulièrement sur l'inhibition de la PARP, pouvait potentialiser l'effet protecteur des débris de myéline, notamment en favorisant le phénotype microglial M2. En effet, des données de la littérature et celles de notre laboratoire ont démontré un effet protecteur de l'inhibition pharmacologique ou génique de la PARP dans des modèles expérimentaux de TC (LaPlaca *et al.*, 2001; Besson *et al.*, 2003a, 2005b; Satchell *et al.*, 2003; Stoica *et al.*, 2014). De plus, l'inhibition de la neuro-inflammation, plus particulièrement de l'activation microgliale, semble contribuer en grande partie à cet effet neuroprotecteur (Besson, 2009; Berger *et al.*, 2018). Par ailleurs, il a été montré que l'inhibition de la PARP microgliale diminue la production des cytokines pro-inflammatoires en réponse au peptide A $\beta$ , et augmente celle de facteurs trophiques, suggérant que la PARP joue un rôle dans l'orientation phénotypique de la microglie (Kauppinen *et al.*, 2011).

Pour réaliser cette étude, nous avons prétraité pendant 1 heure des microglies avec un puissant inhibiteur de PARP, le PJ34, avant de co-incuber les microglies avec des débris de myéline et du TNF $\alpha$  ou de l'IL-4 pendant 24 heures. Le prétraitement par le PJ34 n'a pas permis de potentialiser le phénotype M2, ni de diminuer le phénotype M1 en présence de débris de myéline et de TNF $\alpha$ . Bien qu'une réduction de la production des molécules pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et NO) et de l'expression de la protéine NOS2 soit décrite avec des inhibiteurs de la PARP (PJ34, Veliparib) sur des cultures primaires de microglies stimulées par le LPS (Stoica *et al.*, 2014) ou l'alarmine S100 (Xu *et al.*, 2016), notre étude *in vitro* est la première à s'être intéressée à l'effet de l'inhibition de la PARP sur les phénotypes microgliaux en présence de débris de myéline. Par ailleurs, il est intéressant de noter que nos résultats *in vitro* sont en accord avec ceux précédemment obtenus au laboratoire, par le Dr Toufik Taib, dans un modèle de TC par ICC chez la souris. En effet, l'administration de PJ34 chez les souris traumatisées n'a entraîné aucune modification des phénotypes

microgliaux/macrophagiques M1 et M2 observés 3 et 7 jours après l'impact. Bien que le rôle de la PARP ait été largement étudié dans d'autres aspects de la neuro-inflammation, à notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée au rôle de la PARP dans la modulation des phénotypes microgliaux après un TC. Néanmoins, la minocycline, connue pour ses propriétés inhibitrices de la PARP, diminue le phénotype M1 dans des modèles expérimentaux de sclérose latérale amyotrophique (Kobayashi *et al.*, 2013) et de lésion de la moelle épinière (Papa *et al.*, 2016). Dans un modèle expérimental d'ischémie cérébrale, le traitement par la minocycline diminue l'expression microgliale/macrophagique de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) et augmente celle du TGF- $\beta$ , de l'IL-10 et de YM1 (Yang *et al.*, 2015). D'après cette étude, la minocycline semble donc favoriser le phénotype protecteur M2.

Notre modèle de TC étant caractérisé par une démyélinisation, ainsi que de nombreuses anomalies ultra-structurelles de la myéline telles que la fragmentation et la décompaction (Taib *et al.*, 2017), l'ensemble de nos résultats, *in vitro* et *in vivo*, suggèrent donc que l'inhibition de la PARP est incapable de moduler le phénotype microglial en présence de débris de myéline. Toutefois, nos expériences réalisées en présence d'IL-4 ont montré que l'inhibition de la PARP s'oppose à l'augmentation des marqueurs anti-inflammatoires induite par les débris de myéline. Ainsi, dans un environnement favorable, lorsque la PARP n'est pas hyperactivée, cette dernière semble donc, au contraire, jouer un rôle bénéfique dans la promotion du phénotype anti-inflammatoire M2 induit par les débris de myéline. Dans le contexte du TC, l'ensemble de ces résultats laisse donc penser que l'effet protecteur de l'inhibition de la PARP ne semble pas être lié à une modulation des phénotypes microgliaux en présence de débris de myéline.

Comme précédemment souligné, la fonction initiale de la microglie est d'éliminer par phagocytose les débris générés suite aux atteintes tissulaires, afin de restaurer l'homéostasie dans le SNC. L'intérêt de la phagocytose, qui implique des étapes d'internalisation et de digestion, ne se limite pas à une simple clairance des débris cellulaires. En effet, il s'agit d'un processus complexe avec des répercussions importantes sur la neuro-inflammation et la régénération au niveau du SNC (Neumann *et al.*, 2009). Dans ce contexte, nous avons évalué si les effets anti-inflammatoires des débris de myéline, observés dans nos études *in vitro*, pouvaient être liés à leur phagocytose. Après 24 heures d'incubation, nous avons ainsi observé par immunocytochimie une co-localisation intracellulaire des débris de myéline avec les lysosomes, témoignant de l'internalisation des débris de myéline dans la microglie et donc de leur phagocytose, et ce, quel que soit l'environnement, *i.e* « physiologique », pro- ou anti-inflammatoire. De plus, les microglies avaient l'aspect typique de macrophages spumeux (Boven *et al.*, 2006). L'étude *in vitro* de

Liu et collaborateurs (2006) montre également la phagocytose d'une préparation de myéline, couplée à un fluorochrome (cyanine 3), par des cultures primaires de microglies, dès 1 heure jusqu'à 24 heures d'incubation.

Bien que la phagocytose des débris de myéline ait été largement décrite dans des modèles expérimentaux de pathologies démyélinisantes, telles que la sclérose en plaques (Li *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2017), à notre connaissance, une seule étude décrit des microglies contenant de la myéline entre 7 et 28 jours après un TC par percussion de fluide réalisé chez le rat (Kelley *et al.*, 2007).

Plusieurs études ont montré que la phagocytose s'accompagne d'une modification de l'état d'activation microgliale en stimulant la production de cytokines pro- ou anti-inflammatoires (Neumann *et al.*, 2009; Sierra *et al.*, 2013). On peut alors distinguer deux types de phagocytose: avec ou sans réponse pro-inflammatoire associée (Neumann *et al.*, 2009). A titre d'exemple, la phagocytose des pathogènes, qui implique des récepteurs de type PRR, tels que les récepteurs TLR, stimule la production de cytokines pro-inflammatoires. A l'inverse, la phagocytose des corps apoptotiques, impliquant notamment des récepteurs de phosphatidylsérine (PR), entraîne plutôt la production de cytokines anti-inflammatoires (Neumann *et al.*, 2009; Sierra *et al.*, 2013). Dans une autre étude, il a été montré *in vitro* que la phagocytose des corps apoptotiques, impliquant le récepteur TREM2, est associée à une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (Takahashi *et al.*, 2005). Selon les récepteurs impliqués, les conséquences de cette phagocytose sur l'inflammation peuvent donc être complètement différentes, ce qui pourrait expliquer les résultats contradictoires observés concernant la phagocytose des débris de myéline.

L'étude clinique *post-mortem* réalisée par Boven et collaborateurs (2006), chez des patients atteints de sclérose en plaques, a montré la présence de macrophages spumeux, dits « foamy macrophages ». Ces derniers sont caractérisés par leur contenu en lipides neutres de la myéline et la surexpression de molécules HLA-DR. Ils expriment un large panel de marqueurs caractéristiques du phénotype M2 anti-inflammatoire et, à l'inverse, moins de marqueurs caractéristiques du phénotype M1 pro-inflammatoire. Dans des modèles expérimentaux de démyélinisation, il a été démontré que des molécules, capables d'augmenter la phagocytose de la myéline *in vitro*, exercent des effets anti-inflammatoires *in vivo* en favorisant le phénotype M2. A titre d'exemple, la galectine 1, une molécule décrite pour ses propriétés bénéfiques sur la remyélinisation et la régénération axonale, favorise *in vitro* la phagocytose de la myéline et la polarisation microgliale en phénotype M2 (Rinaldi *et al.*, 2016). Dans un modèle expérimental de sclérose en plaques, il a été récemment montré que la remyélinisation est associée à une augmentation de l'élimination des débris de myéline et du nombre de microglies avec une morphologie « phagocyte-like » (Zhu *et al.*,

2017). De plus, la caractérisation du phénotype microglial montre une augmentation du nombre de microglies de phénotype M2.

Bien que le lien ne soit pas établi de manière directe, les études citées précédemment associent les effets pro-inflammatoires (Wang *et al.*, 2015b; Siddiqui *et al.*, 2016) ou anti-inflammatoires (Liu *et al.*, 2006; Boven *et al.*, 2006; Kroner *et al.*, 2014) des débris de myéline à leur phagocytose par les microglies/macrophages. Cependant, il est important de noter que la phagocytose des débris de myéline ne semble pas forcément associée à un effet pro- ou anti-inflammatoire, comme le montre le résultat de notre étude sur l'effet propre des débris de myéline. Par ailleurs, la différence d'effets des débris, que nous avons observée lors d'une stimulation avec du LPS ou du  $TNF\alpha$ , suggère que la phagocytose de ces débris impliquerait différentes voies, d'autant plus que ces deux stimuli agissent sur des récepteurs différents.

Nous avons ensuite étudié le rôle de cette phagocytose dans la modulation phénotypique en conditions pro- ou anti-inflammatoires. Après 1 heure de prétraitement des microglies avec la cytochalasine D, un inhibiteur de la phagocytose (Mimura et Asano, 1976; Liu *et al.*, 2006), celles-ci ont été co-incubées pendant 24 heures avec les débris de myéline en présence de  $TNF\alpha$  ou d'IL-4. Nos résultats montrent que la cytochalasine D s'oppose à la phagocytose des débris de myéline, visualisée par immunocytochimie, et réduit une partie des effets bénéfiques des débris de myéline, à savoir la diminution de l'ARNm du marqueur pro-inflammatoire *Ptgs2* en présence de  $TNF\alpha$  et l'augmentation du marqueur anti-inflammatoire *Lgasl3* en présence d'IL-4. De plus, elle augmente l'expression de marqueurs M1 et M2b, et diminue également celle de marqueurs M2a, qui n'étaient initialement pas modifiés par les débris de myéline en présence de  $TNF\alpha$  ou d'IL-4. Ces résultats suggèrent donc que la modulation des phénotypes microgliaux par les débris de myéline, dans des conditions pro- ou anti-inflammatoire, est, au moins en partie, liée à leur phagocytose par la microglie. Ces résultats sont donc en accord avec l'hypothèse de Boven et collaborateurs (2006) concernant un phénotype anti-inflammatoire des macrophages ingérant de la myéline. De manière similaire, l'étude de Liu et collaborateurs (2006), montre que l'inhibition de la phagocytose par la cytochalasine D réduit l'expression de  $TNF\alpha$  induite par les débris de myéline, sur des microglies préalablement stimulées avec de l' $IFN\gamma$ .

La cytochalasine D inhibe la phagocytose en empêchant la polymérisation des filaments d'actine (Mortensen et Larsson, 2003). Or, les phagocytes, tels la microglie, internalisent une grande variété de molécules extracellulaires par l'intermédiaire de différents mécanismes d'endocytose, qui sont plus ou moins dépendants de l'actine (Solé-Domènech *et al.*, 2016). Par conséquent, bien que la cytochalasine D n'ait pas totalement supprimé les effets anti-

inflammatoires des débris de myéline, cela n'exclut pas que les débris aient été partiellement internalisés par un (ou plusieurs) mécanisme(s) plus ou moins dépendant(s) de la polymérisation de l'actine. De manière similaire, la cytochalasine D a partiellement inhibé la phagocytose du peptide A $\beta$  dans des cultures de microglies et d'astrocytes (Jones *et al.*, 2013).

Par ailleurs, nous avons également constaté que la cytochalasine D, seule, avait modifié l'expression de certains gènes (une augmentation de CD206 et d'IL1Rn, et une diminution de CD32, CD206 et d'IGF1). Cet effet pourrait résulter de la perturbation de certaines voies de signalisation cellulaire, notamment celle impliquant la protéine GTP(Guanosine Triphosphate)ase RhoA(Ras homolog gene family, member A), qui agit sur les filaments d'actine (Muehlich *et al.*, 2017; Scheiblich et Gerd Bicker, 2017). En effet, il a été décrit que l'inhibition de la protéine ROCK (Rho-associated protein kinase), la principale cible de RhoA, diminue l'expression de la protéine NOS2 et augmente celle de l'arginase 1 par des microglies stimulées par de l'IFN $\gamma$  (Chen *et al.*, 2014a).

Enfin, d'autres mécanismes que l'endocytose ne sont pas à exclure. En effet, les lipides contenus dans les débris de myéline pourraient également moduler la polarisation microgliale. Ainsi, une étude a montré que des acides gras poly-insaturés pouvaient orienter des microglies stimulées par du LPS ou de l'IFN $\gamma$  vers un phénotype M2 (Chen *et al.*, 2014b). Bien que le mécanisme impliqué ne soit pas clairement établi, l'effet bénéfique des acides gras  $\omega$ -3 poly-insaturés est aujourd'hui bien démontré sur les conséquences lésionnelles et comportementales dans des modèles expérimentaux de TC (Lucke-Wold *et al.*, 2018).

L'ensemble de nos données expérimentales confirme l'hypothèse de l'association de la phagocytose des débris de myéline, du moins en partie, à un phénotype microglial anti-inflammatoire M2. Dans la suite de ce travail, il faudra rechercher quel(s) autre(s) mécanisme(s) cellulaire(s) pourrai(en)t expliquer cet effet. En effet, l'implication de certains récepteurs microgliaux, notamment les récepteurs LRP1 (Low density lipoprotein receptor-Related Protein 1) et TREM2 n'est pas à exclure.

LRP1 est un récepteur essentiel à la phagocytose de la myéline par la microglie (Gaultier *et al.*, 2009). Dans un modèle expérimental de sclérose en plaques chez la souris, la délétion de ce dernier, spécifiquement dans la microglie, aggrave la démyélinisation (Chuang *et al.*, 2016). De plus, les microglies LRP1<sup>-/-</sup> présentent un profil pro-inflammatoire. De manière similaire, les macrophages LRP1<sup>-/-</sup> présentent une augmentation de l'expression de molécules caractéristiques du phénotype M2 (Arg1, Socs3 et IL1Ra) et une diminution de l'expression de marqueurs du phénotype M1 (IL-6 et MCP-1; May *et al.*, 2013). Ces données

suggèrent que l'activation de ce récepteur pourrait induire le phénotype M2, grâce à la phagocytose des débris de myéline.

Concernant le récepteur TREM2, il est aujourd'hui décrit comme participant à l'activation microgliale et à la phagocytose (Konishi et Kiyama, 2018). Ainsi, l'injection de précurseurs myéloïdes surexprimant le récepteur TREM2 favorise l'élimination des débris de myéline, grâce à l'augmentation de la phagocytose, dans un modèle expérimental de sclérose en plaques chez la souris (Takahashi *et al.*, 2007). De plus, la surexpression de ce récepteur est associée à une augmentation de cytokines anti-inflammatoires et à une diminution de molécules pro-inflammatoires (Takahashi *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2018). De même, les souris TREM2<sup>-/-</sup> présentent un défaut d'élimination des débris de myéline et une aggravation de la démyélinisation induite par la cuprizone (Poliani *et al.*, 2015), ainsi qu'une diminution de l'activation microgliale/macrophagique, de l'atrophie cérébrale et des déficits cognitifs à la suite d'un TC (Saber *et al.*, 2017). L'ensemble de ces données suggère donc le rôle potentiel de TREM2 dans la phagocytose et l'induction d'effets anti-inflammatoires.

### **3. Mise en évidence *in vivo* des débris de myéline et caractérisation des phénotypes microgliaux après un traumatisme crânien chez la souris**

Dans un modèle de TC par ICC réalisé chez la souris, notre laboratoire a précédemment montré une démyélinisation, mise en évidence par une diminution de l'expression protéique de la MBP dans le corps calleux, apparaissant dès 3 jours après le TC et persistant jusqu'à 3 mois, ainsi que diverses anomalies structurelles de la myéline visualisées par microscopie électronique (Taib *et al.*, 2017). De plus, dans ce modèle, il a également été montré la présence d'une population mixte de microglies/macrophages M1 et M2, dès 6 heures après le TC et ce, jusqu'à 3 jours. Cette caractérisation phénotypique a été réalisée en mesurant l'expression génique de marqueurs spécifiques, dans des échantillons de microglies/macrophages isolés à l'aide d'un tri cellulaire magnétique.

La dernière partie de ma thèse a été de visualiser *in situ* sur des coupes de cerveaux de souris TC la distribution de ces phénotypes en fonction de la présence de débris de myéline, ainsi que la phagocytose éventuelle de ces derniers.

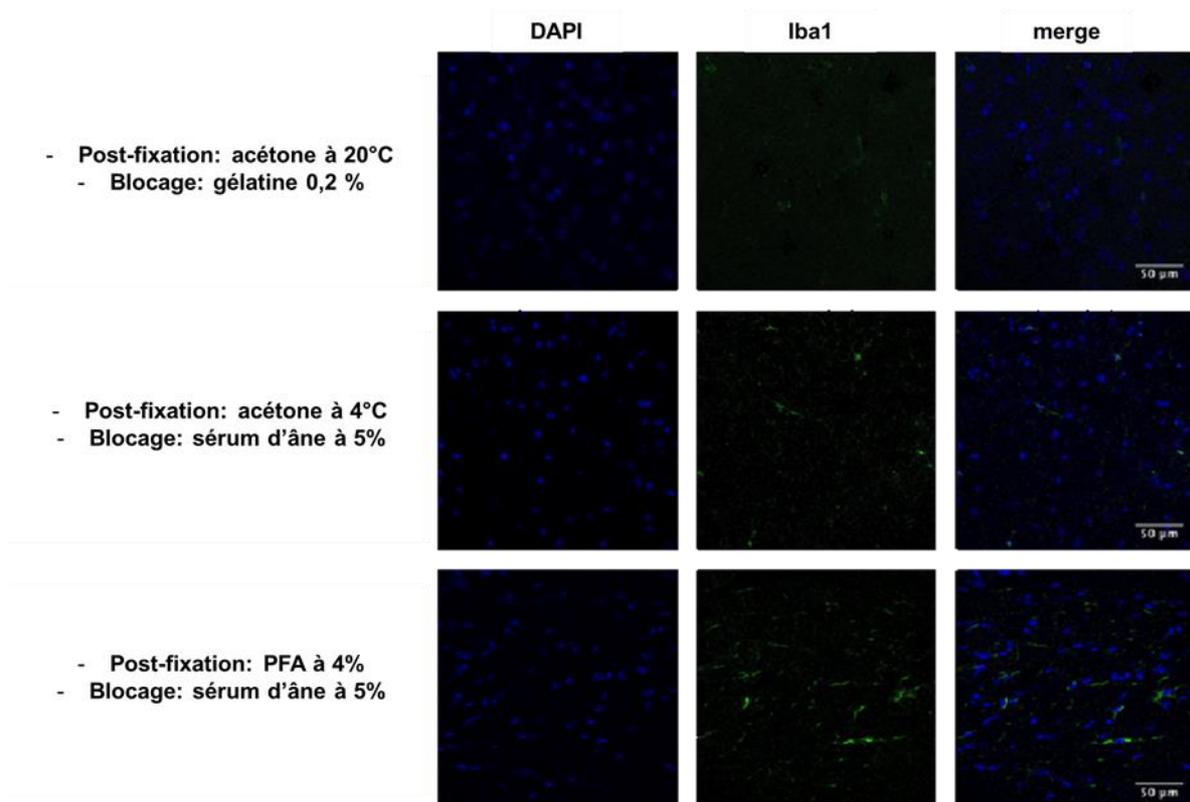
Ainsi, nous avons mis au point des immunohistochimies Iba1/dMBP, Iba1/NOS2, et Iba1/CD206 pour visualiser les microglies/macrophages de phénotype M1 (NOS2) et M2 (CD206), et les débris de myéline (dMBP).

### 3.1. Mise au point des immunohistochimies

Cette mise au point a été réalisée sur des coupes de cerveaux de souris 3 jours après un TC.

Afin d'établir le meilleur protocole pour la suite des expériences, nous avons, tout d'abord, comparé trois protocoles, utilisant chacun des méthodes de post-fixation et des solutions de blocage des sites non spécifiques différentes. Des photos prises au microscope confocal après des immunomarquages de Iba1 sont regroupées dans la Figure 41.

Dans une première expérience, nous avons utilisé de l'acétone à température ambiante pour la post-fixation, et une solution de perméabilisation et de blocage de PBS contenant 0,25% de Triton et 0,2% de gélatine. Les résultats révèlent un bruit de fond très important suggérant une post-fixation inadéquate, ainsi qu'un blocage insuffisant des sites non spécifiques. Ceci nous a donc conduit à changer la technique de post-fixation (acétone à 4°C) et également la solution de blocage et de perméabilisation (PBS contenant 0,25% de Triton et 5% de sérum d'âne, l'espèce correspondant à celle de l'Ac II). Malgré une diminution du bruit de fond, ce protocole n'a permis de visualiser qu'un faible marquage Iba1, rendant difficile l'observation des cellules. Au vu de ce résultat, nous avons donc décidé de garder la solution de blocage, mais la post-fixation a été faite avec du PFA à 4%, précédée de 5 minutes de réhydratation avec du PBS. Ces modifications ont permis une nette amélioration du marquage spécifique des microglies/macrophages, qui deviennent clairement visibles avec leurs ramifications.



**Figure 41: Photos représentatives de la mise au point de l'immunohistochimie DAPI/Iba1, avec différentes conditions de post-fixation et de blocage des sites non spécifiques**

*Les photos, prises à l'aide d'un microscope confocal (grossissement x63), montrent le marquage des noyaux par le DAPI, des microglies/macrophages par Iba1, ainsi que le co-marquage (merge).*

*Abréviations: Iba1, ionized calcium binding adapter molecule 1; PFA, paraformaldéhyde*

Au vu de ces résultats, nous avons validé ce dernier protocole pour poursuivre notre étude.

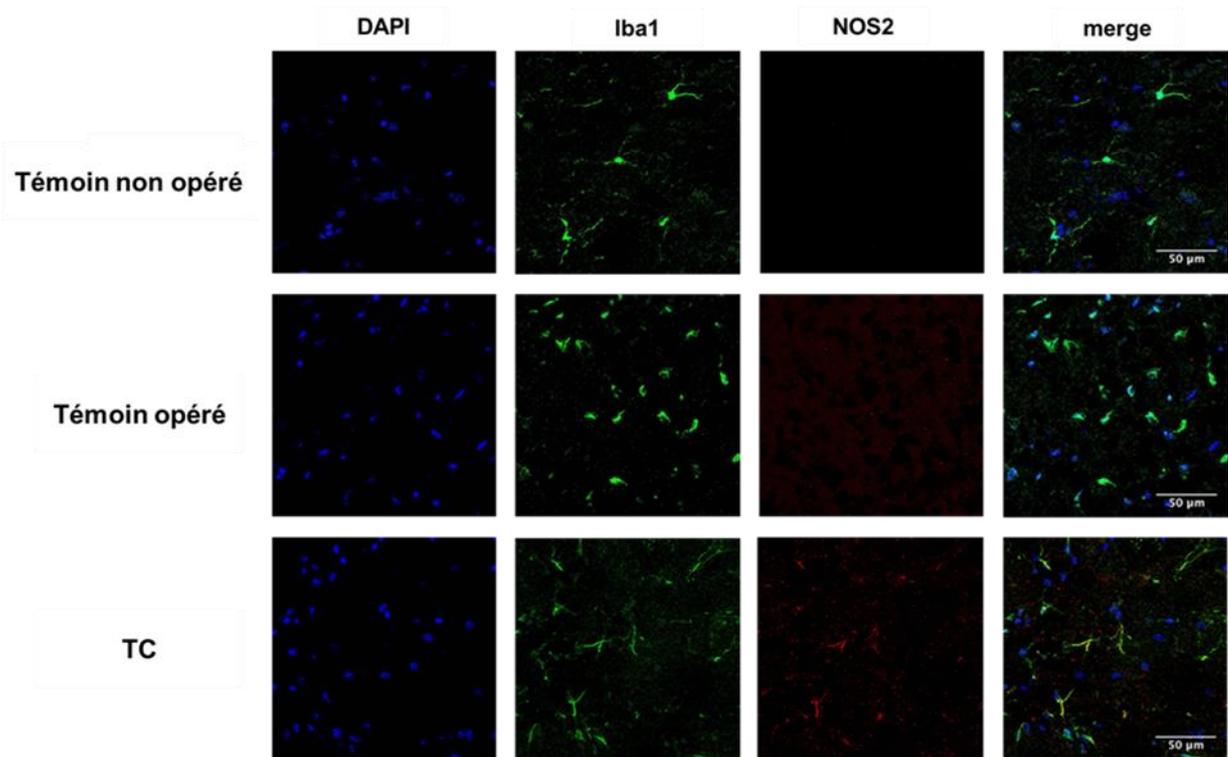
### **3.2. Caractérisation des phénotypes microgliaux après un traumatisme crânien**

Cette étude de caractérisation a été réalisée 3 jours après le TC. Ce temps a été choisi, car il correspond à la présence à la fois d'une démyélinisation et d'une population mixte de microglies M1 et M2 dans notre modèle expérimental de TC (Taib *et al.*, 2017). Les phénotypes microgliaux/macrophagiques M1 et M2 ont été mis en évidence grâce à des Ac I dirigés, respectivement, contre les protéines NOS2 et CD206.

Ne disposant que d'Ac I anti-NOS2 et anti-CD206 issus de la même espèce animale (lapin), il était impossible de réaliser un co-marquage de ces deux protéines. Nous avons

donc fait deux expériences séparées pour marquer les microglies/macrophages de phénotype M1 (immunohistochimie Iba1/NOS2) et M2 (immunohistochimie Iba1/CD206).

La Figure 42 montre une absence d'expression de la NOS2 chez les souris témoins non opérées. Un signal très faible est observable chez les souris témoins opérées. L'expression de la NOS2, co-localisée avec celle d'Iba1, est nettement plus importante chez les souris TC.

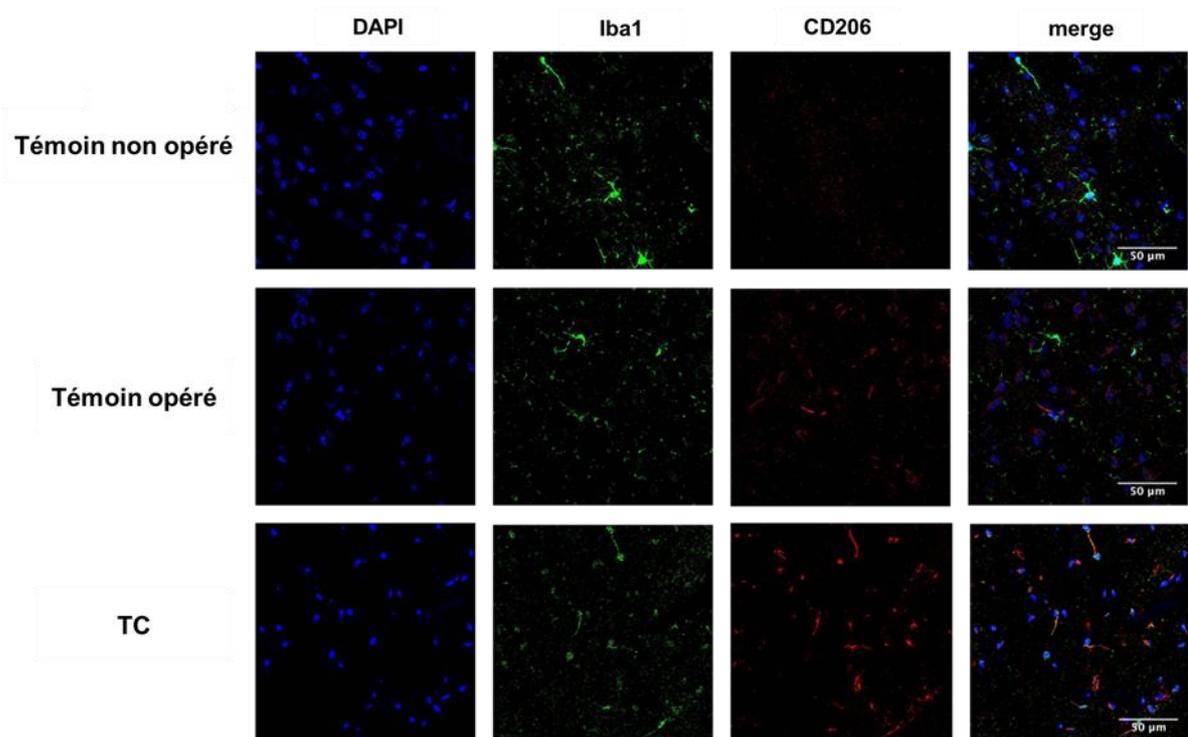


**Figure 42: Photos représentatives de la visualisation des microglies/macrophages de phénotype M1, 3 jours post-TC, par immunohistochimie DAPI/Iba1/NOS2**

*Les photos, prises à l'aide d'un microscope confocal (grossissement x63), montrent le marquage des noyaux par le DAPI, des microglies/macrophages par Iba1 et de NOS2, ainsi que le co-marquage (merge); N=1.*

*Abréviations: Iba1, ionized calcium binding adapter molecule 1; NOS2, NO-synthase de type 2*

La protéine CD206 est absente chez les souris témoins non opérées et est légèrement exprimée chez les souris témoins opérées (Figure 43). Toutefois, le marquage CD206, co-localisé avec celui d'Iba1, apparaît nettement plus élevé chez les souris TC.



**Figure 43: Photos représentatives de la visualisation des microglies/macrophages de phénotype M2, 3 jours post-TC, par immunohistochimie DAPI/Iba1/CD206**

Les photos, prises à l'aide d'un microscope confocal (grossissement x63), montrent le marquage des noyaux par le DAPI, des microglies/macrophages par Iba1 et de CD206, ainsi que le co-marquage (merge); N=1.

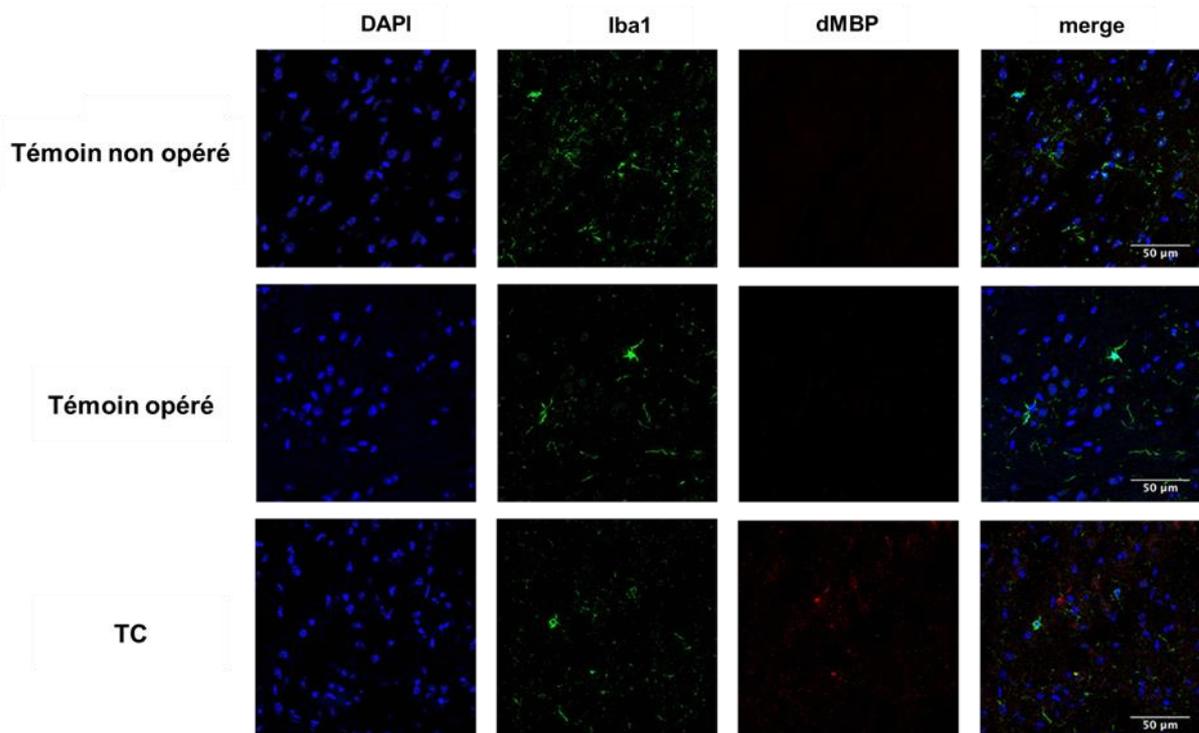
Abréviations: CD, cluster of differentiation; Iba1, ionized calcium binding adapter molecule 1

Cette étude préliminaire confirme la présence d'une population mixte de microglies/macrophages M1 et M2, 3 jours après le TC. Toutefois cette étude doit être complétée pour avoir un nombre suffisant d'animaux.

### 3.3. Mise en évidence des débris de myéline après un traumatisme crânien

Grâce à un Ac I anti-dMBP dirigé spécifiquement contre la myéline dégradée (Matsuo *et al.*, 1997, 1998; Zhu *et al.*, 2017), nous avons cherché à mettre en évidence la présence de débris de myéline par immunohistochimie 3 jours après le TC.

Nos résultats montrent l'absence de débris de myéline chez les souris témoins non opérées et opérées (Figure 44). Par contre, un marquage dMBP est visible chez les souris TC (Figure 44), confirmant la présence de débris de myéline dans le modèle expérimental de TC. De plus, ce marquage semble co-localisé avec celui de Iba1, suggérant la phagocytose des débris de myéline par les microglies et macrophages.



**Figure 44: Photos représentatives de la visualisation des débris de myéline, 3 jours post-TC, par immunohistochimie DAPI/Iba1/dMBP**

Les photos, prises à l'aide d'un microscope confocal (grossissement x63), montrent le marquage des noyaux par le DAPI, des microglies/macrophages par Iba1 et des débris de myéline par la dMBP, ainsi que le co-marquage (merge); N=1.

Abréviations: Iba1, ionized calcium binding adapter molecule 1; dMBP, degraded myelin basic protein

### 3.4. Discussion

L'objectif de ces expériences *in vivo* était, d'une part, de visualiser les débris de myéline dans notre modèle expérimental de TC, et d'autre part, de confirmer la présence d'une population mixte de phénotypes microgliaux M1 et M2, en détectant la présence des protéines de marqueurs spécifiques. L'ensemble de ce travail est, à terme, de confirmer nos résultats *in vitro* qui suggèrent un rôle des débris de myéline dans la promotion du phénotype microglial M2 après un TC, ainsi que la diminution du phénotype M1.

Pour réaliser cette étude, il nous a fallu, tout d'abord, mettre au point le protocole d'immunohistochimie sur des coupes de cerveaux de souris ayant subi un TC. Pour cela, nous avons testé trois protocoles de post-fixation (acétone à température ambiante ou à 4°C, ou PFA à 4%) et deux solutions de blocages différentes, l'une avec de la gélatine et l'autre

avec le sérum de l'espèce (âne) dont est issu l'Ac II. Nos résultats montrent que la post-fixation au PFA et le blocage avec la solution contenant le sérum d'âne semblent les plus efficaces.

Le protocole d'IHC étant mis au point, nous avons commencé par mettre en évidence les débris de myéline 3 jours après le TC, temps auquel a été observée une démyélinisation dans notre modèle expérimental de TC (Taib *et al.* 2017). Bien que les lésions de la SB soient largement décrites dans les modèles expérimentaux de TC, très peu d'études sont disponibles en ce qui concerne la présence de débris de myéline. Wen et collaborateurs (2014) ont mis en évidence des débris de myéline entre 7 à 28 jours suivant un TC chez le rat (Voir le paragraphe « 3.1. Mise en évidence des débris de myéline après un traumatisme crânien » du « Chapitre III: Les lésions de la substance blanche et rôle des débris de myéline dans la neuro-inflammation » de la partie « Rappels bibliographiques ». Par ailleurs, des débris de myéline ont été visualisés dans d'autres pathologies associées à la démyélinisation, plus particulièrement la sclérose en plaque. Ainsi, après démyélinisation par administration de cuprizone chez la souris, des débris de myéline sont observés dans le corps calleux, par IHC en utilisant un Ac I anti-dMBP, de 4 à 12 semaines après démyélinisation (Cantoni *et al.*, 2015). De plus, la quantité de débris myéline augmente fortement chez les souris n'exprimant pas le récepteur TREM2 (souris KO TREM2<sup>-/-</sup>), impliqué dans la phagocytose des débris de myéline par la microglie. Toujours dans un modèle expérimental de sclérose en plaque, il a également été mis en évidence, avec l'Ac I anti-dMBP, des débris de myéline dans le corps calleux 7 semaines après démyélinisation (Zhu *et al.*, 2017).

Pour marquer les débris de myéline, nous avons utilisé l'Ac I anti-dMBP, capable de se fixer sur des épitopes qui ne sont accessibles que sur la myéline dégradée (Matsuo *et al.*, 1997, 1998; Zhu *et al.*, 2017). Nos résultats montrent l'absence de débris de myéline sur les coupes de cerveaux de souris témoins non opérées, ainsi que sur celles de souris témoins opérées, ce qui montre que la chirurgie elle-même n'induit pas la formation de débris de myéline. En revanche, sur les coupes de cerveaux de souris TC, des débris de myéline apparaissent sous forme d'amas ou sous l'apparence de petits points présents sur la totalité de la coupe, ce qui montre que le TC induit la formation de débris de myéline visible à 3 jours. On peut supposer que les débris apparaissent à la suite de l'impact, et que la diffusion des lésions axonales a généré des débris sur l'ensemble du cerveau. De plus, ces débris de myéline semblent co-localisés avec les microglies et macrophages, ce qui suggère leur phagocytose par ces cellules. Toutefois, ce travail reste préliminaire et doit être complété par d'autres expériences visant notamment à mettre en évidence l'internalisation des débris de myéline à l'intérieur des lysosomes, afin de confirmer leur phagocytose par les microglies et macrophages. Il serait également intéressant, pour déterminer la cinétique

de formation des débris de myéline, de faire des immunohistochimies à des temps plus précoces (J1) et tardif (J7) après le TC. En effet, des travaux du laboratoire (Taib *et al.*, 2017) ont montré un début de démyélinisation bilatérale (*via* une diminution de la MBP) dans le corps calleux à partir de 3 jours, et ceci jusqu'à 3 mois après la lésion. Il serait donc pertinent d'étudier la myéline dégradée, afin d'observer si cette dernière augmente parallèlement à la démyélinisation.

Afin de réaliser une caractérisation *in situ* des phénotypes M1 et M2, sur des coupes de cerveaux, nous avons réalisé des immunomarquages Iba1/NOS2 et Iba1/CD206. Nos résultats montrent l'absence de marquage chez les animaux NO, mais un faible marquage chez les souris TO, qui pourrait être lié à l'induction de leur expression suite à la chirurgie. En effet, la craniotomie est une forme d'agression pour l'organisme, et il est logique qu'elle induise une inflammation. Ce marquage est nettement plus intense 3 jours après le TC, témoignant ainsi d'une activation mixte des microglies/macrophages en phénotype M1 et M2. Ces résultats sont donc en accord avec les travaux de Taib et collaborateurs (2017), qui montraient également une activation de la microglie sous ces deux phénotypes (ARNm) 3 jours après le TC. Toutefois cette étude reste également préliminaire et doit être complétée sur un plus grand nombre d'animaux. De plus, pour la suite de ce travail, il serait plus intéressant de réaliser des co-marquages des deux protéines NOS2 et CD206 sur les mêmes coupes de cerveaux, afin de vérifier si ces dernières sont exprimées par les mêmes cellules ou bien des cellules différentes. En effet, il a récemment été décrit une population « M-Trans » exprimant simultanément des marqueurs phénotypiques M1 et M2 (Voir le paragraphe « 5.3. Polarisation microgliale après un traumatisme crânien » du « Chapitre II: La neuro-inflammation post-traumatique » de la partie « Rappels bibliographique »). Une étude expérimentale a ainsi montré la présence de microglies/macrophages co-exprimant les marqueurs TGF $\beta$ /CD16/32 ou arginase-1/NOS2 1 et 7 jours après un TC (Kumar *et al.*, 2016a). Morganti et collaborateurs (2016) ont également décrit l'existence de microglies/macrophages co-exprimant les marqueurs MARCO/CD36, CD68/YM1 et CD68/CD206 1, 3 et 7 jours après un TC. Ces 2 études, ainsi que nos résultats, montrent donc une présence précoce du phénotype microglial M2 après le TC.

Pour la suite de ce travail, un quadruple marquage Iba1/dMBP/NOS2/CD206 permettrait d'étudier la localisation des différents phénotypes et leur répartition en fonction de la présence de débris de myéline. Cette étude permettra également de déterminer si, comme observé *in vitro*, la phagocytose des débris de myéline pourrait contribuer à l'orientation de la microglie en phénotype anti-inflammatoire M2 après un TC.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était de clarifier *in vitro* le rôle des débris de myéline dans l'orientation du phénotype microglial dans un contexte de TC. Des cultures primaires de microglies de souris ont ainsi été incubées avec des débris de myéline seuls (« conditions physiologiques ») ou en présence de stimuli pro- ou anti-inflammatoires, afin de mimer l'environnement inflammatoire post-traumatique.

Nous avons montré que dans des « conditions physiologiques », c'est-à-dire sur des microglies non stimulées, les débris de myéline ne permettent pas d'orienter la microglie vers un phénotype particulier.

Le TC étant caractérisé par une population mixte de phénotypes microgliaux M1/M2, nous avons ensuite étudié l'effet des débris de myéline en présence de stimuli pro-inflammatoires, le LPS ou le TNF $\alpha$ , ou anti-inflammatoires, l'IL-4. Nous avons montré que les débris de myéline non seulement s'opposent à l'activation microgliale en phénotype pro-inflammatoire M1, mais également favorisent le phénotype anti-inflammatoire M2. Nos résultats vont donc à l'encontre de l'hypothèse d'un cercle vicieux émise par Yang et collaborateurs (2011), mais confirment, au contraire, certaines données de la littérature suggérant un rôle anti-inflammatoire des microglies/macrophages exposés à des débris de myéline dans des modèles expérimentaux de sclérose en plaques. Les débris de myéline apparaissent donc comme des médiateurs endogènes pouvant être à l'origine du phénotype microglial M2 observé à la suite d'un TC. Afin de confirmer cette hypothèse, il est nécessaire d'identifier, après un TC, les phénotypes microgliaux présents dans les régions cérébrales contenant des débris de myéline. Pour cela, nous avons débuté cette étude à la fin de ma thèse grâce à des immunohistochimies sur des coupes de cerveaux de souris ayant subi un TC par ICC, afin (1) de caractériser les phénotypes microgliaux/macrophagiques M1 et M2, et (2) de mettre en évidence les débris de myéline. Des résultats préliminaires confirment la présence d'une population mixte M1/M2 et de débris de myéline dans le corps calleux 3 jours après le TC, structure dans laquelle le laboratoire a déjà mis en évidence une démyélinisation (Taib *et al.*, 2017). De plus, des débris sont présents dans les microglies/macrophages, suggérant leur phagocytose. Néanmoins, cette étude doit être complétée sur un plus grand nombre d'animaux.

La compréhension des mécanismes endogènes pouvant moduler les phénotypes microgliaux à la suite d'un TC est indispensable pour le développement de stratégies neuroprotectrices. Un des objectifs de la neuroprotection est de renforcer ces mécanismes de protection endogènes, souvent incapables de faire face aux dommages post-traumatiques. Dans cette optique, nous avons donc évalué si une stratégie pharmacologique anti-inflammatoire, basée plus particulièrement sur l'inhibition de la PARP, pouvait potentialiser l'effet anti-inflammatoire des débris de myéline. Nous avons montré que, dans un environnement pro-inflammatoire, l'inhibition de la PARP microgliale par le PJ34 ne permet pas de potentialiser le phénotype anti-inflammatoire M2, ni de diminuer le phénotype M1 en présence de débris de myéline. Au contraire, dans un environnement favorable, la PARP semble intervenir dans la promotion du phénotype anti-inflammatoire M2. Ces résultats corrélerent avec ceux du laboratoire, obtenus chez la souris après un ICC, montrant que le PJ34 n'induit aucune modification des phénotypes à 3 et 7 jours après le TC. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent donc qu'en présence de débris de myéline, plus particulièrement après un TC, l'effet protecteur de l'inhibition de la PARP ne semble pas impliquer une augmentation du phénotype M2 et/ou une diminution du phénotype M1. Ne disposant pas d'autres données concernant le rôle de la PARP dans les changements phénotypiques après un TC, et plus précisément dans ceux induits par les débris de myéline, nos résultats doivent être confirmés par des études supplémentaires. Concernant les expériences *in vitro*, il sera ainsi intéressant de tester d'autres inhibiteurs de PARP ou d'utiliser des cultures primaires de microglies issues de souris PARP<sup>-/-</sup>, afin de confirmer les résultats obtenus. Concernant les expériences *in vivo*, il sera également nécessaire de confirmer les résultats avec un autre protocole d'administration de PJ34 ou d'autres inhibiteurs de la PARP.

Dans le but d'élucider les mécanismes cellulaires pouvant être à l'origine des changements phénotypiques de la microglie en présence de débris de myéline, nous nous sommes intéressés à la phagocytose, un phénomène décrit comme pouvant conférer des propriétés anti-inflammatoires à la microglie. Nos résultats montrent que la phagocytose des débris de myéline contribue, au moins en partie, à la diminution du phénotype M1 et à l'augmentation du phénotype M2, observées *in vitro* en présence de débris de myéline dans un environnement pro- ou anti-inflammatoire. Ce travail pourra être complété en quantifiant la phagocytose des débris de myéline, grâce à un marquage de ces derniers par un fluorophore, afin de déterminer le degré d'inhibition de la phagocytose par la cytochalasine D.

Par ailleurs, il faudra rechercher les voies d'endocytose des débris de myéline à l'origine de cet effet anti-inflammatoire. En effet, bien que classiquement utilisé dans la littérature,

le terme de phagocytose n'est qu'une simplification d'un phénomène plus complexe, l'endocytose (Solé-Domènech *et al.*, 2016). Cette endocytose fait intervenir plusieurs voies, y compris la phagocytose, mais également l'endocytose clathrine-dépendante et la pinocytose (Solé-Domènech *et al.*, 2016). Une des possibilités serait également d'étudier le rôle spécifique de deux récepteurs microgliaux impliqués dans les phénomènes d'endocytose, LRP1 et TREM2, pour lesquels un effet anti-inflammatoire a été précédemment décrit.

Bien que la phagocytose des débris de myéline semble impliquée dans, au moins, une partie de l'effet anti-inflammatoire des débris de myéline, cela n'exclut pas la possibilité d'une stimulation directe de récepteurs microgliaux par certains composants de la myéline, plus particulièrement lipidiques. Il est ainsi prévu de déterminer (1) la composition de notre préparation de débris de myéline par une analyse lipidomique, et (2) la taille des débris par microscopie électronique. En effet, selon la taille des particules, les mécanismes d'endocytose sont différents (Mortensen et Larsson, 2003). Ces études permettront d'identifier les lipides et les voies mécanistiques potentiellement impliqués dans les effets protecteurs. Récemment au laboratoire, dans le cadre de la thèse du Dr Toufik Taib, une étude lipidomique du corps calleux, une structure riche en myéline, a montré des modifications de nombreux composants lipidiques 7 jours après un TC induit par ICC chez la souris (Auzeil *et al.*, soumis à *J Neurotrauma*). Il a ainsi été observé une diminution des glycérophospholipides, des sphingolipides et des glycérolipides, ainsi qu'une augmentation du cholestérol estérifié et des acides gras, dont les acides docosahexanoïque et éicosapentaénoïque, pour lesquels des rôles neuroprotecteurs et anti-inflammatoires ont été décrits dans des modèles expérimentaux de TC (Lucke-Wold *et al.*, 2018).

Enfin, ce travail s'inscrivant dans une thématique de recherche plus large, visant à rechercher des stratégies thérapeutiques pour les lésions de la SB post-traumatiques, il sera donc nécessaire d'évaluer les conséquences de ces changements phénotypiques microgliaux, induits par les débris de myéline, sur la survie des oligodendrocytes. L'utilisation d'un milieu conditionné ou d'un modèle de co-culture de microglies et d'oligodendrocytes permettra ainsi de déterminer si des microglies orientées en phénotype M2 par les débris de myéline sont capables de protéger des oligodendrocytes en souffrance, soumis par exemple à une privation en oxygène en glucose ou à une excitotoxicité. N'ayant pas pu finaliser la mise au point de la culture d'oligodendrocytes, ce travail n'a pas pu être commencé pendant ma thèse, mais sera bien sûr poursuivi.

*Pour conclure, ce travail a permis d'identifier les débris de myéline comme des médiateurs endogènes pouvant être à l'origine de l'orientation phénotypique de la microglie en phénotype M2 après un TC. La PARP ne semble pas impliquée dans la polarisation microgliale en présence de débris de myéline. Par ailleurs, les changements phénotypiques de la microglie observés en présence de débris de myéline semblent partiellement liés au phénomène de phagocytose. Dans le futur, il s'agira donc d'identifier les voies intracellulaires orchestrant ces changements phénotypiques de la microglie.*

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Altmeyer M, Messner S, Hassa PO, Fey M, Hottiger MO. (2009). Molecular mechanism of poly(ADP-ribosylation) by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. *Nucleic Acids Res*, 37: 3723-3738.
- Amaral AI, Hadera MG, Tavares JM, Kotter MR, Sonnewald U. (2016). Characterization of glucose-related metabolic pathways in differentiated rat oligodendrocyte lineage cells. *Glia*, 64: 21-34.
- Ansari MA. (2015). Temporal profile of M1 and M2 responses in the hippocampus following early 24h of neurotrauma. *J Neurol Sci*, 357: 41-49.
- Armstrong RC, Mierzwa AJ, Marion CM, Sullivan GM. (2016). White matter involvement after TBI: Clues to axon and myelin repair capacity. *Exp Neurol*, 275: 328-333.
- Aungst SL, Kabadi SV, Thompson SM, Stoica BA, Faden AI. (2014). Repeated mild traumatic brain injury causes chronic neuroinflammation, changes in hippocampal synaptic plasticity, and associated cognitive deficits. *J Cereb Blood Flow Metab*, 34: 1223-1232.
- Ba X, Garg NJ. (2011). Signaling mechanism of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in inflammatory diseases. *Am J Pathol*, 178:946-955.
- Bachstetter AD, Rowe RK, Kaneko M, Goulding D, Lifshitz J, Van Eldik LJ. (2013). The p38 $\alpha$  MAPK regulates microglial responsiveness to diffuse traumatic brain injury. *J Neurosci*, 33: 6143-6153.
- Baer AS, Syed YA, Kang SU, Mitteregger D, Vig R, Ffrench-Constant C, Franklin RJ, Altmann F, Lubec G, Kotter MR. (2009). Myelin-mediated inhibition of oligodendrocyte precursor differentiation can be overcome by pharmacological modulation of Fyn-RhoA and protein kinase C signalling. *Brain*, 132(Pt 2): 465-81.
- Bai P. (2015). Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The factotums of cell maintenance. *Mol Cell*, 58: 947-958.
- Banjara M, Ghosh C. (2017). Sterile neuroinflammation and strategies for therapeutic intervention. *Int J Inflam*, ID 8385961.
- Barateiro A, Fernandes A. (2014). Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim Biophys Acta*, 1843: 1917-1929.
- Barkovich AJ. (2000). Concepts of myelin and myelination in neuroradiology. *Am J Neuroradiol*, 21: 1099-1109.
- Barres BA, Jacobson MD, Schmid R, Sendtner M, Raff MC. (1993). Does oligodendrocyte survival depend on axons? *Curr Biol*, 3:489-497.
- Beauchamp K, Mutlak H, Smith WR, Shohami E, Stahel PF. (2008). Pharmacology of traumatic brain injury: Where is the "Golden Bullet"? *Mol Med*, 14: 731-740.
- Bellander BM, Singhrao SK, Ohlsson M, Mattsson P, Svensson M. (2001). Complement activation in the human brain after traumatic head injury. *J Neurotrauma*, 18: 1295-1311.
- Bennarroch EE. (2013). Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury. *Neurology*, 81: 1079-1088.

- Bennett RE, Brody DL. (2014).** Acute reduction of microglia does not alter axonal injury in a mouse model of repetitive concussive traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 31: 1647-1663.
- Berger NA. (1985).** Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res*, 101:4-15.
- Berger NA, Besson VC, Boulares AH, Bürkle A, Chiarugi A, Clark RS, Curtin NJ, Cuzzocrea S, Dawson TM, Dawson VL, Haskó G, Liaudet L, Moroni F, Pacher P, Radermacher P, Salzman AL, Snyder SH, Soriano FG, Strosznajder RP, Sümegi B, Swanson RA, Szabo C. (2018).** Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases. *Br J Pharmacol*, 175: 192-222.
- Besson VC, Croci N, Boulu RG, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C. (2003a).** Deleterious poly(ADP-ribose)polymerase-1 pathway activation in traumatic brain injury in rat. *Brain Res*, 989:58-66.
- Besson VC, Margail I, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C. (2003b).** Deleterious activation of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in brain after in vivo oxidative stress. *Free Radic Res*, 37: 1201-1208.
- Besson VC, Chen XR, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C. (2005a).** Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, exerts neuroprotective effects in traumatic brain injury. *Neurosci Lett*, 388: 7-12.
- Besson VC, Zsengellér Z, Plotkine M, Szabó C, Marchand-Verrecchia C. (2005b).** 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.
- Besson VC. (2009).** Drug targets for traumatic brain injury from poly(ADP-ribose)polymerase pathway modulation. *Br J Pharmacol*, 157(5): 695-704.
- Bhatnagar S, Iaccarino MA, Zafonte R. (2016).** Pharmacotherapy in rehabilitation of post-acute traumatic brain injury. *Brain Res*, 1640: 164-179.
- Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, Meuth SG. (2014).** Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG35-55). induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *J Vis Exp*, 15: (86).
- Blennow K, Hardy J, Zetterberg H. (2012).** The neuropathology and neurobiology of traumatic brain injury. *Neuron*, 76: 886-899.
- Blennow K, Brody DL, Kochanek PM, Levin H, McKee A, Ribbers GM, Yaffe K, Zetterberg H. (2016).** Traumatic brain injuries. *Nat Rev Dis Primers*, 2: 16084.
- Boche D, Perry VH, Nicoll JA. (2013).** Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 39: 3-18.
- Boven LA, Van Meurs M, Van Zwam M, Wierenga-Wolf A, Hintzen RQ, Boot RG, Aerts JM, Amor S, Nieuwenhuis EE, Laman JD. (2006).** Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. *Brain*, 129: 517-526.
- Bradl M, Lassmann H. (2010).** Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119: 37-53.
- Braun M, Vaibhav K, Saad NM, Fatima S, Vender JR, Baban B, Hoda MN, Dhandapani KM. (2017).** White matter damage after traumatic brain injury: A role for damage associated molecular patterns. *Biochim Biophys Acta*, 1863(10 Pt B): 2614-2626

- Bu W, Ren H, Deng Y, Del Mar N, Guley NM, Moore BM, Honig MG, Reiner A. (2016).** Mild Traumatic Brain Injury Produces Neuron Loss That Can Be Rescued by Modulating Microglial Activation Using a CB2 Receptor Inverse Agonist. *Front Neurosci*, 10: 449.
- Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV. (2016).** Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol*, 275: 305-315.
- Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, Martino G, Schwartz M. (2006a).** Microglia activated by IL-4 or IFN gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*, 31: 149-160.
- Butovsky O, Landa G, Kunis G, Ziv Y, Avidan H, Greenberg N, Schwartz A, Smirnov I, Pollack A, Jung S, Schwartz M. (2006b).** Induction and blockage of oligodendrogenesis by differently activated microglia in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest*, 116: 905-915.
- Byrnes KR, Stoica B, Loane D.J, Riccio A, Davis MI, Faden AI. (2009).** Metabotropic glutamate receptor 5 activation inhibits microglial associated inflammation and neurotoxicity. *Glia*, 57: 550-560.
- Caldecott KW. (2014).** Protein ADP-ribosylation and the cellular response to DNA strand breaks. *DNA Repair*, 19: 108-113.
- Cantoni C, Bollman B, Licastro D, Xie M, Mikesell R, Schmidt R, Yuede CM, Galimberti D, Olivecrona G, Klein RS, Cross AH, Otero K, Piccio L. (2015).** TREM2 regulates microglial cell activation in response to demyelination in vivo. *Acta Neuropathol*, 129(3): 429-47.
- Cao T, Thomas TC, Ziebell JM, Pauly JR, Lifshitz J. (2012).** Morphological and genetic activation of microglia after diffuse traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience*, 225: 65-75.
- Casson RJ, Chidlow G, Ebnetter A, Wood JP, Crowston J, Goldberg I. (2012).** Translational neuroprotection research in glaucoma: a review of definitions and principles. *Clin Exp Ophthalmol*, 40: 350-357.
- Chawla A. (2010).** Control of macrophage activation and function by PPARs. *Circ Res*, 106: 1559-1569.
- Chen XR, Besson VC, Palmier B, Garcia Y, Plotkine M, Marchand-Leroux C. (2007).** Neurological recovery-promoting, anti-inflammatory, and anti-oxidative effects afforded by fenofibrate, a PPAR alpha agonist, in traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 24: 1119-1131.
- Cheng G, Kong RH, Zhang LM, Zhang JN. (2012).** Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. *Br J Pharmacol*, 167: 699-719.
- Chen C, Li YH, Zhang Q, Yu JZ, Zhao YF, Ma CG, Xiao BG. (2014a).** Fasudil regulates T cell responses through polarization of BV-2 cells in mice experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Pharmacol Sin*, 35: 1428-1438.
- Chen S, Zhang H, Pu H, Wang G, Li W, Leak RK, Chen J, Liou AK, Hu X. (2014b).** n-3 PUFA supplementation benefits microglial responses to myelin pathology. *Sci Rep*, 4:7458.

- Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*, 11: 98.
- Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, Oré MV, Celador IL, Josserand J, Degos V, Jacotot E, Hagberg H, Sävman K, Mallard C, Gressens P, Fleiss B. (2013). Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behav Immun*, 32: 70-85.
- Chiarugi A, Moskowitz MA. (2003). Poly(ADP-ribose)polymerase-1 activity promotes NF-kappaB-driven transcription and microglial activation: implication for neurodegenerative disorders. *J Neurochem*, 85: 306-317.
- Chiu CC, Liao YE, Yang LY, Wang JY, Tweedie D, Kamati HK, Greig NH, Wang JY. (2016). Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. *J Neurosci Methods*, 272: 38-49.
- Chuang TY, Guo Y, Seki SM, Rosen AM, Johanson DM, Mandell JW, Lucchinetti CF, Gaultier A. (2016). LRP1 expression in microglia is protective during CNS autoimmunity. *Acta Neuropathol Commun*, 4: 68.
- Clark WR, Madden KP, Rothlein R, Zivin JA. (1991). Reduction of central nervous system ischemic injury in rabbits using leukocyte adhesion antibody treatment. *Stroke*, 22: 877-883.
- Clark RS, Vagni VA, Nathaniel PD, Jenkins LW, Dixon CE, Szabó C. (2007). Local administration of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor INO-1001 prevents NAD<sup>+</sup> depletion and improves water maze performance after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma*, 24: 1399-1405.
- Clarner T, Diederichs F, Berger K, Denecke B, Gan L, van der Valk P, Beyer C, Amor S, Kipp M. (2012). Myelin debris regulates inflammatory responses in an experimental demyelination animal model and multiple sclerosis lesions. *Glia*, 60: 1468-1480.
- Clausen F, Marklund N, Hillered L. (2018). Acute Inflammatory Biomarker Responses to Diffuse Traumatic Brain Injury in the Rat Monitored by a Novel Microdialysis Technique. *J Neurotrauma*, doi:10.1089/neu.2018.5636.
- Cohen MJ, Brohi K, Calfee CS, Rahn P, Chesebro BB, Christiaans SC, Carles M, Howard M, Pittet JF. (2009). Early release of high mobility group box nuclear protein 1 after severe trauma in humans: role of injury severity and tissue hypoperfusion. *Crit Care*, 13: R174.
- Colonna M, Butovsky O. (2017). Microglia function in the Central nervous system during health and neurodegeneration. *Annu Rev Immunol*, 35: 441-468.
- Colton CA. (2009). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*, 4: 399-418.
- Corps KN, Roth TL, McGavern DB. (2015). Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. *JAMA Neurol*, 72: 355-362.
- Correa F, Gauberti M, Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P, Hernangómez M, Montagne A, Liot G, Guaza C, Maubert E, Ali C, Vivien D, Docagne F. (2011). Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *J Exp Med*, 208(6): 1229-42.
- Coughlin JM, Wang Y, Minn I, Bienko N, Ambinder EB, Xu X, Peters ME, Dougherty JW, Vranesic M, Koo SM, Ahn HH, Lee M, Cottrell C, Sair HI, Sawa A, Munro CA, Nowinski CJ, Dannals RF, Lyketsos CG, Kassiou M, Smith G, Caffo B, Mori S, Guilarte TR,

- Pomper MG. (2017). Imaging of glial cell activation and white matter integrity in brain of active and recently retired national football leagues players. *JAMA Neurol*, 74: 67-74.
- Csuka E, Hans VH, Ammann E, Trentz O, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. (2000). Cell activation and inflammatory response following traumatic axonal injury in the rat. *Neuroreport*, 11: 2587-2590.
- Curtin NJ, Szabo C. (2013). Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond. *Mol Aspects Med*, 34: 1217-1256.
- Dalgard CL, Cole JT, Kean WS, Lucky JJ, Sukumar G, McMullen DC, Pollard HB, Watson WD. (2012). The cytokine temporal profile in rat cortex after controlled cortical impact. *Front Mol Neurosci*, 5:6.
- d'Avila JC, Lam TI, Bingham D, Shi J, Won SJ, Kauppinen TM, Massa S, Liu J, Swanson RA. (2012). Microglial activation induced by brain trauma is suppressed by post-injury treatment with a PARP inhibitor. *J Neuroinflammation*, 9: 31.
- David S, Kroner A. (2011). Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci.*, 12: 388-399.
- Davidsson J, Risling M. (2016). Experimental models for neurotrauma research. *Methods Mol Biol*, 1462: 267-88.
- Dent KA, Christie KJ, Bye N, Basrai HS, Turbic A, Habgood M, Cate HS, Turnley AM. (2015). Oligodendrocyte birth and death following traumatic brain injury in adult mice. *PLoS One*, 10: e0121541.
- Di Giovanni S, Movsesyan V, Ahmed F, Cemak I, Schinelli S, Stoica B, Faden AI. (2005). Cell cycle inhibition provides neuroprotection and reduces glial proliferation and scar formation after traumatic brain injury. *Proc Natl Acad Sci*, 102: 8333-8338.
- Diaz-Arrastia R, Kochanek PM, Bergold P, Kenney K, Marx CE, Grimes CJ, Loh LT, Adam LT, Oskvig D, Curley KC, Salzer W. (2014). Pharmacotherapy of traumatic brain injury: state of the science and the road forward: report of the Department of Defense Neurotrauma Pharmacology Workgroup. *J Neurotrauma*, 31: 135-158.
- Diestel A, Aktas O, Hackel D, Hake I, Meier S, Raine CS, Nitsch R, Zipp F, Ullrich O. (2003). Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage. *J Exp Med*, 198: 1729-1740.
- Dinter H. (2000). Phosphodiesterase type 4 inhibitors: potential in the treatment of multiple sclerosis? *BioDrugs*, 13(2): 87-94.
- Donat CK, Gaber K, Meixensberger J, Brust P, Pinborg LH, Hansen HH, Mikkelsen JD. (2016). Changes in binding of [(123)I]CLINDE, a high-affinity translocator protein 18 kDa (TSPO). selective radioligand in a rat model of traumatic brain injury. *Neuromolecular Med*, 18: 158-169.
- Donat CK, Scott G, Gentleman SM, Sastre M. (2017). Microglial activation in traumatic brain injury. *Front. Aging Neurosci*, 9: 208.
- Eierud C, Craddock RC, Fletcher S, Aulakh M, King-Casas B, Kuehl D, LaConte SM. (2014). Neuroimaging after mild traumatic brain injury: review and meta-analysis. *Neuroimage Clin*, 4: 283-294.

- El Waly B, Macchi M, Cayre M, Durbec P. (2014). Oligodendrogenesis in the normal and pathological central nervous system. *Front Neurosci*, 8: 145.
- Engel S, Schluesener H, Mittelbronn M, Seid K, Adjodah D, Wehner HD, Meyermann R. (2000). Dynamics of microglial activation after human traumatic brain injury are revealed by delayed expression of macrophage-related proteins MRP8 and MRP14. *Acta Neuropathol*, 100: 313-322.
- Enriquez P, Bullock R. (2004). Molecular and cellular mechanisms in the pathophysiology of severe head injury. *Curr Pharm Des*, 10: 2131-2143.
- Faden AI, Loane DJ. (2015). Chronic neurodegeneration after traumatic brain injury: Alzheimer disease, chronic traumatic encephalopathy, or persistent neuroinflammation? *Neurotherapeutics*, 12: 143-150.
- Faden AI, Wu J, Stoica BA, Loane DJ. (2016). Progressive inflammation-mediated neurodegeneration after traumatic brain or spinal cord injury. *Br J Pharmacol*, 173: 681-691.
- Fang Y, Yan J, Li C, Zhou X, Yao L, Pang T, Yan M, Zhang L, Mao L, Liao H. (2015). The Nogo/Nogo Receptor (NgR) signal is involved in neuroinflammation through the regulation of microglial inflammatory activation. *J Biol Chem*, 290: 28901-28914.
- Febinger HY, Thomasy HE, Pavlova MN, Ringgold KM, Barf PR, George AM, Grillo JN, Bachstetter AD, Garcia JA, Cardona AE, Opp MR, Gemma C. (2015). Time dependent effects of CX3CR1 in a mouse model of mild traumatic brain injury. *J Neuroinflammation*, 12: 154.
- Filley CM. (2010). White matter: organization and functional relevance. *Neuropsychol Rev*, 20(2): 158-73.
- Fink EL, Lai Y, Zhang X, Janesko-Feldman K, Adelson PD, Szabó C, Berger RP, Sarnaik AA, Kochanek PM, Clark RS. (2008). Quantification of poly(ADP-ribose)-modified proteins in cerebrospinal fluid from infants and children after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28: 1523-1529.
- Finnie JW. (2013). Neuroinflammation: beneficial and detrimental effects after traumatic brain injury. *Inflammopharmacology*, 21: 309-320.
- Flygt J, Djupsjö A, Lenne F, Marklund N. (2013). Myelin loss and oligodendrocyte pathology in white matter tracts following traumatic brain injury in the rat. *Eur J Neurosci*, 38: 2153-2165.
- Flygt J, Gumucio A, Ingelsson M, Skoglund K, Holm J, Alafuzoff I, Marklund N. (2016). Human traumatic brain injury results in oligodendrocyte death and increases the number of oligodendrocyte progenitor cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 75: 503-515.
- Ford ML, Evavold BD. (2005). Specificity, magnitude, and kinetics of MOG-specific CD8+ T cell responses during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol*, 35: 76-85.
- Frugier T, Morganti-Kossmann MC, O'Reilly D, McLean CA. (2010). In situ detection of inflammatory mediators in post mortem human brain tissue after traumatic injury. *J Neurotrauma*, 27(3):497-507.
- Gadani SP, Cronk JC, Norris GT, Kipnis J. (2012). IL-4 in the brain: a cytokine to remember. *J Immunol*, 189(9):4213-9.

- Gaultier A, Wu X, Le Moan N, Takimoto S, Mukandala G, Akassoglou K, Campana WM, Gonias S.L. (2009).** Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is an essential receptor for myelin phagocytosis. *J Cell Sci*, 122: 1155-1162.
- Geoffroy CG, Zheng B. (2014).** Myelin-associated inhibitors in axonal growth after CNS injury. *Curr Opin Neurobiol*, 27: 31-38.
- Gibson BA, Kraus WL. (2012).** New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 411-424.
- Girard S, Brough D, Lopez-Castejon G, Giles J, Rothwell NJ, Allan SM. (2013).** Microglia and macrophages differentially modulate cell death after brain injury caused by oxygen-glucose deprivation in organotypic brain slices. *Glia*, 61: 813-824.
- Green RE, Colella B, Maller JJ, Bayley M, Glazer J, Mikulis DJ. (2014).** Scale and pattern of atrophy in the chronic stages of moderate-severe TBI. *Front Hum Neurosci*, 8 : 67.
- Gupte R, Liu Z, Kraus WL. (2017).** PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes. *Genes Dev*, 31: 101-126.
- Hagan P, Poole S, Bristow AF, Tilders F, Silverstein FS. (1996).** Intracerebral NMDA injection stimulates production of interleukine 1 beta in perinatal rat brain. *J Neurochem*, 67: 2215-2218.
- Hall ED, Sullivan PG, Gibson TR, Pavel KM, Thompson BM, Scheff SW. (2005).** Spatial and temporal characteristics of neurodegeneration after controlled cortical impact in mice: more than a focal brain injury. *J Neurotrauma*, 22(2): 252-65.
- Hausmann R, Kaiser A, Lang C, Bohnert M, Betz P. (1999).** A quantitative immunohistochemical study on the time-dependent course of acute inflammatory cellular response to human brain injury. *Int J Legal Med*, 112: 227-232.
- Hellewell S, Semple BD, Morganti-Kossmann MC. (2016).** Therapies negating neuroinflammation after brain trauma. *Brain Res*, 1640: 36-56.
- Helmy A, De Simoni MG, Guilfoyle MR, Carpenter KL, Hutchinson PJ. (2011a).** Cytokines and innate inflammation in the pathogenesis of human traumatic brain injury. *Prog Neurobiol*, 95: 352-372.
- Helmy A., Carpenter KL., Menon DK., Pickard JD., Hutchinson PJ. (2011b).** The cytokine response to human traumatic brain injury: temporal profiles and evidence for cerebral parenchymal production. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31 : 658-670.
- Hill CS, Coleman MP, Menon DK. (2016).** Traumatic axonal injury: mechanisms and translational opportunities. *Trends Neurosci*, 39: 311-324.
- Hoge CW, McGurk D, Thomas JL, Cox AL, Engel CC, Castro CA. (2008).** Mild traumatic brain injury in US Soldiers returning from Iraq. *N Engl J Med*, 358: 453-463.
- Homsi S, Federico F, Croci N, Palmier B, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. (2009).** Minocycline effects on cerebral edema: relations with inflammatory and oxidative stress markers following traumatic brain injury in mice. *Brain Res*, 1291: 122-32.
- Homsi S, Piaggio T, Croci N, Noble F, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. (2010).** Blockade of acute microglial activation by minocycline promotes neuroprotection and reduces locomotor hyperactivity after closed head injury in mice: a twelve-week follow-up study. *J Neurotrauma*, 27(5): 911-921.

- Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, Gao Y, Chen J. (2012).** Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 43: 3063-3070.
- Jagtap P, Szabó C. (2005).** Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 4: 421-440.
- Jakovcevski I, Filipovic R, Mo Z, Rakic S, Zecevic N. (2009).** Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front Neuroanat*, 3: 5.
- Jander S, Schroeter M, Stoll G. (2000).** Role of NMDA receptor signaling in the regulation of inflammatory gene expression after focal brain ischemia. *J Neuroimmunol*, 109: 181-187.
- Jeon SB, Yoon HJ, Park SH, Kim IH, Park EJ. (2008).** Sulfatide, a major lipid component of myelin sheath, activates inflammatory responses as an endogenous stimulator in brain-resident immune cells. *J Immunol*, 181: 8077-8087.
- Jin X, Ishii H, Bai Z, Itokazu T, Yamashita T. (2012).** Temporal changes in cell marker expression and cellular infiltration in a controlled cortical impact model in adult male C57BL/6 mice. *PLoS One*, 7: e41892.
- Jin Q, Cheng J, Liu Y, Wu J, Wang X, Wei S, Zhou X, Qin Z, Jia J, Zhen, X. (2014).** Improvement of functional recovery by chronic metformin treatment is associated with enhanced alternative activation of microglia/macrophages and increased angiogenesis and neurogenesis following experimental stroke. *Brain Behav Immun*, 40: 131-142.
- Johns TG, Bernard CC. (1997).** Binding of complement component C1q to myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel mechanism for regulating CNS inflammation. *Mol Immunol*, 34: 33-38.
- Johns TG, Bernard CC. (1999).** The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem*, 72: 1-9.
- Johnson VE, Stewart W, Smith DH. (2010).** Traumatic brain injury and amyloid- $\beta$  pathology: a link to Alzheimer's disease? *Nat Rev Neurosci*, 11: 361-370.
- Johnson VE, Stewart JE, Begbie FD, Trojanowski JQ, Smith DH, Stewart W. (2013a).** Inflammation and white matter degeneration persist for year after a single traumatic brain injury. *Brain*, 136: 28-42.
- Johnson VE, Stewart W, Smith DH. (2013b).** Axonal pathology in traumatic brain injury. *Exp Neurol*, 246: 35-43.
- Jones RS, Minogue AM, Connor TJ, Lynch MA. (2013).** Amyloid- $\beta$ -induced astrocytic phagocytosis is mediated by CD36, CD47 and RAGE. *J Neuroimmune Pharmacol*, 8(1): 301-1.
- Kabadi SV, Faden AI. (2014).** Neuroprotective strategies for traumatic brain injury: Improving clinical translation. *Int J Mol Sci*, 15: 1216–1236.
- Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. (2016).** The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol*, 173: 692-702.
- Kauppinen TM, Swanson RA. (2005).** Poly(ADP-ribose)polymerase-1 promotes microglial activation, proliferation, and matrix metalloproteinase-9-mediated neuron death. *J Immunol*, 174: 2288-2296.

- Kauppinen TM, Suh SW, Higashi Y, Berman AE, Escartin C, Won SJ, Wang C, Cho SH, Gan L, Swanson RA. (2011). Poly(ADP-ribose)polymerase-1 modulates microglial responses to amyloid  $\beta$ . *J Neuroinflammation*, 8:152.
- Kelley B.J, Lifshitz J, Povlishock J.T. (2007). Neuroinflammatory responses after experimental diffuse traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 66: 989-1001.
- Kenne E, Erlandsson A, Lindbom L, Hillered L, Clausen F. (2012). Neutrophil depletion reduces edema formation and tissue loss following traumatic brain injury in mice. *J Neuroinflammation*, 9:17.
- Khodyreva SN, Lavrik OI. (2016). Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 as a key regulator of DNA repair. *Mol Biol (Mosk)*, 50: 655-673.
- Kinnunen KM, Greenwood R, Powell JH, Leech R, Hawkins PC, Bonnelle V, Patel MC, Counsell SJ, Sharp DJ. (2011). White matter damage and cognitive impairment after traumatic brain injury. *Brain*, 134: 449-463.
- Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, Hirakawa A, Takeuchi H, Suzumura A, Ishiguro N, Kadomatsu K. (2013). Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis*, 4: e525.
- Kochanek PM, Jackson TC, Ferguson NM, Carlson SW, Simon DW, Brockman EC, Ji J, Bayir H, Poloyac SM, Wagner AK, Kline AE, Empey PE, Clark RS, Jackson EK, Dixon CE. (2015). Emerging therapies in traumatic brain injury. *Semin Neurol*, 35: 83-100.
- Konishi H, Kiyama H.(2018). Microglial TREM2/DAP12 Signaling: A double-edged sword in neural diseases. *Front Cell Neurosci*, 12:206.
- Koponen S, Taiminen T, Portin R, Himanen L, Isoniemi H, Heinonen H, Hinkka S, Tenovuo O. (2002). Axis I and II psychiatric disorders after traumatic brain injury: a 30-year follow-up study. *Am J Psychiatry*, 159: 1315-1321.
- Kotter MR, Li WW, Zhao C, Franklin RJ. (2006). Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. *J Neurosci*, 26: 328-332.
- Kou, Z, VandeVord PJ. (2014). Traumatic white matter injury and glial activation: from basic science to clinics. *Glia*, 62: 1831-1855.
- Kroner A, Greenhalgh AD, Zarruk JG, Passos Dos Santos R, Gaestel M, David S. (2014). TNF and increased intracellular iron alter macrophage polarization to a detrimental M1 phenotype in the injured spinal cord. *Neuron*, 83: 1098-1116.
- Kumar A, Loane DJ. (2012). Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav Immun*, 26: 1191-1201.
- Kumar A, Stoica BA, Sabirzhanov B, Burns MP, Faden AI, Loane DJ. (2013). Traumatic brain injury in aged animals increases lesion size and chronically alters microglial/macrophage classical and alternative activation states. *Neurobiol Aging*, 34: 1397-1411.
- Kumar A, Alvarez-Croda DM, Stoica BA, Faden AI, Loane DJ. (2016a). Microglial/Macrophage polarization dynamics following traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 33: 1732-1750.
- Kumar A, Barrett JP, Alvarez-Croda DM, Stoica BA, Faden AI, Loane DJ. (2016b). NOX2 drives M1-like microglial/macrophage activation and neurodegeneration following experimental traumatic brain injury. *Brain Behav. Immun*, 58: 291-309.

- Lacza Z, Horváth EM, Komjáti K, Hortobágyi T, Szabó C, Busija DW. (2003). PARP inhibition improves the effectiveness of neural stem cell transplantation in experimental brain trauma. *Int J Mol Med*, 12: 153-159.
- Laird MD, Shields JS, Sukumari-Ramesh S, Kimbler DE, Fessler RD, Shakir B, Youssef P, Yanasak N, Vender JR, Dhandapani KM. (2014). High mobility group box nuclear protein 1 promote cerebral edema after traumatic brain injury via activation of toll-like receptor 4. *Glia*, 62: 26-38.
- Lampron A, Larochelle A, Laflamme N, Préfontaine P, Plante MM, Sánchez MG, Yong VW, Stys PK, Tremblay MÈ, Rivest S. (2015). Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes. *J Exp Med*, 212: 481-495.
- Langham J, Goldfrad C, Teasdale G, Shaw D, Rowan K. (2003). Calcium channel blockers for acute traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev*, (4): CD000565.
- LaPlaca MC, Raghupathi R, Verma A, Pieper AA, Saatman KE, Snyder SH, McIntosh TK. (1999). Temporal patterns of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the cortex following experimental brain injury in the rat. *J Neurochem*, 73: 205-213.
- LaPlaca MC, Zhang J, Raghupathi R, Li JH, Smith F, Bareyre FM, Snyder SH, Graham DI, McIntosh TK. (2001). Pharmacologic inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase is neuroprotective following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*, 18: 369-376.
- Lerouet D, Besson VC, Plotkine M. (2014). Stroke and traumatic brain injury. *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, 367-386.
- Lescot T, Fulla-Oller L, Palmier B, Po C, Beziaud T, Puybasset L, Plotkine M, Gillet B, Méric P, Marchand-Leroux C. (2010). Effect of acute poly(ADP-ribose) polymerase inhibition by 3-AB on blood-brain barrier permeability and edema formation after focal traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*, 27(6): 1069-79.
- Li H, Cuzner ML, Newcombe J. (1996). Microglia-derived macrophages in early multiple sclerosis plaques. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 22: 207-215.
- Li C, Zhao B, Lin C, Gong Z, An X. (2018). TREM2 inhibits inflammatory responses in mouse microglia by suppressing the PI3K/NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Biol Int*, doi: 10.1002/cbin.10975.
- Ling H, Hardy J, Zetterberg H. (2015). Neurological consequences of traumatic brain injuries in sports. *Mol Cell Neurosci*, 66: 114-122.
- Lively S, Schlichter LC. (2018). Microglia responses to pro-inflammatory stimuli (LPS, IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ ) and reprogramming by resolving cytokines (IL-4, IL-10). *Front Cell Neurosci*, 12:215.
- Lively S, Lam D, Wong R, Schlichter LC. (2018). Comparing effects of transforming growth factor  $\beta$ 1 on microglia from rat and mouse: transcriptional profiles and potassium channels. *Front Cell Neurosci*, 12:115.
- Liu Y, Hao W, Letiembre M, Walter S, Kulanga M, Neumann H, Fassbender K. (2006). Suppression of microglial inflammatory activity by myelin phagocytosis: role of p47-PHOX-mediated generation of reactive oxygen species. *J Neurosci*, 26: 12904-12913.
- Loane DJ, Stoica BA, Pajoohesh-Ganji A, Bymes KR, Faden AI. (2009). Activation of metabotropic glutamate receptor 5 modulates microglial reactivity and neurotoxicity by inhibiting NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 284: 15629-15639.

- Loane DJ, Stoica BA, Bymes KR, Jeong W, Faden AI. (2013). Activation of mGluR5 and inhibition of NADPH oxidase improves functional recovery after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 30: 403-412.
- Loane DJ, Stoica BA, Tchantchou F, Kumar A, Barrett JP, Akintola T, Xue F, Conn PJ, Faden AI. (2014a). Novel mGluR5 positive allosteric modulator improves functional recovery, attenuates neurodegeneration, and alters microglial polarization after experimental traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, 11: 857-869.
- Loane DJ, Kumar A, Stoica BA, Cabatbat R, Faden AI. (2014b). Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma: association with chronic microglial activation. *J Neuropathol Exp Neurol*, 73: 14-29.
- Loane DJ, Kumar.A. (2016). Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol*, 275: 316-327.
- Lotocki G, de Rivero Vaccari JP, Alonso O, Molano JS, Nixon R, Safavi P, Dietrich WD, Bramlett HM. (2011). Oligodendrocyte vulnerability following traumatic brain injury in rats. *Neurosci Lett*, 499: 143-148.
- Lozano D, Gonzales-Portillo G.S, Acosta S, de la Pena I, Tajiri N, Kaneko Y, Borlongan CV. (2015). Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: etiology, clinical consequences, and therapeutic opportunities. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 11: 97-106.
- Lu D, Goussev A, Chen J, Pannu P, Li Y, Mahmood A, Chopp M. (2004). Atorvastatin reduces neurological deficit and increases synaptogenesis, angiogenesis, and neuronal survival in rats subjected to traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 2(1): 21-32.
- Lucke-Wold BP, Logsdon AF, Nguyen L, Eltanahay A, Turner RC, Bonasso P, Knotts C, Moeck A, Maroon JC, Bailes JE, Rosen CL. (2018). Supplements, nutrition, and alternative therapies for the treatment of traumatic brain injury. *Nutr Neurosci*, 21(2):79-91.
- Luo X, Kraus WL. (2012). On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev*, 26: 417-432.
- Lyer SS, He Q, Janczy JR, Elliott EI, Zhong Z, Olivier AK, Sadler JJ, Knepper-Adrian V, Han R, Qiao L, Eisenbarth SC, Nauseef WM, Cassel SL, Sutterwala FS. (2013). Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity*, 39: 311-323.
- Maas AI, Steyerberg EW, Marmarou A, McHugh GS, Lingsma HF, Butcher I, Lu J, Weir J, Roozenbeek B, Murray GD. (2010). IMPACT recommendations for improving the design and analysis of clinical trials in moderate to severe traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, 7: 127-134.
- Maas AI, Menon DK, Steyerberg EW, Citerio G, Lecky F, Manley GT, Hill S, Legrand V, Sorgner A, CENTER-TBI participants and investigators. (2015). Collaborative European NeuroTrauma Effectiveness Research in Traumatic Brain Injury (CENTER-TBI): a prospective longitudinal observational study. *Neurosurgery*, 76: 67-80.
- Maas A.I.R, Menon DK, Adelson PD, Andelic N, Bell MJ, Belli A, Bragge P, Brazinova A, Büki A, Chesnut R.M, Citerio G, Coburn M, Cooper D.J, Crowder A.T, Czeiter E, Czosnyka M, Diaz-Arrastia R, Dreier J.P, Duhaime A.C, Ercole A, van Essen T.A, Feigin VL, Gao G, Giacino J, Gonzalez-Lara LE, Gruen RL, Gupta D, Hartings JA, Hill S, Jiang JY, Ketharanathan N, Kompanje EJO, Lanyon L, Laureys S, Lecky F, Levin H, Lingsma HF, Maegele M, Majdan M, Manley G, Marsteller J, Mascia L, McFadyen C,

- Mondello S, Newcombe V, Palotie A, Parizel PM, Peul W, Piercy J, Polinder S, Puybasset L, Rasmussen TE, Rossaint R, Smielewski P, Söderberg J, Stanworth SJ, Stein MB, von Steinbüchel N, Stewart W, Steyerberg EW, Stocchetti N, Synnot A, Te Ao B, Tenovuo O, Theadom A, Tibboel D, Videtta W, Wang KKW, Williams WH, Wilson L, Yaffe K, InTBIR Participants and Investigators. (2017). Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol*, 16: 987-1048.
- Maki T, Liang A.C, Miyamoto N, Lo E.H, Arai K. (2013).** Mechanisms of oligodendrocyte regeneration from ventricular-subventricular zone-derived progenitor cells in white matter diseases. *Front Cell Neurosci*, 7: 275.
- Manson J, Thiemermann C, Brohi K. (2012).** Trauma alarmins as activators of damage-induced inflammation. *Br J Surg*, 99:12-20.
- Margaill I, Plotkine M, Lerouet D. (2005).** Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med*, 39(4):429-43.
- Martínez-Romero R, Martínez-Lara E, Aguilar-Quesada R, Peralta A, Oliver F.J, Siles E. (2008).** PARP-1 modulates deferoxamine-induced HIF-1 $\alpha$  accumulation through the regulation of nitric oxide and oxidative stress. *J Cell Biochem*, 104: 2248-2260.
- Martínez-Romero R, Cañuelo A, Martínez-Lara E, Javier Oliver F, Cárdenas S, Siles E. (2009).** Poly(ADP-ribose). polymerase-1 modulation of in vivo response of brain hypoxia-inducible factor-1 to hypoxia/reoxygenation is mediated by nitric oxide and factor inhibiting HIF. *J Neurochem*, 111: 150-159.
- Matsuo A, Lee GC, Terai K, Takami K, Hickey WF, McGeer EG, McGeer PL. (1997).** Unmasking of an unusual myelin basic protein epitope during the process of myelin degeneration in humans: a potential mechanism for the generation of autoantigens. *Am J Pathol*, 150: 1253-1266.
- Matsuo A, Akiguchi I, Lee GC, McGeer EG, McGeer PL, Kimura J. (1998).** Myelin degeneration in multiple system atrophy detected by unique antibodies. *Am J Pathol*, 153: 735-744.
- May P, Bock HH, Nofer JR. (2013).** Low density receptor-related protein 1 (LRP1). promotes anti-inflammatory phenotype in murine macrophages. *Cell Tissue Res*, 354: 887-889.
- Mayer CL, Huber BR, Peskind E. (2013).** Traumatic brain injury, neuroinflammation, and post-traumatic headache. *Headache*, 53:1523-1530.
- McAllister TW. (2011).** Neurobiological consequences of traumatic brain injury. *Dialogues Clin Neurosci*, 13: 287-300.
- McCarthy KD, de Vellis J. (1980).** Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*, 85: 890-902.
- McConeghy KW, Hatton J, Hughes L, Cook AM. (2012).** A review of neuroprotection pharmacology and therapies in patients with acute traumatic brain injury. *CNS Drugs*, 26: 613-636.
- McGinn MJ, Povlishock JT. (2016).** Pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurosurg Clin N Am*, 27: 397-407.
- Mckee AC, Daneshvar DH. (2015).** The neuropathology of traumatic brain injury. *Handb Clin Neurol*, 127: 45-66.

- McKinlay A, Grace RC, Horwood LJ, Fergusson DM, Ridder EM, MacFarlane MR. (2008).** Prevalence of traumatic brain injury among children, adolescents and young adults: prospective evidence from a birth cohort. *Brain Inj*, 22: 175-181.
- Mendel I, Kerlero de rosbo N, Ben-Nun A. (1995).** A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V $\beta$  expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol*, 25: 1951-1959.
- Mierzwa AJ, Marion CM, Sullivan GM, McDaniel DP, Armstrong RC. (2015).** Components of myelin damage and repair in the progression of white matter pathology after mild traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 74: 218-232.
- Miklossy J, Van der Loos H. (1991).** The long-distance effects of brain lesions: visualization of myelinated pathways in the human brain using polarizing and fluorescence microscopy. *J. Neuropathol. Exp Neurol*, 50: 1-15.
- Mimura N, Asano A. (1976).** Synergistic effect of colchicine and cytochalasin D on phagocytosis by peritoneal macrophages. *Nature*, 261: 319-321.
- Miron VE, Boyd A, Zhao JW, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, van Wijngaarden P, Wagers AJ, Williams A, Franklin RJM, Ffrench-Constant C. (2013).** M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci*, 16: 1211-1218.
- Montenigro PH, Corp DT, Stein TD, Cantu RC, Stern RA. (2015).** Chronic traumatic encephalopathy: historical origins and current perspective. *Annu Rev Clin Psychol*, 11: 309-330.
- Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, Gao J, Boothman DA. (2014).** Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 24: 15-28.
- Moretti R, Leger PL, Besson VC, Csaba Z, Pansiot J, Di Criscio L, Gentili A, Titomanlio L, Bonnin P, Baud O, Charriaut-Marlangue C. (2016).** Sildenafil, a cyclic GMP phosphodiesterase inhibitor, induces microglial modulation after focal ischemia in the neonatal mouse brain. *J Neuroinflammation*, 13: 95.
- Morganti JM, Riparip LK, and Rosi S. (2016).** Call of the Dog(ma): M1/M2 polarization is concurrent following traumatic brain injury. *PLoS One*, 11: e0148001.
- Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T. (2002).** Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care*, 8: 101-105.
- Morganti-Kossmann MC, Satgunaseelan L, Bye N, Kossmann T. (2007).** Modulation of immune response by head injury. *Injury*, 38: 1392-1400.
- Morley WA. (2018).** Environmental Subconcussive Injury, Axonal Injury, and Chronic Traumatic Encephalopathy. *Front Neurol*, 9: 166.
- Morrison B, Elkin BS, Dollé JP, Yarmush ML. (2011).** In vitro models of traumatic brain injury. *Annu Rev Biomed Eng*, 13: 91-126.
- Mortensen K, Larsson LI. (2003).** Effects of cytochalasin D on the actin cytoskeleton: association of neoformed actin aggregates with proteins involved in signaling and endocytosis. *Cell Mol Life Sci*, 60(5):1007-12.

- Muehlich S, Rehm M, Ebenau A, Goppelt-Struebe M. (2017).** Synergistic induction of CTGF by cytochalasin D and TGF $\beta$ -1 in primary human renal epithelial cells: Role of transcriptional regulators MKL1, YAP/TAZ and Smad2/3. *Cell Signal*, 29:31-40.
- Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA, Sofroniew MV. (2006).** Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain*, 129: 2761-2772.
- Nakayama N, Okumura A, Shinoda J, Yasokawa YT, Miwa K, Yoshimura SI, Iwama T. (2006).** Evidence for white matter disruption in traumatic brain injury without macroscopic lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 77: 850–855.
- Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ. (2009).** Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain*, 132: 288-295.
- Ni M, Aschner M. (2010).** Neonatal rat primary microglia: isolation, culturing, and selected applications. *Curr Protoc Toxicol*, Chapter 12: Unit 12.17.
- Nizamutdinov D, Shapiro LA. (2017).** Overview of traumatic brain injury: An immunological context. *Brain Sci*, 7: pii: E11.
- Norton WT, Poduslo SE. (1973).** Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J Neurochem*, 21: 749-757.
- Oliver F.J, Ménessier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la Rubia G, Stoclet J.C, de Murcia G. (1999).** Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J*, 18: 4446-4454.
- Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. (2016).** Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*, 173: 649–665.
- Pang Y, Fan LW, Tien LT, Dai XM, Zheng B, Cai Z, Lin RCS, Bhatt A. (2013).** Differential roles of astrocyte and microglia in supporting oligodendrocyte development and myelination in vitro. *Brain Behav*, 3(5): 503–514.
- Papa S, Caron I, Erba E, Panini N, De Paola M, Mariani A, Colombo C, Ferrari R, Pozzer D, Zanier ER, Pischiutta F, Lucchetti J, Bassi A, Valentini G, Simonutti G, Rossi F, Moscatelli D, Forloni G, Veglianesi P. (2016).** Early modulation of pro-inflammatory microglia by minocycline loaded nanoparticles confers long lasting protection after spinal cord injury. *Biomaterials*, 75: 13-24.
- Pascal JM, Ellenberger T. (2015).** The rise and fall of poly(ADP-ribose): An enzymatic perspective. *DNA Repair*, 32: 10-16.
- Pearn ML, Niesman IR, Egawa J, Sawada A, Almenar-Queralt A, Shah SB, Duckworth JL, Head B.P. (2017).** Pathophysiology associated with traumatic brain injury: Current treatments and potential novel therapeutics. *Cell Mol Neurobiol*, 37: 571-585.
- Pearson VL, Rothwell NJ, Toulmond S. (1999).** Excitotoxic brain damage in the rat induces interleukin-1beta protein in microglia and astrocytes: correlation with the progression of cell death. *Glia*, 25: 311-323.
- Pekny M, Pekna M. (2014).** Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev*, 94: 1077-1098.
- Pinteaux-Jones F, Sevastou IG, Fry VA, Heales S, Baker D, Pocock JM. (2008).** Myelin-induced microglial neurotoxicity can be controlled by microglial metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem*, 106: 442-454.

- Poliani PL, Wang Y, Fontana E, Robinette ML, Yamanishi Y, Gilfillan S, Colonna M. (2015). TREM2 sustains microglial expansion during aging and response to demyelination *J Clin Invest*, 125(5):2161-70.
- Ponath G, Ramanan S, Mubarak M, Housley W, Lee S, Sahinkaya FR, Vortmeyer A, Raine CS, Pitt D. (2017). Myelin phagocytosis by astrocytes after myelin damage promotes lesion pathology. *Brain*, 140: 399-413.
- Prins M, Greco T, Alexander D, Giza CC. (2013). The pathophysiology of traumatic brain injury at a glance. *Dis Model Mech*, 6: 1307-1315.
- Pu, H., Guo, Y., Zhang, W., Huang, L., Wang, G., Liou, A. K., Zhang, J., Zhang, P., Leak, R. K., Wang, Y., Chen, J., and 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
- Ramlackhansingh AF, Brooks DJ, Greenwood RJ, Bose SK, Turkheimer FE, Kinnunen KM, Gentleman S, Heckemann RA, Gunanayagam K, Gelosa G, Sharp DJ. (2011). Inflammation after trauma: Microglial activation and traumatic brain injury. *Ann Neurol*, 70: 374-383.
- Ransohoff RM. (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci*, 19: 987-991.
- Ray Chaudhuri A, Nussenzweig A. (2017). The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18: 610-621.
- Reeves TM, Phillips LL, Povlishock JT. (2005). Myelinated and unmyelinated axons of the corpus callosum differ in vulnerability and functional recovery following traumatic brain injury. *Exp Neurol*, 196: 126-137.
- Rhodes J. (2011). Peripheral immune cells in the pathology of traumatic brain injury. *Curr Opin Crit Care*, 17: 122-130.
- Rich MC, Keene CN, Neher MD, Johnson K, Yu ZX, Ganivet A, Holers V.M, Stahel P.F. (2016). Site-targeted complement inhibition by a complement receptor 2-conjugated inhibitor (mTT30). ameliorates post-injury neuropathology in mouse brains. *Neurosci Lett*, 617: 188-194.
- Riffell JL, Lord CJ, Ashworth A. (2012). Tankyrase-targeted therapeutics: expanding opportunities in the PARP family. *Nat Rev Drug Discov*, 11: 923-936.
- Rinaldi M, Thomas L, Mathieu P, Carabias P, Troncoso MF, Pasquini JM, Rabinovich GA, Pasquini LA. (2016). Galectin-1 circumvents lysolecithin-induced demyelination through the modulation of microglial polarization/phagocytosis and oligodendroglial differentiation. *Neurobiol Dis*, 96: 127-143.
- Robinson S, Miller RH. (1999). Contact with central nervous system myelin inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Dev Biol*, 216: 359-368.
- Russo MV, McGavern DB. (2016). Inflammatory neuroprotection following traumatic brain injury. *Science*, 353: 783-785.
- Saber M, Kokiko-Cochran O, Puntambekar SS, Lathia JD, Lamb BT. (2017). Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 Deficiency Alters Acute Macrophage Distribution and Improves Recovery after Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*, 34(2):423-435.

- Satchell MA, Zhang X, Kochanek PM, Dixon CE, Jenkins LW, Melick J, Szabó C, Clark RS. (2003). A dual role for poly-ADP-ribosylation in spatial memory acquisition after traumatic brain injury in mice involving NAD<sup>+</sup> depletion and ribosylation of 14-3-3gamma. *J Neurochem*, 85: 697-708.
- Scheiblich H, Bicker G. (2017). Regulation of Microglial phagocytosis by RhoA/ROCK-Inhibiting Drugs. *Cell Mol Neurobiol*, 37(3):461-473.
- Schmitt S, Castelvetti LC, Simons M. (2015). Metabolism and functions of lipids in myelin. *Biochim Biophys Acta*, 1851: 999-1005.
- Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7: 517-528.
- Schuhwerk H, Atteya R, Siniuk K, Wang ZQ. (2017). PARPing for balance in the homeostasis of poly(ADP-ribosylation). *Semin Cell Dev Biol*, 63: 81-91.
- Semple BD, Bye N, Rancan M, Ziebell JM, Morgani-Kossmann MC. (2010). Role of CCL2 (MCP-1) in traumatic brain injury (TBI): evidence from severe TBI patients and CCL2<sup>-/-</sup> mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30: 769-782.
- Sheads LD, Eby MJ, Sampugna J. (1977). Myelin subfractions isolated from mouse brain. Studies of normal mice during development, quaking mutants, and three brain regions. *J Neurobiol*, 8: 67-89.
- Shi H, Hu X, Leak RK, Shi Y, An C, Suenaga J, Chen J, Gao Y. (2015). Demyelination as a rational therapeutic target for ischemic or traumatic brain injury. *Exp Neurol*, 272: 17-25.
- Siddiqui TA, Lively S, Schlichter LC. (2016). Complex molecular and functional outcomes of single versus sequential cytokine stimulation of rat microglia. *J Neuroinflammation*, 13: 66.
- Sierra A, Abiega O, Shahraz A, Neumann H. (2013). Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front Cell Neurosci*, 7: 6.
- Simon DW, McGeachy MJ, Bayir H, Clark RSB, Loane DJ, Kochanek PM. (2017). The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol*, 13: 572.
- Simons M, Nave KA. (2015). Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*, 8: a020479.
- Siopi E, Cho AH, Homsí S, Croci N, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. (2011). Minocycline restores sAPP $\alpha$  levels and reduces the late histopathological consequences of traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma*, 28(10): 2135-43.
- Siopi E, Llufríu-Dabén G, Cho AH, Vidal-Lletjós S, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. (2013). Etazolate, an  $\alpha$ -secretase activator, reduces neuroinflammation and offers persistent neuroprotection following traumatic brain injury in mice. *Neuropharmacology*, 67:183-92.
- Smith DH, Soares HD, Pierce JS, Perlman KG, Saatman KE, Meaney DF, Dixon CE, McIntosh TK. (1995). A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *J Neurotrauma*, 12(2): 169-78.
- Smith DH, Chen XH, Pierce JE, Wolf JA, Trojanowski JQ, Graham DI, McIntosh TK. (1997). Progressive atrophy and neuron death for one year following brain trauma in the rat. *J Neurotrauma*, 14: 715-727.

- Smith C, Gentleman SM, Leclercq PD, Murray LS, Griffin WS, Graham DI, Nicoll JA. (2013). The neuroinflammatory response in humans after traumatic brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 39: 654-666.
- Sodhi RK, Singh N, Jaggi AS. (2010). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and its therapeutic implications. *Vascul Pharmacol*, 53: 77-87
- Solé-Domènech S, Cruz DL, Capetillo-Zarate E, Maxfield FR. (2016). The endocytic pathway in microglia during health, aging and Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*, 32:89-103.
- Song G.J, Suk K. (2017). Pharmacological modulation of functional phenotype of microglia in neurodegenerative diseases. *Front. Aging Neurosci*, 9: 139.
- Sousa C, Biber K, Michelucci A. (2017). Cellular and molecular characterization of microglia: A unique immune cell population. *Front Immunol*, 8: 198.
- Sriram CS, Jangra A, Kasala ER, Bodduluru LN, Bezbaruah BK. (2014). Targeting poly(ADP-ribose)polymerase1 in neurological diseases: A promising trove for new pharmacological interventions to enter clinical translation. *Neurochem Int*, 76: 70-81.
- Sriram CS, Jangra A, Bezbaruah BK, V AK, Sykam S. (2016). Alternative mechanisms of inhibiting activity of poly (ADP-ribose) polymerase-1. *Front Biosci (Schol Ed)*, 8: 123-128.
- Stein DG, Geddes RI, Sribnick EA. (2015). Recent developments in clinical trials for the treatment of traumatic brain injury. *Handb Clin Neurol*, 127: 433-451.
- Stocchetti N, Carbonara M, Citerio G, Ercole A, Skrifvars MB, Smielewski P, Zoerle T, Menon DK. (2017). Severe traumatic brain injury: targeted management in the intensive care unit. *Lancet Neurol*, 16: 452-464.
- Stoica BA, Loane DJ, Zhao Z, Kabadi SV, Hanscom M, Byrnes KR, Faden AI. (2014). PARP-1 inhibition attenuates neuronal loss, microglia activation and neurological deficits after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 31: 758-772.
- Su Y, Fan W, Ma Z, Wen X, Wang W, Wu Q, Huang H. (2014). Taurine improves functional and histological outcomes and reduces inflammation in traumatic brain injury. *Neuroscience*, 266:56-65.
- Sun X, Wang X, Chen T, Li T, Cao K, Lu A, Chen Y, Sun D, Luo J, Fan J, Young W, Ren Y. (2010). Myelin activates FAK/Akt/NF-kappaB pathways and provokes CR3 dependent inflammatory response in murine system. *PLoS One*, 5: e9380.
- Susarla BT, Villapol S, Yi JH, Geller HM, Symes AJ. (2014). Temporal patterns of cortical proliferation of glial cell populations after traumatic brain injury in mice. *ASN Neuro*, 6: 159-170.
- Syed YA, Baer AS, Lubec G, Hoeger H, Widhalm G, Kotter MR. (2008). Inhibition of oligodendrocyte precursor cell differentiation by myelin-associated proteins. *Neurosurg Focus*, 24: E5.
- Taib T, Leconte C, Van Steenwinckel J, Cho AH, Palmier B, Torsello E, Lai Kuen R, Onyeomah S, Ecomard K, Benedetto C, Coqueran B, Novak AC, Deou E, Plotkine M, Gressens P, Marchand-Leroux C, Besson VC. (2017). Neuroinflammation, myelin and behavior: Temporal patterns following mild traumatic brain injury in mice. *PLoS One*, 12(9): e0184811.

- Takahashi K, Rochford CD, Neumann H. (2005). Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J Exp Med*, 201(4): 647-57.
- Takahashi K, Prinz M, Stagi M, Chechneva O, Neumann H.(2007). TREM2-transduced myeloid precursors mediate nervous tissue debris clearance and facilitate recovery in an animal model of multiple sclerosis. *PLoS Med*, 4(4): e124.
- Talsky A, Pacione LR, Shaw T, Wasserman L, Lenny AM, Verma A, Hurwitz G, Waxman R, Morgan A, Bhalerao S, FRCPC. (2011). Pharmacological interventions for traumatic brain injury. *B C Med J*, 53(1): 26-31.
- Tchantchou F, Zhang Y. (2013). Selective inhibition of alpha/beta-hydrolase domain 6 attenuates neurodegeneration, alleviates blood brain barrier breakdown, and improves functional recovery in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 30(7): 565-79.
- Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Leker RR. (2012). Combination of vascular endothelial and fibroblast growth factor 2 for induction of neurogenesis and angiogenesis after traumatic brain injury. *J Mol Neurosci*, 47(1): 166-72.
- Truettner JS, Bramlett HM, Dietrich WD. (2017). Posttraumatic therapeutic hypothermia alters microglial and macrophage polarization toward a beneficial phenotype. *J Cereb Blood Flow Metab*, 37(8): 2952-2962.
- Turtzo LC, Lescher J, Janes L, Dean DD, Budde MD, Frank JA. (2014). Macrophagic and microglial responses after focal traumatic brain injury in the female rat. *J Neuroinflammation*, 11: 82.
- Ueda, M., Inaba, T., Nito, C., Kamiya, N., and Katayama, Y. (2013) Therapeutic impact of eicosapentaenoic acid on ischemic brain damage following transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* **1519**, 95-104.
- Van den bergh WM. (2016). Pharmacotherapy of traumatic brain injury. *Mol Cell Neurosci*, 66(Pt B): 114-22..
- Vargas ME, Barres BA. (2007). Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu Rev Neurosci*, 30: 153-79.
- VA/DoD. (2016). Clinical practice guidelines for the management of concussion-mild traumatic brain injury (mTBI). Version 2.0-2016. Department of Veterans Affairs/Department of Defense.
- Veto S, Acs P, Bauer J, Lassmann H, Berente Z, Setalo G Jr, Borgulya G, Sumegi B, Komoly S, Gallyas F Jr, Illes Z. (2010). Inhibiting poly(ADP-ribose). polymerase: a potential therapy against oligodendrocyte death. *Brain*, 133(Pt 3): 822-34
- Virág L, Szabó C. (2002). The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev*, 54(3): 375-429.
- Viviani B, Boraso M, Marchetti N, Marinovich M. (2014). Perspectives on neuroinflammation and excitotoxicity: a neurotoxic conspiracy? *Neurotoxicology*, 43: 10-20.
- Vos PE, Jacobs B, Andriessen TM, Lamers KJ, Borm GF, Beems T, Edwards M, Rosmalen CF, Vissers JL. (2010). GFAP and DS100B are biomarkers of traumatic brain injury: an observational cohort study. *Neurology*, 75(20): 1786-93.
- Vuong B, Hogan-Cann AD, Alano CC, Stevenson M, Chan WY, Anderson CM, Swanson RA, Kauppinen TM. (2015). NF- $\kappa$ B transcriptional activation by TNF $\alpha$  requires

- phospholipase C, extracellular signal-regulated kinase 2 and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Neuroinflammation*, 12: 229.
- Walko TD 3rd, Bola RA, Hong JD, Au AK, Bell MJ, Kochanek PM, Clark RS, Aneja RK.** (2014). Cerebrospinal fluid mitochondrial DNA: a novel DAMP in pediatric traumatic brain injury. *Shock*, 41(6): 499-503.
- Wang Y, Dawson VL, Dawson TM.** (2009). Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: A key event in parthanatos. *Exp Neurol*, 218: 193-202.
- Wang G, Zhang J, Hu X, Zhang L, Mao L, Jiang X, Liou AK, Leak RK, Gao Y, Chen J.** (2013). Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33(12): 1864-74.
- Wang G, Shi Y, Jiang X, Leak RK, Hu X, Wu Y, Pu H, Li WW, Tang B, Wang Y, Gao Y, Zheng P, Bennett MV, Chen J.** (2015a). HDAC inhibition prevents white matter injury by modulating microglia/macrophage polarization through the GSK3 $\beta$ /PTEN/Akt axis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(9): 2853-8.
- Wang X, Cao K, Sun X, Chen Y, Duan Z, Sun L, Guo L, Bai P, Sun D, Fan J, He X, Young W, Ren Y.** (2015b). Macrophages in spinal cord injury: phenotypic and functional change from exposure to myelin debris. *Glia*, 63(4): 635-51.
- Wang Y, Liu G, Hong D, Chen F, Ji X, Cao G.** (2016). White matter injury in ischemic stroke. *Prog Neurobiol*, 141: 45-60.
- Wang L, Yang Y, Chen S, Ge M, He J, Yang Z, Lin P, Wu X.** (2018). White matter integrity correlates with residual consciousness in patients with severe brain injury. *Brain Imaging Behav*, doi: 10.1007/s11682-018-9832-1.
- Wen L, Xu J, Zhan T, Wang H, Huang X, Liu W, Yang X, Zhan Z.** (2014). The occurrence of diffuse axonal injury in the brain: associated with the accumulation and clearance of myelin debris. *Neural Regen Res*, 9(21): 1902–1906.
- Werner C, Engelhard K.** (2007). Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*, 99(1): 4-9.
- Whalen MJ, Clark RS, Dixon CE, Robichaud P, Marion DW, Vagni V, Graham SH, Virag L, Hasko G, Stachlewitz R, Szabo C, Kochanek PM.** (1999). Reduction of cognitive and motor deficits after traumatic brain injury in mice deficient in poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19(8): 835-42.
- Wiendl H, Elger C, Förstl H, Hartung HP, Oertel W, Reichmann H, Schwab S.** (2015). Gaps between aims and achievements in therapeutic modification of neuronal damage ("Neuroprotection"). *Neurotherapeutics*, 12(2): 449-54.
- Witting A, Möller T.** (2011). Microglia cell culture: a primer for the novice. *Methods Mol Biol*, 758: 49-66.
- Woodcock T, Morganti-Kossmann MC.** (2013). The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Front Neurol*, 4: 18.
- Xiong Y, Mahmood A, Chopp M.**(2013). Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci*, 14(2): 128-42.
- Xu H, Wang Z, Li J, Wu H, Peng Y, Fan L, Chen J, Gu C, Yan F, Wang L, Chen G.** (2017). The Polarization States of Microglia in TBI: A New Paradigm for Pharmacological Intervention *Neural Plast*, 2017: 5405104.

- Xu J, Wang HWon SJ, Basu J, Kapfhamer D, Swanson RA. (2016). Microglial activation induced by the alarmin S100B is regulated by poly(ADP-ribose). polymerase-1. *Glia*, 64(11): 1869-78.
- Yan EB, Satgunaseelan L, Paul E, Bye N, Nguyen P, Agyapomaa D, Kossmann T, Rosenfeld JV, Morganti-Kossmann MC. (2014). Post-traumatic hypoxia is associated with prolonged cerebral cytokine production, higher serum biomarker levels, and poor outcome in patients with severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 31(7):618-29.
- Yang XF, Wang H, Wen L. (2011). From myelin debris to inflammatory responses: a vicious circle in diffuse axonal injury. *Med Hypotheses*, 77(1): 60-2.
- Yang L, Kan EM, Lu J, Wu C, Ling EA. (2014). Expression of 2',3' – cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase 5 CNPase and its roles in activated microglia in vivo and in vitro, *journal of neuroinflammation*. *J Neuroinflammation*, 11: 148.
- Yang Y, Salayandia VM, Thompson J F, Yang L Y, Estrada E Y, Yang Y. (2015). Attenuation of acute stroke injury in rat brain by minocycline promotes blood–brain barrier remodeling and alternative microglia/macrophage activation during recovery. *J Neuroinflammation*, 12: 26.
- Yatsiv I, Morganti-Kossmann MC, Perez D, Dinarello CA, Novick D, Rubinstein M, Otto VI, Rancan M, Kossmann T, Redaelli CA, Trentz O, Shohami E, Stahel PF. (2002). Elevated intracranial IL-18 in humans and mice after traumatic brain injury and evidence of neuroprotective effects of IL-18-binding protein after experimental closed head injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22(8): 971-8.
- Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*, 297(5579): 259-63.
- Zhang K, Sejnowski TJ. (2000). A universal scaling law between gray matter and white matter of cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(10):5621-6.
- Zhang Z, Zhang ZY, Wu Y, Schluesener HJ. (2012). Lesional accumulation of CD163+ macrophage/microglia in rat traumatic brain injury. *Brain Res*, 1461: 102-10.
- Zhao S, Yang J, Wang L, Peng S, Yin J, Jia L, Yang X, Yuan Z, Wu C. (2016). NF-κB Upregulates Type 5 Phosphodiesterase in N9 Microglial Cells: Inhibition by Sildenafil and Yonkenafil. *Mol Neurobiol*, 53(4): 2647-58.
- Zhu K, Sun J, Kang Z, Zou Z, Wu G, Wang J. (2017). Electroacupuncture promotes remyelination after cuprizone treatment by enhancing myelin debris clearance. *Front Neurosci*, 10: 613.
- Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. (2010). Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, 7(1): 22-30.

## RÉSUMÉ

Le traumatisme crânien (TC), pour lequel il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement pharmacologique protecteur, est un problème majeur de santé publique. Le TC induit une neuro-inflammation et des lésions de la substance blanche (SB) qui sont responsables des désordres cognitifs et émotionnels observés chez les patients traumatisés crâniens. Il est maintenant reconnu que les lésions de la SB progressent dans le temps et que la neuro-inflammation pourrait jouer un rôle important dans cette évolution. De plus, l'activation microgliale semble jouer un rôle primordial dans la réponse neuro-inflammatoire post-TC. Selon son environnement, la microglie activée peut adopter, schématiquement, soit un phénotype pro-inflammatoire, aussi appelé M1, soit un phénotype anti-inflammatoire/immunorégulateur, appelé M2. Les données de la littérature et du laboratoire montrent que le TC entraîne (1) l'apparition d'une population mixte de microglies M1 et M2, et (2) que cette activation microgliale précède le processus de démyélinisation à l'origine de débris de myéline. Des études suggèrent que ces débris de myéline pourraient augmenter en retour la réponse inflammatoire en favorisant l'activation microgliale en phénotype M1, créant ainsi un cercle vicieux. Cependant, des travaux remettent en cause cette hypothèse.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail a été d'étudier *in vitro*, sur des cultures primaires de microglies de souris, l'effet des débris de myéline dans l'orientation du phénotype microglial en présence de divers stimuli inflammatoires. En effet, la compréhension des mécanismes à l'origine de ces changements phénotypiques pourrait permettre d'identifier des cibles potentielles pour le traitement du TC.

Nos études ont montré (1) qu'en présence de stimuli pro-inflammatoires (lipopolysaccharides ou  $TNF\alpha$ ), les débris de myéline non seulement diminuent le phénotype M1, mais favorisent également le phénotype M2, et (2) que, dans des conditions anti-inflammatoires (IL-4), ils augmentent le phénotype M2. Ces résultats suggèrent donc que les débris de myéline, formés à la suite d'un TC, pourraient favoriser le phénotype M2.

Les travaux du laboratoire ont contribué à montrer que l'hyperactivation de la poly(ADP-ribose)polymérase (PARP) représente un mécanisme délétère en participant à la mort neuronale et la neuro-inflammation post-traumatiques. Dans le but d'évaluer si l'inhibition de cette enzyme pouvait potentialiser le phénotype M2, nous avons étudié l'effet du PJ34. Ce dernier n'a pas modifié l'effet protecteur des débris de myéline dans un contexte pro-inflammatoire ( $TNF\alpha$ ), ce qui est en accord avec des données obtenues *in vivo* au laboratoire.

Une des fonctions de la microglie étant d'éliminer les débris cellulaires par phagocytose, un phénomène pouvant conférer des propriétés anti-inflammatoires aux microglies, nous avons étudié l'effet de l'inhibition de la phagocytose, par la cytochalasine D. Nos données montrent que cela conduit à une réduction de l'effet bénéfique des débris de myéline que ce soit en condition pro- ou anti-inflammatoire. Par conséquent, l'effet anti-inflammatoire des débris de myéline semble lié, au moins en partie, à leur phagocytose par la microglie.

En conclusion, nos travaux ont permis d'identifier les débris de myéline comme de potentiels composants endogènes anti-inflammatoires à la suite d'un TC. De futurs travaux devront identifier quelle(s) voie(s) d'endocytose est(sont) plus particulièrement impliquée(s), et/ou d'autre(s) mécanisme(s), afin de développer des stratégies pouvant promouvoir le phénotype M2 protecteur, et ainsi réduire les dommages post-traumatiques.

### **MOTS-CLÉS:**

Traumatisme crânien, neuro-inflammation, phénotypes microgliaux, démyélinisation, débris de myéline, poly(ADP-ribose)polymérase, phagocytose