

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Ecole Doctorale 524 : Biologie-Santé

Faculté de Médecine et Pharmacie

IFR 145, EA3842 "Homéostasie cellulaire et pathologies"

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Disciplines : Biologie-Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Vincent Sarrazy

Le 9 décembre 2010

Cellules fibrogéniques impliquées dans la réparation tissulaire (comparaison foie / système nerveux central) : rôles des MMPs

Thèse dirigée par le **Pr. Alexis Desmoulière**

Jury

Dr. Boris Hinz Université de Toronto, Ontario, Canada	Rapporteur
Pr. Daniel Hartmann Faculté de Pharmacie, Université de Lyon I, France	Rapporteur
Pr. Franck Sturtz Université de Limoges, France	Examineur
Pr. Marie-Odile Jauberteau Université de Limoges, France	Examineur
Pr. Vincent Lagente, Université de Rennes I, France	Examineur
Pr. Alexis Desmoulière Université de Limoges, France	Directeur de thèse
Dr. Serge Battu Université de Limoges, France	Membre invité

Remerciements

Je remercie le Pr. Alexis Desmoulière qui m'a encadré de la meilleure façon qu'on puisse le faire et qui m'a permis d'affiner mon esprit scientifique. Je le remercie de m'avoir enseigné la rigueur nécessaire à la réalisation de travaux scientifiques de grande qualité, ainsi que pour tous les liens avec des collaborateurs internationaux qu'il m'a permis d'avoir.

Je remercie le Pr. Marie-Odile Jauberteau de m'avoir accueilli au sein de l'EA 3842 "Homéostasie cellulaire et pathologie" afin que je puisse réaliser ces travaux et pour sa participation au jury. Je la remercie pour tout ce qu'elle a fait pour au cours de mon M1 et ensuite de mon doctorat.

Je remercie le Pr. Franck Sturtz pour sa participation au jury.

Je remercie le Pr. Vincent Lagente pour sa participation au jury.

Je remercie le Pr. Daniel Hartmann pour sa participation au jury et pour avoir participé à l'amélioration de ce travail en sa qualité de rapporteur.

Je remercie le Dr. Boris Hinz pour sa participation au jury et pour avoir participé à l'amélioration de ce travail en sa qualité de rapporteur. De plus, je le remercie de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire pour que je puisse y effectuer mon post-doc.

Je remercie Serge Battu et sa rage de publier, cela a été un plaisir de collaborer avec lui. Je le remercie aussi pour sa participation au jury.

Je remercie tous les autres membres de l'EA3842 qui m'ont consacré un peu (ou beaucoup) de leur temps. Tout particulièrement Fabrice Lalloué pour son soutien, sa grande motivation qu'il sait faire partager et tout ce qu'il m'a permis d'acquérir au cours de mon M1 et de mon doctorat, merci aussi à Gaëlle et Barbara qui m'ont toujours soutenu, pour leur grande qualité scientifique et surtout leur amitié. Je remercie, Mathilde et Marie-Claude pour les longues discussions « philosophiques » et les franches parties de rigolades. Je remercie tous les autres doctorants et post-doc de l'EA3842 pour le savoir qu'ils ont bien voulu partager avec moi.

Mention spéciale à Nelly, James, Laurent, Mohammad « Moe » pour toute l'aide qu'il m'ont apporté.

Mention spéciale à Marie-claude et Barbara pour leur aide précieuse pour la cytométrie en flux.

Mention spéciale à Nicolas qui pour l'aide qu'il a apporté à ce travail notamment pour les tests comportementaux.

Mention spéciale à Anne-Laure qui a toujours été présente et pour sa grande qualité scientifique.

Mention spéciale au fractionnement par couplage flux/force de sédimentation qui nous a permis d'enrichir ce travail de façon significative et merci à tous les dépositaires de la technique au sein de l'EA3842.

Je remercie tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail, sans eux rien n'aurait été possible.

Enfin, je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien.

Mention spéciale à celle qui accompagne ma vie depuis plus de 6 ans pour son soutien sans faille et tout le reste.

Je remercie

l'Université de Limoges



et la

Région Limousin



qui m'ont soutenu financièrement pendant la durée de cette Thèse en
m'attribuant une bourse régionale

Résumé

Cellules fibrogéniques impliquées dans la réparation tissulaire (comparaison foie / système nerveux central), rôles des MMPs.

La fibrogenèse est un mécanisme impliqué dans la réparation tissulaire pouvant entraîner des conséquences délétères lorsqu'il n'est plus contrôlé. Le développement d'une fibrose est caractérisé par une accumulation de matrice extracellulaire (MEC). Dans la plupart des organes, les cellules fibrogéniques impliquées dans ce dépôt de MEC sont les fibroblastes et les myofibroblastes alors que, dans le système nerveux central (SNC), ce sont majoritairement les astrocytes. Au cours de ce travail de thèse, nous avons réalisé une comparaison entre les cellules fibrogéniques impliquées dans la fibrose hépatique et celles impliquées dans la « fibrose » du SNC appelée cicatrice gliale. Dans la fibrose hépatique, les cellules fibrogéniques impliquées dérivent des cellules étoilées du foie (CEF) et/ou des fibroblastes portaux (FP). Nous avons utilisé un modèle original de culture de tranches de foies de précision (TFP) pour étudier deux pathologies différentes, la cirrhose alcoolique et la cholestase biliaire qui impliquent les CEF et les FP respectivement, et nous avons montré que, dans les TFP en culture, les CEFs peuvent réacquérir un phénotype quiescent alors que les FP meurent par apoptose. Parallèlement, nous avons réalisé une étude protéomique pour caractériser la réaction stromale des cholangiocarcinomes qui implique principalement les FP, et nous avons montré notamment que la périostine pouvait constituer un marqueur intéressant de la différenciation myofibroblastique. Afin de pouvoir comparer les phénomènes de fibroses hépatiques et la formation de la cicatrice gliale, nous avons développé des cultures d'astrocytes à partir de cortex de rats nouveau-nés que nous avons traités avec du LPS pour mimer l'activation observée *in vivo*. Nous avons étudié les interactions entre la voie pro-apoptotique Fas et le système des métalloprotéases matricielles (MMPs). Lors de la stimulation de la voie Fas, contrairement à ce qui est habituellement démontré dans d'autres types cellulaires, nous avons observé une augmentation de la prolifération astrocytaire sans effet sur l'apoptose, de façon similaire à ce qui était observé après une stimulation avec le LPS. Parallèlement, une diminution de l'expression de la MMP-9 était détectée. De plus, nous avons séparé différentes populations astrocytaires grâce à une technique originale de fractionnement par couplage flux/force (FFF), et nous avons montré qu'une sous-population astrocytaire est capable de co-exprimer la GFAP et l'actine α -musculaire lisse qui est le marqueur typique de la différenciation myofibroblastique. Parallèlement, nous avons développé un modèle *in vivo* de lésion corticale chez le rat pour corrélérer nos observations *in vitro* et *in vivo*, et pour étudier également l'effet de différents facteurs neuroprotecteurs. Nous avons analysé la récupération fonctionnelle des animaux après lésion grâce à des tests comportementaux (test de marche sur une poutre et test de la piscine de Morris). En dernier lieu, nous avons étudié les interactions de la voie Fas et de la voie TLR4 ainsi que le système des MMPs dans les glioblastomes. Nous avons montré que les cellules de glioblastomes prolifèrent après activation des voies Fas ou TLR4, cet effet étant annulé lors de l'activation concomitante des deux voies. De plus, nous avons observé que l'expression de la MMP-9 varie de façon parallèle avec la prolifération. Ces résultats nous montrent que les mécanismes impliqués dans la réparation tissulaire ou la formation de la réaction stromale dans les tumeurs épithéliales présentent des similitudes. De plus, la comparaison des mécanismes impliqués dans la réparation tissulaire au sein d'organes aussi différents que le foie et le SNC peut aider à la compréhension des mécanismes d'activation cellulaire et au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Mots clés : Cellule fibrogénique, fibroblaste, fibrose hépatique, cicatrice gliale, astrocyte, stroma tumoral, cholangiocarcinome, glioblastome.

Abstract

Fibrogenic cells involved in tissue repair (comparison between liver and central nervous system) : roles of MMPs

Fibrogenesis is a mechanism involved in tissue repair which could induce deleterious consequences if it becomes uncontrolled. Fibrosis development is characterized by a deposition of extracellular matrix (ECM). In most organs, fibrogenic cells involved in ECM deposition are fibroblasts and myofibroblasts. In the case of the central nervous system (CNS), the secretion of ECM is mostly performed by astrocytes. In this thesis, we conducted a comparison between the cells involved in liver fibrosis and those involved in the CNS "fibrosis", called glial scar. In hepatic fibrosis, fibrogenic cells involved derive from hepatic stellate cells (HSC) and / or portal fibroblasts (PF). We used an original model of precision cut liver slices (PCLS) to study two different diseases, alcoholic cirrhosis and biliary cholestasis which involved HSC and PF respectively, and we showed that, in cultured PCLS, HSC can reacquire a quiescent phenotype when PFs die by apoptosis. In parallel, we performed a proteomic study to characterize the stromal reaction of cholangiocarcinomas which mainly involves PF, and we have shown in particular that periostin could be an interesting marker for myofibroblastic differentiation. To compare the phenomena of liver fibrosis and the formation of the glial scar, we have developed a culture model of astrocytes derived from cortex of newborn rats that we have treated with Lipopolysaccharide (LPS) to mimic *in vivo* activation. We have studied the interactions between the pro-apoptotic Fas pathway and the matrix metalloproteinases (MMPs) system. After Fas pathway stimulation, in contrast with what is usually shown in other cell types, we observed an increase of astrocyte proliferation without effect on apoptosis, similarly to the effects observed after LPS treatment. In parallel, a decrease of the MMP-9 expression was detected. In addition, we separated different populations of astrocytes using an original technique of sedimentation field flow fractionation (SdFFF), and we showed that a subpopulation of astrocytes is able to co-express GFAP and α -smooth muscle actin which is the typical marker for myofibroblastic differentiation. In parallel, we developed an *in vivo* model of cortical lesion in the rat to correlate our observations *in vitro* and *in vivo* and to study the neuroprotective effects of different factors. We studied in injured animals, the functional recovery using behavioral studies (beam walking task and Morris water maze). Finally, we studied the interactions of the Fas and TLR4 pathways and the MMP system in glioblastoma cell lines. We showed that the glioblastoma cells proliferate after Fas or TLR4 activations, this effect disappearing after the concomitant activation of the two pathways. In addition, we observed that expression of the MMP-9 is modulated in parallel with cell proliferation. These results show that the mechanisms implied in tissue repair and in the formation of the stromal reaction in tumors present similarities. Moreover, the comparison of the mechanisms involved in tissue repair of various organs as different as the liver and the CNS, may help in understanding of cell activation mechanisms and for the development of new therapeutic strategies.

Key words : Fibrogenic cell, fibroblast, liver fibrosis, glial scar, astrocyte, tumor stroma, cholangiocarcinoma, glioblastoma.

Abréviations

2-D	Bi-dimensionnelle
2-DE	Electrophorèse Bi-dimensionnelle
3D	Tri-dimensionnelle
ACN	ACétoNitrile
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AIF	Apoptosis Inducing Factor
ANOVA	Analyse de Variance
α -ML	α -Musculaire Lisse
Apaf-1	Apoptotic Protease-Activating Factor-1
ASK1	Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
ATP	Adénosine TriPhosphate
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
CASPASES	Cystein requiring ASPartate activity proteASEs
CCC	Contusion Corticale Contrôlée
CD95	Cluster of Differentiation 95
CEF	Cellule Etoilée du Foie
Cy	Cyanine
DD	Death Domain
DIA	Differential In-gel Analysis
DIGE	Fluorescence Difference Gel Electrophoresis
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DR4	Death Receptor 4
DR5	Death Receptor 5
DTT	DiThioTreithol
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FA	Formic Acid
FADD	Fas Associated Death Domain
FFF	Fractionnement par couplage Flux/Force
Fib	Fibronectine
FP	Fibroblastes Portaux
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
HSC	Hepatic Stellate Cell
IAPs	Inhibitor of Apoptosis Proteins
ICV	Intra-Cérébro Ventriculaire
IDA	Acquisition Dépendante de l'Information
IEF	IsoElectroFocusing
JNK	c-Jun-N-terminal Kinase
LPS	LypoPolySaccharide
LRP	Lipoprotein receptor Related Protein
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MMPs	Matrix Metallo Proteinases Inhibitors

MMPs	Matrix Metallo Proteinases
MS	Spectrométrie de Masse
MT-MMPs	Membrane Type-MMPs
NF-KB	Nuclear Factor Kappa B
PAGE	PolyAcrylamid Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCLS	Precision Cut Liver Slices
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFr	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PFA	ParaFormAldéhyde
RAIDD	RIP-Associated ICH-1/CED-3-homologous protein with a Death Domain
RIP-1	Receptor Interacting Protein-1
SMA	Smooth Muscle Actin
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SNC	Système Nerveux Central
TGF	Transforming Growth Factor
TIMPs	Tissue Inhibitors of MMPs
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TPAs	Tissue-Plasminogen Activators
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Table des matières

Avant-propos :	11
I Introduction générale	13
1 Mechanisms of pathological scarring : role of myofibroblasts and current developments	15
1.1 Asbtract	17
1.2 Introduction	17
1.3 Myofibroblast differentiation and granulation tissue formation	17
1.4 Roles of transforming growth factor- β 1 in myofibroblast differentiation	18
1.5 Role of mechanical stress	18
1.6 Myofibroblast origins	19
1.7 Hypertrophic scars and keloids	20
1.8 Scars in other organs and the cancer stromal reaction	21
1.9 Conclusion and perspectives	22
1.10 Acknowledgements	22
1.11 References	23
2 Roles of the astrocyte and of the fibroblast in the formation of the glial scar	27
2.1 Introduction and scope of the review.	29
2.2 The different stages of repair in the brain and in other tissues.	29
2.3 What is the origin of the fibroblasts present in the glial scar relative to those present in other tissues ?	31
2.4 Relative to the astrocyte, what is the contribution of fibroblasts in depositing the extracellular matrix of the glial scar ?	34
2.5 Do fibroblasts hinder axonal regeneration ?	35
2.6 Can fibroblasts be used to promote brain repair or to curb the astrocytic reaction and axonal regeneration ?	37
2.7 Conclusions and perspectives	38
2.8 References	40
3 Les métalloprotéases de la matrice extracellulaire	47
3.1 Généralités	48
3.2 MMPs et apoptose	50
3.2.1 L'apoptose	50
3.2.2 Rappels sur le récepteur Fas	53
3.2.3 MMPs, Fas et autres récepteurs	54

II	Résultats	55
1	Fibrogenic cell phenotype modifications during culture of normal and pathological human liver slices	57
1.1	But de l'étude	58
1.2	Introduction	58
1.3	Le modèle de tranche de foie de précision	58
1.4	Historique du modèle	59
1.5	Méthodologie générale	59
1.6	Résultats principaux	60
1.6.1	Colorations à l'hématoxyline-éosine et au rouge Sirius	60
1.6.2	Disparition de l'actine α -musculaire lisse dans les myofibroblastes	60
1.6.3	Expression du récepteur- β du PDGF et de Thy-1 dans les cellules fibrogéniques, détection de l'apoptose	60
1.6.4	Expression du CD34 dans les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques	61
1.6.5	Expression de la K19 dans les cellules épithéliales biliaires	61
1.6.6	Prolifération cellulaire (Immunomarquages pour le Ki-67)	61
1.7	Discussion	61
1.8	Fibrogenic cell phenotype modifications during culture of normal and pathological human liver slices	64
2	Proteomic analysis of differentially expressed proteins in peripheral cholangiocarcinoma	77
2.1	But de l'étude	78
2.2	Introduction	78
2.3	Méthodologie Générale	79
2.4	Résultats principaux	79
2.4.1	Expression différentielle des protéines	79
2.4.2	Protéines sous-exprimées	79
2.4.3	Protéines sur-exprimées	80
2.4.4	Immunohistochimie	80
2.5	Discussion	80
2.6	Proteomic analysis of differentially expressed proteins in peripheral cholangiocarcinoma	82
3	Mise en place de modèles de lésion du système nerveux central <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	101
3.1	But de l'étude	102
3.2	Introduction	102
3.2.1	Les cellules du système nerveux central	102
3.2.2	Physiopathologie du traumatisme crânien	104
3.2.3	Gliose réactionnelle	104
3.2.4	Métalloprotéases matricielles	105
3.2.5	Transforming Growth Factor- β	106
3.3	Etude <i>in vitro</i>	107
3.3.1	Matériel et Méthodes	107
3.3.2	Résultats	110
3.4	Etude <i>in vivo</i>	120
3.4.1	Matériel et méthodes	120
3.4.2	Résultats	125
3.4.3	Discussion	134

4 Effets de la stimulation de la voie TLR4 sur la prolifération et la migration des cellules de glioblastomes induites par l'activation de la voie Fas	139
4.1 But de l'étude	140
4.2 Introduction	140
4.3 Méthodologie générale	141
4.4 Résultats principaux	141
4.5 Discussion	142
4.6 Effects of TLR4 pathway stimulation on glioblastoma cell proliferation and migration induced by Fas pathway activation	145
III Conclusions	163
IV Annexes	181
A Technique de Fractionnement par Couplage Flux Force de Sédimentation (SdFFF)	183
A.1 Principes généraux de la technique de SdFFF	184
A.2 Développement instrumental	186
A.3 Tri cellulaire par SdFFF	187
A.4 Bibliographie :	188
B De la cicatrisation à la fibrose dermique	189
B.1 Introduction	190
B.2 Les différents types cellulaires impliqués dans la cicatrisation	190
B.3 Les rôles des myofibroblastes	191
B.4 Les fibroses dermiques	192
B.5 Perspectives thérapeutiques	194
B.6 Remerciements	194
B.7 Références bibliographiques	194
C Double Immunohistochemistry with Horseradish Peroxidase and Alkaline Phosphatase Detection Systems	197
C.1 Abstract	198
C.2 Introduction	198
C.3 Materials	199
C.4 Methods	201
C.5 Notes	208
C.6 References	210

Liste des tableaux

3.1	Implications des MMPs dans les processus physiologiques et pathologiques (liste non exhaustive d'après Verma et Hansch, 2007).	48
3.2	Classification des MMPs et leurs principaux substrats.	49
1.1	Human normal and pathological specimens	65
1.2	Protein expression in fibrogenic cells	74
2.1	List and main clinical characteristics of patients involved in the study	85
2.2	Under-expressed proteins	88
2.3	Over-expressed proteins	91
3.1	Anticorps primaires utilisés pour l'immunocytochimie.	109
3.2	Anticorps primaires utilisés pour le Western Blot.	110
3.3	Anticorps secondaires.	110
3.4	Echelle des scores d'évaluation des performances sensori-motrices (d'après Korenova <i>et al.</i> , 2009).	122
C.1	Enzymatic reagents and their incubation conditions.	203
C.2	Common endogenous enzyme-blocking reagents for horseradish peroxidase and alkaline phosphatase systems.	205

Table des figures

1.1	Mechanisms of myofibroblastic differentiation, and different myofibroblast sources.	18
1.2	Processes leading to normal repair or pathological scarring.	20
2.1	Kinetics of the CNS injury	32
2.2	Myofibroblast origins	33
2.3	Immunofluorescence staining for GFAP and α -smooth muscle actin (SMA) of astrocytes and fibroblasts in culture.	36
2.4	Immunofluorescence staining for GFAP and α -smooth muscle actin (SMA) of a sub-population of astrocytes in culture.	39
3.1	Structures simplifiées des différents types de MMPs	50
3.2	Balance entre MMPs et TIMPs en conditions physiologiques ou pathologiques.	51
3.3	Complexité des voies apoptotiques [Marchetti, 2005].	52
3.4	Voies de signalisation de Fas (domaine public).	53
1.1	Slicer de Krumdieck	59
1.2	α -SM actin expression in PCLS	67
1.3	PDGF receptor- β expression in PCLS	68
1.4	Thy-1 expression in PCLS	69
1.5	Detection of apoptotic cells in PCLS	70
1.6	CD34 expression in PCLS	71
1.7	Keratin 19 expression in PCLS	72
1.8	Ki-67 expression in PCLS	73
2.1	2-D DIGE gel images	87
2.2	Quantitative analyses	95
2.3	Western blot for periostin	96
2.4	Immunostaining of differentially expressed proteins	96
2.5	Immunofluorescence of the distribution of α -smooth muscle actin and periostin	97
2.6	Diagrammatic representation of the functions of proteins	98
3.1	Technique de prélèvement du cortex. Photos de l'Institut Paul Scherrer (Suisse) adaptées pour le manuscrit.	107
3.2	Fractogramme type obtenu lors du passage des échantillons en SdFFF. Schématisation des fractions récupérées après SdFFF.	108
3.3	Pourcentage des différents types cellulaires présents dans les cultures primaires d'astrocytes de rats après 3 semaines de remise en culture sous agitation.	111
3.4	Apoptose dans les cultures astrocytaires	111
3.5	Prolifération astrocytaire	112

3.6	Localisation cytoplasmique des MMPs et TIMP-1	113
3.7	Expression de la MMP-2	113
3.8	Expression de la MMP-9	114
3.9	Cellules GFAP positives après séparation par SdFFF	114
3.10	Morphologie cellulaire après séparation par SdFFF	115
3.11	Expression de l'actine α -ML et de la GFAP dans les populations d'astrocytes	115
3.12	Sous-populations d'astrocytes séparées par SdFFF	116
3.13	Viabilité cellulaire au sein des différentes fractions	116
3.14	Apoptose au sein des différentes fractions	117
3.15	Recolonisation des plaies <i>in vitro</i>	117
3.16	Nombres de cellules au sein des plaies <i>in vitro</i>	118
3.17	Dispositif utilisé pour le « Beam Walking Test ».	121
3.18	Chronologie des expérimentations pour le « Beam Walking Test ».	122
3.19	Dispositif du « Morris Water Maze ».	123
3.20	Chronologie des expérimentations pour le « Morris Water Maze ».	123
3.21	Etude macroscopique de l'effet de la profondeur de l'impact.	125
3.22	Coloration à l'Hématoxyline-Eosine.	126
3.23	Evaluation des capacités sensori-motrices grâce au test de marche sur la poutre.	126
3.24	Evaluation des capacités cognitives des animaux	128
3.25	Evaluation de la mémoire spatiale des animaux	129
3.26	Effet de l'inhibition de l'ARNm du TGF- β 1 sur l'évaluation des performances sensori-motrices des animaux après lésion unilatérale du cortex par contusion corticale contrôlée à 3 mm de profondeur.	130
3.27	Effet de l'inhibition de l'ARNm du TGF- β 1 sur l'évaluation des performances sensori-motrices des animaux après lésion unilatérale du cortex par contusion corticale contrôlée à 4 mm de profondeur.	131
3.28	Effet de l'inhibition de l'ARNm du TGF- β 1 sur l'évaluation des capacités cognitives après lésion unilatérale du cortex par contusion corticale contrôlée à 3 mm.	131
3.29	Effet de l'inhibition de l'ARNm du TGF- β 1 sur la mémoire spatiale des animaux après lésion unilatérale du cortex par contusion corticale contrôlée à 3 mm.	132
3.30	Effet de l'inhibition de l'ARNm du TGF- β 1 sur l'évaluation des capacités cognitives lésion unilatérale du cortex par contusion corticale contrôlée à 4 mm.	133
3.31	Effet de l'inhibition de l'ARNm du TGF- β 1 sur la mémoire spatiale après lésion unilatérale du cortex par contusion corticale contrôlée à 4 mm.	133
4.1	Schématisation des interactions entre les voies Fas et TLR4 dans les cellules de glioblastome.	144
4.2	Prolifération analysis in U118-MG (A) and U87-MG (B) glioblastoma cell lines after activation of Fas and TLR4 pathways using XTT assay.	150
4.3	Prolifération analysis in U118-MG (A) and U87-MG (B) glioblastoma cell lines after activation of Fas and TLR4 pathways using EdU incorporation and flow cytometry.	151
4.4	Expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) by U118-MG (A) and U87-MG (B) glioblastoma cell lines.	152
4.5	Apoptotic cell death analysis in U118-MG (A) and U87-MG (B) glioblastoma cell lines after activation of Fas and TLR4 pathways.	153
4.6	Effect of a pan-caspase inhibitor on activation of Fas and TLR4 pathways in U118-MG (A) and U87-MG (B) glioblastoma cell lines.	154
4.7	Glioblastoma cell line migration after activation of Fas and TLR4 pathways.	155

4.8	MMP-9 expression in U118-MG (A) and U87-MG (B) glioblastoma cell lines after activation of Fas and TLR4 pathways.	156
A.1	Schéma général d'un canal de séparation de FFF.	184
A.2	Principe général de séparation cellulaire par SdFFF en mode inertiel.	185
A.3	Profil d'élution des cellules U87-MG (fractogramme) et répartition de l'expression du marqueur de cellules souches CD-133.	186
A.4	Prototypes de phase 1 (gauche) et de phase 2 (droite).	187
B.1	Différents mécanismes impliqués dans la réparation cutanée.	192
B.2	La sclérodermie mécanisme multi factoriel mal connu.	193
B.3	Rôle des myofibroblastes dans la contraction	194
C.1	Immunohistochemistry for cellular retinol-binding protein-1 (CRBP-1) and α -smooth muscle actin in normal liver.	204
C.2	Double immunostaining for α -smooth muscle actin and CRBP-1 after carbon tetrachloride treatment for 2 weeks.	204

Avant-propos :

Dans cette thèse, nous avons étudié les cellules fibrogéniques impliquées dans la réparation tissulaire et la réaction stromale qui se développe autour des tumeurs dans deux organes, le foie et le système nerveux central (SNC). Mon directeur de thèse, Alexis Desmoulière, a réalisé de nombreux travaux sur la fibrose hépatique et devait terminer des études dans ce domaine lors de son arrivée sur Limoges, études dans lesquelles il m'a d'emblée impliqué. Parallèlement, j'ai participé au développement d'une nouvelle thématique concernant la réparation du SNC puisque les neurosciences constituaient à l'époque, le thème central de l'EA 3842, équipe d'accueil à laquelle nous étions rattachés. Nous avons donc sciemment décidé de comparer, dans ce travail, les mécanismes de réparation tissulaire normaux et pathologiques présents dans ces deux organes.

Lors d'une blessure, chaque organe va répondre de façon à maintenir ou à reconstruire l'intégrité tissulaire. Si la lésion est aiguë et modérée, le processus de réparation va conduire à la formation d'une cicatrice qui ne nuira pas au bon fonctionnement de l'organe. Au contraire, si la lésion est importante ou chronique, le processus de réparation va provoquer une accumulation de matrice extracellulaire (MEC) ou fibrose, qui, progressivement, entraînera une diminution des capacités fonctionnelles de l'organe.

La fibrose est un processus pathologique provoqué par une réparation tissulaire excessive. Elle est due à la perte des capacités de régénération des tissus humains dans la majorité des cas. Cette fibrose est provoquée par l'activité spécifique de certaines cellules : les fibroblastes et les myofibroblastes dans la majorité des organes et les astrocytes dans le cas du SNC. Dans le SNC, on parle de cicatrice gliale. Ces cellules vont être responsables du dépôt excessif de MEC qui remplace progressivement les parties fonctionnelles de l'organe.

Dans ce travail, nous avons étudié les différentes sous-populations de cellules fibrogéniques hépatiques (cellules étoilées du foie et fibroblastes portaux) impliquées notamment dans la cirrhose hépatique, la cholestase biliaire et le stroma des cholangiocarcinomes et les cellules fibrogéniques impliquées dans la réparation du SNC, à savoir les astrocytes. Il nous a semblé intéressant de comparer deux organes, le foie et le SNC, dans lesquels les cellules fibrogéniques impliquées (fibroblastes et astrocytes) ne montrent a priori que peu de propriétés communes, si ce n'est qu'elles sont toutes deux responsables du dépôt de MEC. Il est également étonnant de remarquer que les cellules étoilées du foie activées expriment la « glial fibrillary acidic protein » (GFAP) qui est le marqueur reconnu pour les astrocytes du SNC. Cependant, ces cellules ne dériveraient pas du même feuillet embryonnaire [Cassiman *et al.*, 2006, Geerts, 2004]. Quoi qu'il en soit, la comparaison des mécanismes de réparation développés par ces deux organes et la caractérisation des cellules fibrogéniques impliquées dans le dépôt et le remodelage de la MEC constituait un challenge intéressant que nous avons relevé.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'origine des cellules fibrogéniques impliquées dans différents types de fibrose hépatique en utilisant un modèle original de tranches de foie en culture. Nous avons réalisé une étude protéomique concernant

le stroma des cholangiocarcinomes pour tenter d'identifier des marqueurs spécifiques. Concernant le SNC, nous avons développé un modèle *in vitro* et un modèle *in vivo* de lésion corticale contrôlée pour étudier les processus impliqués dans la réparation de ce tissu qui conduit à la formation d'une cicatrice gliale le plus souvent très invalidante. Grâce à une technique de tri cellulaire originale, nous avons isolé différentes sous-populations d'astrocytes présentant des propriétés tout à fait singulières. Enfin, nous nous sommes intéressés à la prolifération des glioblastomes curieusement induite par l'activation de la voie pro-apoptotique Fas.

Première partie

Introduction générale

Chapitre 1

Mechanisms of pathological scarring : role of myofibroblasts and current developments

Wound Repair and Regeneration, (2010), In press

Mechanisms of pathological scarring : role of myofibroblasts and current developments

Vincent Sarrazy (1), Fabrice Billet, PhD (1), Ludovic Micallef, PhD (1), Bernard Coulomb, PhD (2), Alexis Desmoulière, PhD (1)

(1) EA 3842 and Département de Physiologie, Institut Fédératif de Recherche 145, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges, Limoges, F-87025 France

(2) Inserm U970, Réparation Artérielle, PARCC-HEGP, Université Paris Descartes, Paris, F-75015 France

Corresponding author : Alexis Desmoulière Department of Physiology, and EA 3842 (IFR 145), Faculty of Pharmacy, University of Limoges, 2, Rue du Docteur Marcland 87025 Limoges cedex, France Tel. : (33) 555 43 58 73 Fax : (33) 555 43 59 12 E-mail : alexis.desmouliere@unilim.fr

Short running title : Pathological scarring mechanisms

Key words : granulation tissue, myofibroblast, stem cell, excessive scarring

Chapitre 2

Roles of the astrocyte and of the fibroblast in the formation of the glial scar

In preparation

Roles of the astrocyte and of the fibroblast in the formation of the glial scar

Vincent Sarrazy (1), Fabrice Billet (1), Omar Skalli (2) and Alexis Desmoulière (1)

(1) EA 3842 and Département de Physiologie, IFR 145,
Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Limoges, Limoges, F-87025 France.

(2) Department of Biological Sciences,
University of Memphis, USA

Corresponding author : Alexis Desmoulière Department of Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Limoges, 2, Rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges cedex, France
Phone : (33) 555 43 58 73 Fax : (33) 555 43 59 50 E-mail : alexis.desmouliere@unilim.fr

Abbreviations : central nervous system (CNS), chondroitin sulphate proteoglycan (CSPG), dermatan sulphate proteoglycan (DSPG), extracellular matrix (ECM), extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN), fibroblast growth factor (FGF), glial fibrillary acidic protein (GFAP), glycosaminoglycan (GAG), heparan sulphate proteoglycan (HSPG), interferon (IFN), interleukin (IL), keratan sulphate proteoglycan (KSPG), matrix metalloproteinase (MMP), nerve growth factor (NGF), semaphoring (Sema), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP), transforming growth factor (TGF), tumor necrosis factor (TNF)

Chapitre 3

Les métalloprotéases de la matrice extracellulaire

3.1 Généralités

Les métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMPs pour Matrix MetalloProteinases) sont une très large famille d'endopeptidases à zinc. Leur rôle principal est le remodelage et la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC). Ces protéases vont avoir pour cible les différents composants de cette matrice à savoir : les collagènes, l'élastine, les glycoprotéines et les protéoglycanes. Bien que peu exprimées dans les conditions physiologiques, les MMPs jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. On les retrouve impliquées dans tous les organes ainsi que dans de nombreux processus physiologiques tels que le remodelage osseux, l'inflammation, l'angiogenèse, le développement embryonnaire, l'apoptose et la cicatrisation (Table : 3.1). Cependant, il

Processus physiologiques		Processus pathologiques	
Angiogenèse	Apoptose	Arthrite	Athérosclérose
Implantation du blastocyste	Remodelage de l'os	Destruction de la barrière hémato-encéphalique	Maladies cardiovasculaires
Dilatation cervicale	Développement embryonnaire	Maladie d'Alzheimer	Ulcération de la peau
Réponse immunitaire	Inflammation	Ulcération de la cornée	Sclérose en plaque
Cicatrisation	Repousse axonale	Cancers	Maladie de Guillain-Barre

TABLE 3.1 – Implications des MMPs dans les processus physiologiques et pathologiques (liste non exhaustive d'après Verma et Hansch, 2007).

faut aussi noter également leurs implications dans de nombreux processus pathologiques tels que notamment, la fibrose et la cirrhose hépatique, la sclérose en plaque, la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose, les cancers et les ulcérations de la peau (Table : 3.1). Aujourd'hui chez l'homme, 26 MMPs sont décrites classées en collagénases, gélatinases, stromélysines et matrilysines auxquelles il faut rajouter une sous-classe, les MMPs possédant un domaine trans-membranaire ou MT-MMPs (pour Membrane Type-MMPs) (Table : 3.2).

Toutes ces MMPs possèdent de nombreuses homologies structurales (Figure : 3.1). Les MMPs sont constituées d'un propeptide suivi d'un domaine catalytique contenant du zinc en N-terminal. Toutes à l'exception des matrilysines possèdent des domaines hemoplexine-like en C-terminal. Enfin les MT-MMPs vont posséder un domaine transmembranaire en C-terminal et les gélatinases arborent des motifs fibronectine-like au niveau du domaine catalytique (Figure : 3.1).

Les MMPs sont sécrétées sous forme de zymogène par une multitude de types cellulaires allant des fibroblastes aux neurones en passant par les cellules impliquées dans l'immunité.

Une fois sécrétées, pour être activées, les pro-MMPs doivent être clivées par différents agents protéolytiques comme les sérines protéases, les furines, les plasmines et certaines MMPs elles-mêmes. Les MMPs ont pour principaux substrats les constituants de la MEC. Cependant, elles peuvent aussi agir sur beaucoup d'autres molécules comme des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion, des cytokines, certains récepteurs pro-

Classe	MMPs	Substrats
Collagénases	MMP-1	Collagène I, II, III, VII, VIII, X agrécane, gélatine, pro-MMP-2, pro-MMP-9
	MMP-8	Collagène I, II, III, VII, VIII, X agrécane, gélatine
	MMP-13	Collagène I, II, III, agrécane, gélatine
	MMP-18	Collagène I, II, III, agrécane, gélatine
Gélatinases	MMP-2	Collagène I, II, III, IV, VII, X, XI, XIV, agrécane; gélatine, élastine, fibronectine
	MMP-9	Collagène IV, V, VII, X, XI, XIV, agrécane; gélatine, élastine, pro-MMP-9, pro-MMP-13
Stromélysines	MMP-3	Collagène II, III, IV, IX, X, XI, élastine, pro-MMP-1, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-MMP-9, pro-MMP-13
	MMP-10	Collagène III, IV, V, gélatine, fibronectine
	MMP-11	Fibronectine, laminine, gélatine, agrécane
MT-MMPs	MMP-14	Pro-MMP-2, pro-MMP-13, Collagène I, II, III, gélatine, agrécane, fibronectine, laminine
	MMP-15	Pro-MMP-2, gélatine, fibronectine, laminine
	MMP-16	Pro-MMP-2
	MMP-17	Inconnu
	MMP-24	Pro-MMP-2
	MMP-25	Gélatine
Autres MMPs	MMP-7	Collagène II, III, IV, IX, X, XI, XIV, agrécane; gélatine, élastine, fibronectine, laminine, pro-MMP-1, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-MMP-9 pro-MMP-13
	MMP-12	Collagène IV, gélatine, fibronectine
	MMP-19	Elastine
	MMP-20	Tenascine, gélatine, fibronectine
	MMP-21	Enamel, gélatine
	MMP-23	Inconnu
	MMP-27	Inconnu
	MMP-28	Inconnu

TABLE 3.2 – Classification des MMPs et leurs principaux substrats.

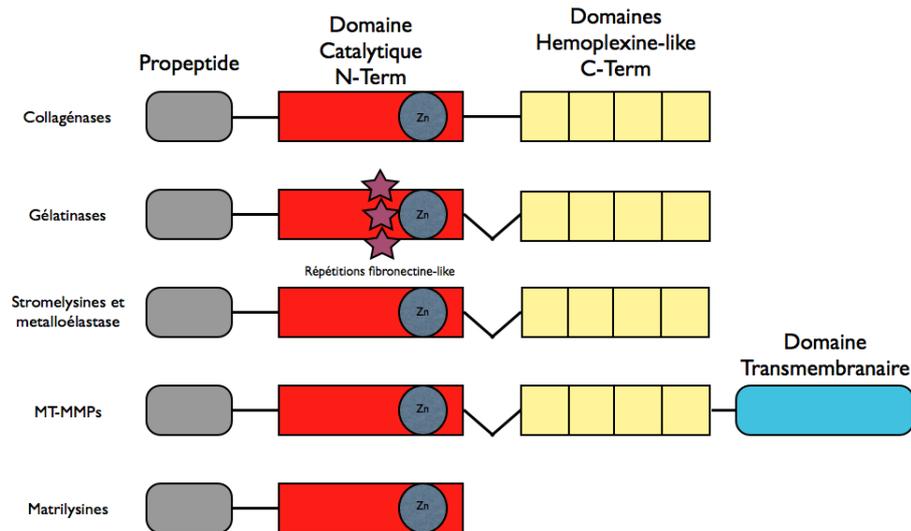


FIGURE 3.1 – Structures simplifiées des différents types de MMPs

apoptotiques et leurs ligands [Folgueras *et al.*, 2004]. Il a de plus été démontré que les produits de dégradation de certains composants de la MEC par des MMPs avaient une activité biologique [Maquart *et al.*, 2005, Tran *et al.*, 2005].

Dans les conditions physiologiques, l'activation des MMPs est déjà contrôlée au niveau de la transcription. Cependant, la majeure partie du contrôle s'effectue non seulement au niveau de l'activation du zymogène mais surtout, par une inhibition de la forme active par des inhibiteurs endogènes de faible affinité (MMPIs) et des inhibiteurs spécifiques de forte affinité, les TIMPs pour Tissue Inhibitors of MMPs. Les TIMPs sont au nombre de 4 et inhibent toutes les MMPs avec plus ou moins d'affinité pour chacune. Dans les conditions physiologiques, il existe une balance très fine entre les MMPs et les TIMPs qui garantit le maintien de l'homéostasie cellulaire. En condition pathologique, cet équilibre sera rompu (Figure : 3.2), soit en faveur des MMPs conduisant à la lyse tissulaire, à des processus d'apoptose ou à la formation de métastases dans le cas de tumeurs, soit en faveur des TIMPs, provoquant alors une accumulation de MEC induisant, par exemple, des cicatrisations excessives ou des fibroses.

3.2 MMPs et apoptose

3.2.1 L'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus physiologique qui régule l'homéostasie tissulaire en éliminant les cellules lésées, tumorales ou infectées par un virus et qui intervient notamment dans l'embryogenèse, par exemple lors de la séparation des doigts du fœtus. Les cellules apoptotiques sont caractérisées par une diminution du volume cellulaire, et par l'externalisation à la surface de la membrane plasmique, de la phosphatidylsérine, un glycérophospholipide anionique. Ensuite, la condensation de la chromatine et le bourgeonnement de la membrane plasmique précèdent le morcellement du noyau et la formation de corps apoptotiques. Lors de ce processus, l'intégrité membranaire est maintenue, évitant ainsi la dispersion du contenu cytoplasmique et l'apparition d'une réaction inflammatoire. Les corps apoptotiques créés vont être ensuite phagocytés par les cellules environnantes, permettant l'élimination ou le recyclage des composants cellulaires. Lors de l'apoptose, des endonucléases qui vont fragmenter l'ADN en nucléo-

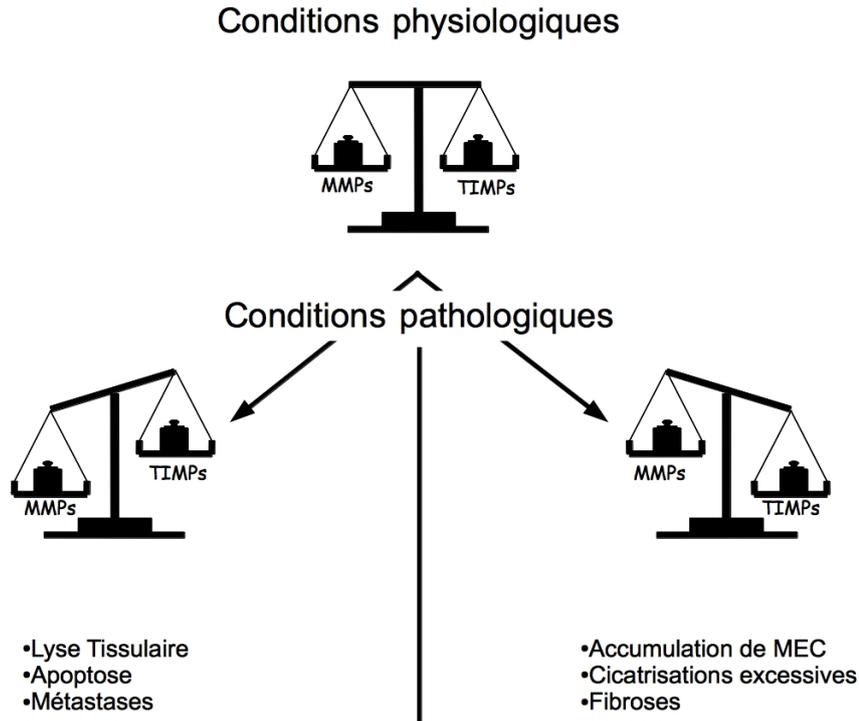


FIGURE 3.2 – Balance entre MMPs et TIMPs en conditions physiologiques ou pathologiques.

somes de 180 à 200 paires de bases sont activées et pourront être quantifiées par différentes méthodes d'analyse. L'apoptose fait généralement intervenir des protéines particulières appelées caspases (pour Cystein requiring ASPartate activity proteASEs). Ces enzymes sont présentes dans la cellule sous forme de précurseurs qui doivent être clivés pour être activés. Parmi toutes les voies menant à l'apoptose, on en distingue classiquement deux principales. La première, la voie mitochondriale, peut être activée par différents stimuli intra ou extracellulaires et requière la présence de protéines appartenant à la superfamille des protéines Bcl-2. La balance d'expression de ces molécules a été décrite comme le rhéostat réglant la vie ou la mort cellulaire. Une conséquence notoire d'un ratio en faveur de l'apoptose est la chute du potentiel mitochondrial provoquant la libération par la mitochondrie du cytochrome C, ainsi que de diverses protéines [Smac/Diablo, l'endonucléase G, l'AIF (pour Apoptosis Inducing Factor) et l'Apaf-1 (pour Apoptotic Protease-Activating Factor-1)]. Le cytochrome C, l'Apaf-1 et l'ATP forment alors un complexe nommé apoptosome qui va activer la caspase initiateur 9 permettant à son tour le clivage de la caspase effectrice 3 [Marchetti, 2005] (Figure : 3.3). La seconde voie classiquement décrite est la voie passant par les récepteurs de mort comme Fas, TNFR (pour Tumor Necrosis Factor Receptor), DR4 et DR5 (pour Death Receptor 4 and 5). Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs au TNF. Quand les ligands sous forme trimérique se lient au récepteur, celui-ci se trimérise également et recrute grâce à ses domaines de mort (DD pour Death Domain), une molécule adaptatrice, FADD (pour Fas Associated Death Domain). Cette dernière va activer les caspases initiateur 8 et 10 qui à leur tour activeront des caspases effectrices, notamment la caspase 3 [Marchetti, 2005] (Figure : 3.3).

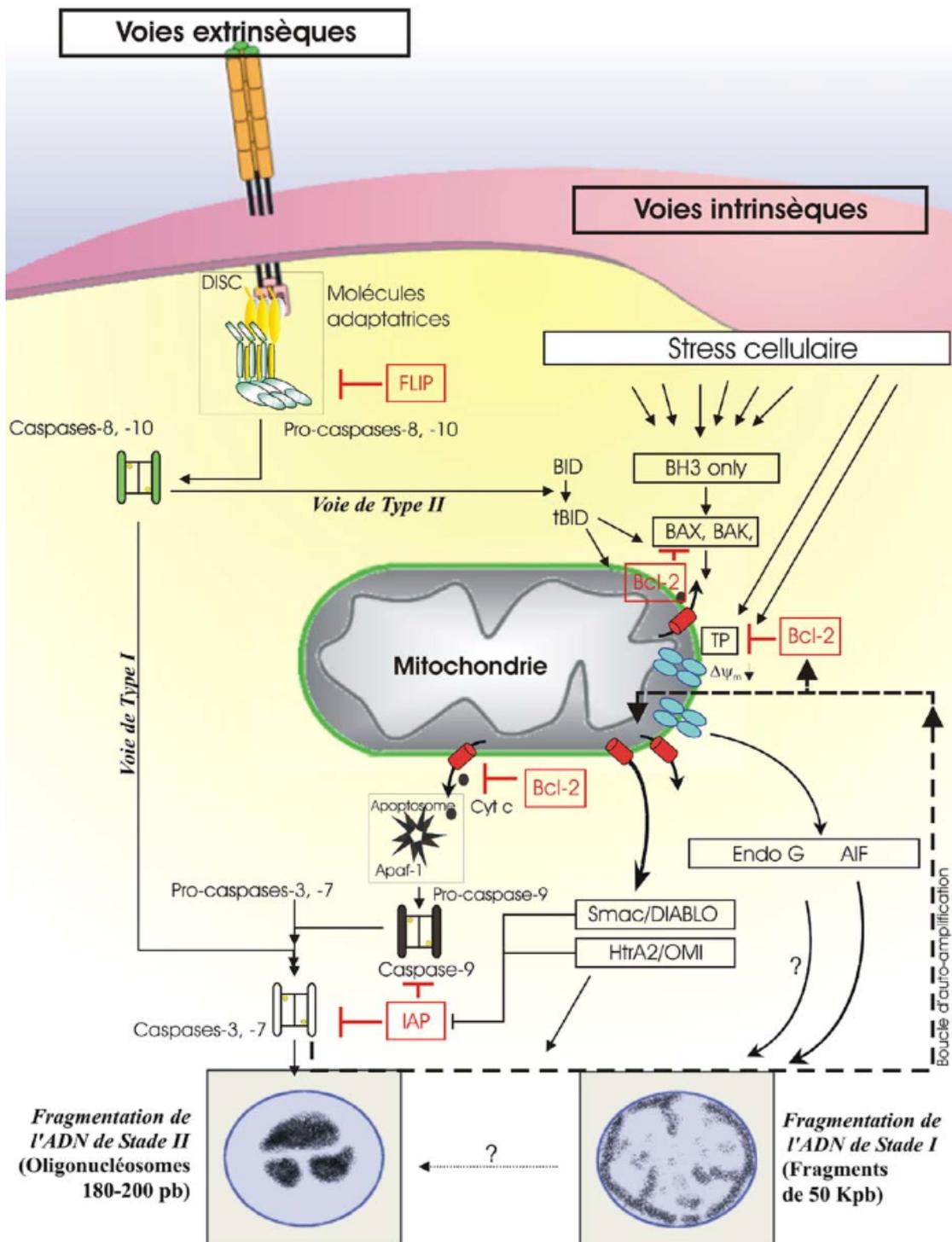


FIGURE 3.3 – Complexité des voies apoptotiques [Marchetti, 2005].

3.2.2 Rappels sur le récepteur Fas

Parmi tous les récepteurs impliqués dans l'apoptose, le plus étudié est le récepteur Fas (CD95). Fas est une protéine de 45 kDa appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF, et se caractérise par la présence de 3 domaines riches en cystéines dans sa portion extracellulaire ainsi que par la présence d'un DD intra-cellulaire dépourvu d'activité enzymatique intrinsèque [Houston et O'Connell, 2004]. L'induction de l'apoptose par Fas fait suite à son oligomérisation induite par la fixation de son ligand naturel (FasL) ou d'un anticorps agoniste, et met en jeu un complexe multimoléculaire sous membranaire, le DISC (pour Death Inducing Signaling Complex), permettant le recrutement rapide de la protéine FADD aboutissant au clivage de la caspase 8 [Houston et O'Connell, 2004]. Celle-ci peut alors activer la caspase 3, soit directement par clivage, soit en activant la voie apoptotique mitochondriale [Houston et O'Connell, 2004] (Figure :3.4).

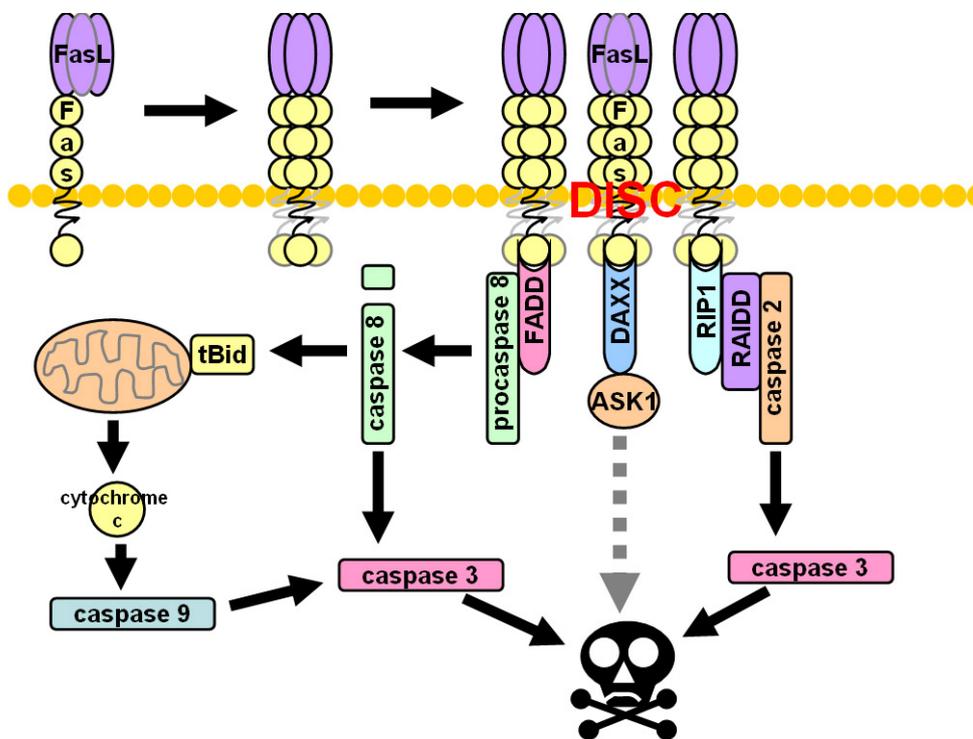


FIGURE 3.4 – Voies de signalisation de Fas (domaine public).

Il existe plusieurs mécanismes intracellulaires de régulation de cette voie pro-apoptotique. La protéine c-Flip, en empêchant l'activation de la caspase 8 par FADD, est un puissant inhibiteur de la voie apoptotique passant par Fas. Un autre mécanisme de régulation fait appel à l'activation de NF- κ B (pour Nuclear Factor Kappa B), dont c-Flip augmente par ailleurs l'activité [Kataoka *et al.*, 2000]. Les signaux délivrés à la suite de la trimérisation du récepteur Fas ne se limitent pas à l'activation de l'apoptose mais peuvent aussi engendrer un signal de prolifération cellulaire. FasL est ainsi capable d'induire la prolifération en activant la cascade des kinases JNK (pour c-Jun-N-terminal Kinase) et ERK (pour Extracellular signal-Regulated Kinase). Le récepteur Fas est notamment exprimé par les cellules T et B activées et représente une voie privilégiée de contrôle de la réponse immunitaire, d'une part, en éliminant les clones auto-réactifs, d'autre part, en induisant l'apoptose des lymphocytes activés, après leur prolifération en réponse à une stimulation antigénique [Mizuno *et al.*, 2003].

3.2.3 MMPs, Fas et autres récepteurs

Les MMPs peuvent interagir avec différents systèmes de récepteurs présents à la surface des cellules (notamment le système Fas/FasL), permettant alors une régulation de l'apoptose avec des effets pro- ou anti-apoptotiques. Il a par exemple été montré que la MMP-7 pouvait entraîner la libération du FasL présent à la surface des cellules. Le FasL libéré pourrait alors se lier au récepteur Fas des cellules environnantes et induire ainsi leur apoptose [Powell *et al.*, 1999]. De plus, certaines MMPs peuvent cliver les récepteurs de mort présents à la surface des cellules et ainsi, empêcher ou retarder la mort cellulaire. Dans le contexte tumoral, via le clivage du récepteur de mort Fas, les MMPs vont posséder un rôle anti-apoptotique, induisant alors la croissance tumorale et un processus d'échappement vis à vis de certaines chimiothérapies [Mitsiades *et al.*, 2001, Strand *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2006]. La MMP-3 en clivant FasL, jouerait un rôle important dans les phénomènes de neurodégénération où, dans certaines conditions, elle retarderait ou empêcherait l'apoptose des neurones [Ethell *et al.*, 2002, Wetzel *et al.*, 2004]. D'autres études ont montré que la MMP-9 pouvait entraîner l'apoptose des neurones par son interaction avec une protéine appelée LRP (pour Lipoprotéine receptor Related Protein). Cette molécule, après son activation par les TPAs (pour Tissue-Plasminogen Activators), est connue pour déclencher certaines voies intracellulaires impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines et la régulation des protéases et de leurs inhibiteurs [Makarova *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2003b]. Classiquement les MMP-2 et MMP-9 vont augmenter l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques au cours du remodelage de la MEC ou lors de la néoangiogenèse pendant la formation de l'os [Vu *et al.*, 1998]. Cependant, dans un contexte tumoral, ces deux MMPs vont limiter l'apoptose des cellules cancéreuses en augmentant la biodisponibilité du VEGF (pour Vascular Endothelial Growth Factor), permettant ainsi la croissance de la tumeur en dégradant la MEC et en facilitant l'angiogenèse [Bergers *et al.*, 2000]. Enfin, ces MMPs vont également faciliter la création de métastases [Yu *et al.*, 2009].

Deuxième partie

Résultats

Chapitre 1

Fibrogenic cell phenotype modifications during culture of normal and pathological human liver slices

Guyot, C., Lepreux, S., Combe, C., Sarrazy, V., Billet, F., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P. et Desmoulière, A. (2010). Fibrogenic cell phenotype modifications during remodelling of normal and pathological human liver in cultured slices. *Liver Int*, 30(10) :1529–1540.

1.1 But de l'étude

Dans ce travail, nous avons utilisé le modèle de tranches de foie en culture qui conserve les interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire, pour étudier les modifications phénotypiques des différentes cellules fibrogéniques hépatiques, à savoir les cellules étoilées du foie (CEF) et les fibroblastes portaux (FP), observées après 1 semaine de culture dans des tranches provenant de foies normaux, de cirrhoses hépatiques ou de cholestases biliaires.

1.2 Introduction

Le débat concernant le remodelage et/ou la réversibilité des lésions présentes dans la cirrhose hépatique et la fibrose biliaire reste toujours d'actualité. Des études récentes sur les mécanismes impliqués dans la fibrose hépatique [Friedman et Bansal, 2006] tendent à montrer que cette fibrose hépatique et peut-être même la cirrhose, seraient réversibles. Même si des améliorations substantielles fonctionnelles et structurelles peuvent se produire dans le foie cirrhotique [Pol *et al.*, 2004], une régression complète de toutes les caractéristiques anatomiques semble très peu probable. En outre, il a été observé une régression de la fibrose hépatique après décompression chirurgicale chez des patients ayant une cholestase [Hammel *et al.*, 2001]. Les acteurs cellulaires impliqués dans le développement de la fibrose hépatique sont aujourd'hui clairement identifiés, et il est admis que les CEF ainsi que les FP peuvent être à l'origine des lésions fibrotiques hépatiques. Lors de la fibrose hépatique, ces deux populations cellulaires vont développer un phénotype myofibroblastique en exprimant notamment l'actine α -musculaire lisse (α -ML) et en déposant de grande quantité de matrice extracellulaire (MEC) [Guyot *et al.*, 2006]. Dans le foie normal, il n'y a pas de cellules présentant un phénotype myofibroblastique. Dans les conditions pathologiques, l'origine et la localisation des cellules de type myofibroblastique responsables du développement de la fibrose varient en fonction de la pathologie sous-jacente. Dans le cas de la cirrhose alcoolique, la présence de myofibroblastes est démontrée au niveau septal et au niveau du parenchyme hépatique et ces myofibroblastes dérivent des CEF. Dans le cas d'une fibrose cholestatique où les myofibroblastes sont présents autour des zones portes du foie, les myofibroblastes ont pour origine les fibroblastes portaux. Afin d'étudier les modifications du phénotype des cellules impliquées dans la fibrose hépatique, nous avons utilisé le modèle de tranches de foie en culture. Ce modèle permet de limiter le nombre d'animaux utilisés et de diminuer la complexité des expérimentations. De plus, contrairement à la culture cellulaire dite classique, ce modèle permet le maintien des interactions cellule-cellule et cellule-MEC.

1.3 Le modèle de tranche de foie de précision

Ce modèle permet l'obtention de tranches de tissu viables, d'épaisseur et de diamètre reproductibles, à partir d'organes animaux ou humains. Les comparaisons inter-organes et inter-espèces sont facilitées. De plus, l'architecture et l'hétérogénéité fonctionnelle du tissu sont préservées. Par conséquent, les interactions cellule-cellule et cellule-MEC sont maintenues. Enfin, ce modèle permet d'évaluer l'effet de plusieurs molécules à différentes concentrations et à différents temps de traitement, sur des échantillons similaires.

1.4 Historique du modèle

Le modèle de culture de tranche existe depuis longtemps mais a toujours pêché par son manque de reproductibilité jusqu'à la mise au point en 1980 d'un "slicer" par Krumdieck [Krumdieck *et al.*, 1980] permettant la réalisation de tranches homogènes parallèlement à la mise en place de conditions de culture permettant d'augmenter significativement la viabilité *in vitro* des tranches de tissu (Figure 1.1).

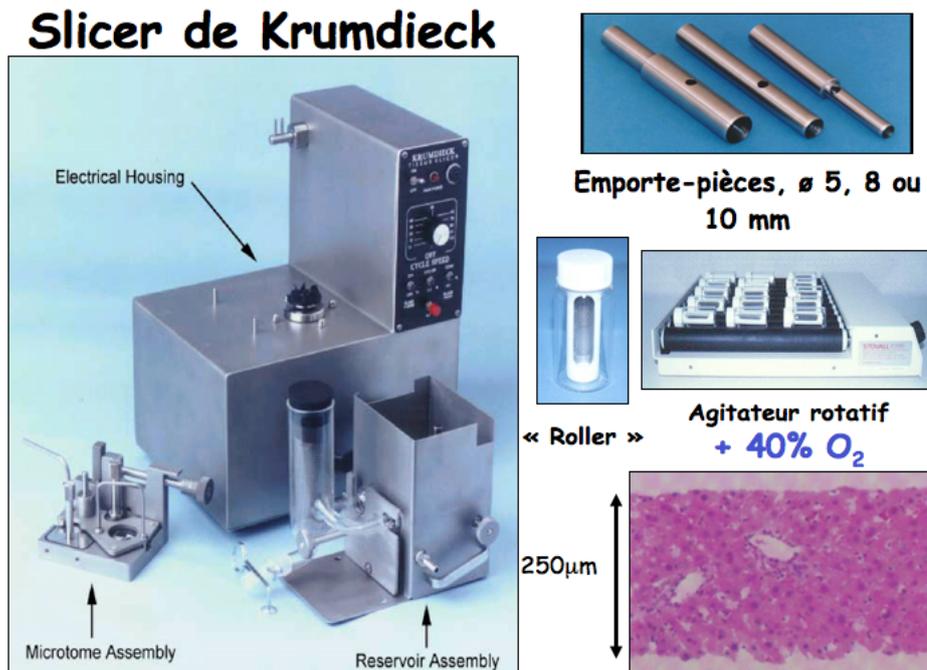


FIGURE 1.1 – Slicer de Krumdieck

Cet appareil permet de réaliser des tranches de différents tissus (foie, rein, cerveau ...) en minimisant les lésions à la surface de la tranche, permettant ainsi une meilleure survie du tissu en culture. Il a été démontré que ce modèle permettait la conservation du métabolisme de l'organe impliqué, mais ce n'est que très récemment qu'il a été utilisé pour l'étude des mécanismes physiopathologiques. Des études récentes ont montré que ce modèle est utilisable pour suivre l'activation des CEF [van de Bovenkamp *et al.*, 2005], les étapes précoces de la fibrose hépatique ainsi que l'effet de molécules anti-fibrotiques [Vickers *et al.*, 2004, van de Bovenkamp *et al.*, 2006]. Le microenvironnement complexe des tranches de foie a permis de tester la spécificité de toxines vis-à-vis des différents types cellulaires hépatiques [Hagens *et al.*, 2006] et il est aujourd'hui utilisé pour tester la spécificité et l'efficacité de vecteurs en thérapie génique [Rots *et al.*, 2006].

1.5 Méthodologie générale

Nous avons réalisé des tranches de foie provenant de 7 patients : du foie "subnormal" (3 cas) prélevé à distance d'un cholangiocarcinome (1 cas), de métastases d'adénocarcinome du colon (1 cas), ou de zones présentant la maladie de Caroli (1 cas), et 4 foies pathologiques, deux cirrhoses alcooliques et deux fibroses biliaires secondaires à un adénocarcinome (1 cas) ou à un cholangiocarcinome (1 cas). Les tranches ont été mises en culture pendant une semaine, puis fixées au formol et incluses en paraffine. Des coupes de 4 µm ont été réalisées au microtome et colorées avec de l'hématoxyline-éosine pour

des analyses de routine. D'autres coupes ont été colorées avec du rouge Sirius pour visualiser la fibrose ou sont utilisées pour l'immunocytochimie. Nous avons pratiqué des immunomarquages contre :

- l'actine α -ML marqueur caractéristique des myofibroblastes totalement différenciés [Skalli *et al.*, 1986],
- le CD34 marqueur des cellules endothéliales qui apparaît lors de la disparition de l'endothélium fenestré des sinusoides hépatiques [Couvelard *et al.*, 1993],
- la K19 exprimée dans les cellules épithéliales biliaires [LeSage *et al.*, 2001],
- le Ki-67 marqueur de la prolifération cellulaire,
- Thy-1 (CD90) molécule d'adhésion induite dans les populations de fibroblastes lors de la réparation et/ou de la fibrose tissulaire [Dudas *et al.*, 2009],
- le récepteur- β du platelet-derived growth factor (PDGF) marqueur précoce de l'activation des cellules fibroblastiques [Pinzani *et al.*, 1996].

La détection des cellules apoptotiques est réalisée par la méthode TUNEL.

1.6 Résultats principaux

1.6.1 Colorations à l'hématoxyline-éosine et au rouge Sirius

Dans le foie normal avant culture, l'architecture histologique classique du foie est observée. Après culture, quelques zones nécrotiques situées sur les bords des coupes apparaissent, mais l'architecture histologique des zones vivantes n'est pas modifiée. Que ce soit avant ou après culture, il n'est pas observé de dépôt anormal de collagène. Dans les foies fibreux avant culture, la présence des signes histologiques classiques de fibrose est observée. Cette structure de foie fibreux n'est pas modifiée après culture.

1.6.2 Disparition de l'actine α -musculaire lisse dans les myofibroblastes

Dans le foie normal avant culture, l'expression de l'actine α -ML est observée dans quelques CEF et dans les vaisseaux du système porte hépatique. Après culture, l'expression de l'actine α -ML n'est pas modifiée. Dans les foies fibreux avant culture, l'actine α -ML est observée au niveau des septa fibreux dans les cas de cirrhoses alcooliques et dans les zones portes des foies cholestatiques. Après culture, quelque soit l'étiologie, l'expression d'actine α -ML est très réduite à l'exception des vaisseau sanguins.

1.6.3 Expression du récepteur- β du PDGF et de Thy-1 dans les cellules fibrogéniques, détection de l'apoptose

Dans le foie normal avant culture, le récepteur- β du PDGF et Thy-1 sont exprimés uniquement par les fibroblastes portaux, alors qu'il n'y a pas de marquage dans le parenchyme. Après culture, les fibroblastes portaux sont toujours marqués; dans le parenchyme, quelques CEF positives au récepteur- β du PDGF et à Thy-1 sont observées. Dans les foies fibreux avant culture, l'expression du récepteur- β du PDGF et de Thy-1 est restreinte aux myofibroblastes présents dans les septa fibreux des foies cirrhotiques et autour des canaux biliaires proliférants dans les foies cholestatiques. Après culture, l'expression du récepteur- β du PDGF et de Thy-1 est maintenue dans les septa fibreux des foies cirrhotiques, mais très fortement réduite dans les zones portes des foies cholestatiques. Dans le parenchymes, seul quelques CEF expriment les deux marqueurs quelque soit le type de lésions. Après culture, des cellules apoptotiques sont observées uniquement dans les zones portes des foies cholestatiques.

1.6.4 Expression du CD34 dans les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques

Dans le foie normal avant culture, le CD34 est exprimé dans les cellules endothéliales des vaisseaux portes et dans les vénules terminales situées entre les zones portes et le parenchyme. Après culture, de nombreuses endothéliales sinusoidales sont marquées. Dans les tissus pathologiques avant culture, le CD34 est exprimé dans certains sinusoides hépatiques situés à la périphérie des nodules cirrhotiques et dans le parenchyme à proximité des zones portes dans les foies cholestatiques. Dans les premiers jours de culture, l'expression du CD34 se développe dans les sinusoides et après une semaine de culture, tous les sinusoides hépatiques l'expriment.

1.6.5 Expression de la K19 dans les cellules épithéliales biliaires

Dans le foie normal avant culture, la K19 se trouve classiquement dans les canaux biliaires portes et dans les cellules des ductules biliaires en périphérie des systèmes portes. Il n'est pas observé de modifications de l'expression de la K19 après culture. Dans les foies pathologiques avant culture, la K19 est exprimée dans les cellules épithéliales biliaires présentes dans les septa cirrhotiques et dans les zones portes cholestatiques. Après 1 jour de culture l'expression de la K19 diminue quelque soit la pathologie. Après 2 jours de culture, une faible expression de la K19 est observée dans les septa fibreux et le parenchyme des foies cirrhotiques ; dans les foies cholestatiques, cette expression se situe en périphérie des zones portes. Les cellules qui expriment alors la K19 présentent une morphologie allongée. Après 1 semaine de culture, l'expression de la K19 est fortement augmentée dans toutes les pathologies, comparé au niveau d'expression de la K19 après 2 jours de culture.

1.6.6 Prolifération cellulaire (Immunomarquages pour le Ki-67)

Dans le foie normal, il n'y a quasiment pas d'expression du Ki-67 avant culture et après 1 jour de culture. Après 2 jours de cultures, un nombre significatif de cellules expriment le Ki-67 dans le parenchyme. Après 1 semaine de culture, en plus des cellules parenchymateuses, le Ki-67 est aussi exprimé dans les zones portes. Dans les foies pathologiques avant culture, des cellules exprimant le Ki-67 sont présentes dans le parenchyme et dans les zones hépatiques endommagées quelque soit la pathologie. Tout au long de la culture, le nombre de cellules proliférantes dans le parenchyme reste constant ; dans les septa fibreux des foies cirrhotiques et dans les zones portes des foies cholestatiques, le nombre de cellules exprimant le Ki-67 augmente progressivement.

1.7 Discussion

Dans ce travail, nous avons montré que les tranches de foie de précision peuvent être cultivées pendant une semaine sans apparition de signes de nécrose. La perte d'expression de l'actine α -ML par les myofibroblastes observée dans cette étude ainsi que précédemment lors d'une étude préliminaire [Clouzeau-Girard *et al.*, 2006], pourrait être due à une dédifférenciation des myofibroblastes qui pourraient réacquérir un phénotype quiescent ou alors à leur disparition par apoptose. Dans les foies cirrhotiques, l'expression du récepteur- β du PDGF ainsi que de Thy-1 n'est pas modifiée et il n'est pas observé d'apoptose. Ces résultats suggèrent que, dans les foies cirrhotiques, les cellules myofibroblastiques qui dérivent des CEF possèdent un phénotype « flexible » leur permettant de retrouver un phénotype moins activé en conservant l'expression du récepteur- β du PDGF

et de Thy-1 tout en perdant l'expression d'actine α -ML. Au contraire, dans les foies cholestatiques, il est observé une perte de l'expression du récepteur- β du PDGF, de Thy-1 et de l'actine α -ML, associée à la présence d'apoptose au niveau des zones portes hépatiques. Ces résultats suggèrent qu'au niveau portal, les myofibroblastes dérivant des fibroblastes portaux vont être éliminés par apoptose. En effet, nous avons montré que si après ligature du canal cholédoque, on diminue ou abolie le stress mécanique par décompression biliaire, on observe une induction de l'apoptose dans les fibroblastes portaux impliqués dans la fibrose portale [Costa *et al.*, 2003]. Lors de la mise en culture des tranches, il est possible que la décompression induite par la réalisation des coupes induise cette apoptose au niveau des structures biliaires. De plus, ces myofibroblastes portaux seraient plus susceptibles aux signaux pro-apoptotiques [Saile *et al.*, 2002]. Ces résultats confirment que les myofibroblastes présents dans les foies cirrhotiques ou dans les foies cholestatiques se comportent différemment et ont donc très certainement pour origine des populations cellulaires différentes. Des études expérimentales chez le rat ont montré que lorsque la fibrose est induite par un traitement au tétrachlorure de carbone, ce sont les CEF qui sont impliquées alors que lorsque la fibrose est provoquée par la ligature du canal cholédoque, ce sont les fibroblastes portaux qui sont impliqués [Guyot *et al.*, 2007a]. Après acquisition d'un phénotype myofibroblastique et disparition des stimuli ayant induit cette différenciation myofibroblastique, les CEF sont capables de moduler leur phénotype en réacquérant un phénotype proche de leur phénotype d'origine alors que les fibroblastes portaux vont disparaître par apoptose. Le modèle de tranches de foie de précision permet l'étude précise de la réponse de ces sous-populations fibrogéniques aux modifications environnementales. Il est intéressant de noter que les conditions de culture des foies normaux induisent dans les CEF, l'expression du récepteur- β du PDGF, mais pas l'expression de l'actine α -ML et ce, même après une semaine de culture. Ceci montre une activation partielle des CEF. De plus, une dédifférenciation des cellules endothéliales des sinusoides hépatiques est observée lors des cultures de tranche avec l'apparition de l'expression du CD34. Ce phénomène de "capillarisation" qui est observé dans des conditions pathologiques [Couvelard *et al.*, 1993] est aussi observé lors des cultures de tranches, suggérant à nouveau un rôle important du microenvironnement. La modification de la perfusion sanguine dans des conditions pathologiques et la disparition total du flux sanguin en culture de tranches peuvent être à l'origine de ce phénomène de "capillarisation". Enfin, une prolifération des cellules épithéliales biliaires exprimant K19 et le Ki-67 est observée dans les tranches de foies pathologiques en culture suggérant une réactivité particulière de ces cellules dans les foies pathologiques comparés aux foies normaux. Cependant, la prolifération des cellules épithéliales biliaires observée en culture ne s'accompagne pas comme *in vivo*, d'une prolifération des cellules fibroblastiques entourant les canaux biliaires avec l'apparition de myofibroblastes exprimant l'actine α -ML [Tuchweber *et al.*, 1996]. Dans ce travail, nous avons montré que, durant le remodelage du foie en culture, le comportement des cellules myofibroblastiques impliquées dans différentes conditions pathologiques sera différent selon qu'elles dérivent des CEF ou des fibroblastes portaux. Les CEF pouvant perdre l'expression de l'actine α -ML et réacquérir un phénotype plus quiescent alors que les fibroblastes portaux disparaissent par apoptose. Des études protéomiques récentes sur ces populations fibrogéniques suggèrent des fonctions différentes pour ces deux populations cellulaires au cours des processus de réparation hépatique, avec un rôle bien sûr très important des myofibroblastes dans la cicatrisation hépatique [Bosselut *et al.*, 2010]. Une analyse sur de plus nombreux cas présentant différents aspects histologiques, notamment, par exemple, des cirrhoses micronodulaires *versus* des cirrhoses macronodulaires [Wanless *et al.*, 2000], serait très importante pour conforter ces observations et obtenir de nouvelles informations. De plus, durant cette étude, nous avons montré l'intérêt de la culture de tranche de précision qui permet le maintien de l'organisation tridimensionnelle du tissu avec la préservation des interactions cellule-cellule et cellule-MEC

[de Bovenkamp *et al.*, 2007], pour étudier le comportement des différentes populations myofibroblastiques impliquées dans le développement des lésions pathologiques et le remodelage du tissu hépatique.

Chapitre 2

Proteomic analysis of differentially expressed proteins in peripheral cholangiocarcinoma

Darby, I., Vuillier-Devillers, K., Pinault, E., Sarrazy, V., Lepreux, S., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P. et Desmoulière, A. (2010). Proteomic analysis of differentially expressed proteins in peripheral cholangiocarcinoma. *Cancer Microenviron*, Online FirstTM :25 June 2010.

2.1 But de l'étude

Dans cette étude, nous avons utilisé, dans les cholangiocarcinomes, une approche protéomique pour identifier des protéines présentant des différences d'expression significatives (augmentations ou diminutions) entre le tissu non-tumoral et le tissu tumoral, afin d'identifier des marqueurs précoces de la pathologie et/ou de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

2.2 Introduction

L'incidence du cholangiocarcinome qui demeure, comparé à l'hépatocarcinome, un cancer hépatique relativement rare, ne cesse cependant d'augmenter depuis ces 30 dernières années [Bonney *et al.*, 2008]. De plus, ce cancer est particulièrement présent dans des pays où les maladies parasitaires du foie sont fréquentes [Kaewpitoon *et al.*, 2008]. Les cholangiocarcinomes ont pour origine les cellules épithéliales des canaux biliaires ou cholangiocytes. La tumeur possède une structure glandulaire constituée par les cholangiocytes malins qui sont entourés d'un stroma fibreux très important. La classification des cholangiocarcinomes est faite en fonction de la position de la tumeur dans le foie et le long des canaux biliaires :

- Carcinomes intrahépatiques (à la périphérie des canaux biliaires),
- Adénocarcinomes hilaires (ou tumeurs de Klatskin),
- Carcinomes des canaux biliaires extra-hépatiques.

Le stroma des cholangiocarcinomes est très abondant, scléreux, avec parfois, des calcifications. Le stroma peut être très extensif et devenir prépondérant par rapport aux structures tumorales. Dans la tumeur, la présence de myofibroblastes est proportionnelle à la quantité de matrice extracellulaire (MEC) déposée (fibrose) [Terada *et al.*, 1996a]. Autour de la tumeur, les cellules étoilées du foie (CEF) et/ou les fibroblastes portaux vont exprimer l'actine α -ML et se positionnent en continuité avec les myofibroblastes intra-tumoraux [Terada *et al.*, 1996a]. Comme cela est décrit lors des processus de réparation qui se développent après lésion hépatique, il est aujourd'hui bien démontré que les cellules (myo)fibroblastique (CEF, fibroblastes portaux, ...) vont sécréter la MEC et permettre également son remodelage [Okamura *et al.*, 2005] grâce à la sécrétion de MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3 et MMP-9) et de TIMPs (TIMPs-1 et TIMP-2) [Terada *et al.*, 1996b]. Plus le cholangiocarcinome sera invasif, plus l'expression des MMPs et de leurs inhibiteurs sera importante [Terada *et al.*, 1996b]. Le stroma tumoral est de plus en plus étudié car de nombreux travaux démontrent le rôle très important qu'il possède dans les phénomènes de tumorigénèse, favorisant l'invasion tumorale et le développement de métastases. Le stroma tumoral qui pendant longtemps n'a pas attiré l'attention des chercheurs, devient aujourd'hui une cible potentielle privilégiée à l'origine de nouvelles stratégies thérapeutiques [Guyot *et al.*, 2007b]. Pour tenter de mieux comprendre la pathogénèse de cette maladie et les raisons pour lesquelles un stroma très important accompagne ce type de tumeur, nous avons réalisé une analyse protéomique en comparant la tumeur au tissu non tumoral qui l'entoure afin d'identifier des protéines potentiellement impliquées dans le développement et la progression tumorale. A la suite des résultats obtenus grâce à cette étude protéomique, nous avons analysé plus particulièrement l'expression de 3 protéines : la protéine 14-3-3, l'actine α -ML et la périostine. L'actine α -ML et la périostine sont exprimées par les (myo)fibroblastes présents dans le stroma tumoral alors que la protéine 14-3-3 est exprimée par les cholangiocytes tumoraux. La protéine 14-3-3 possède un rôle de protéine adaptatrice impliquée dans la stabilisation de p53 lors du processus d'apoptose [Schumacher *et al.*, 2010]. L'actine α -ML est fortement exprimée dans les tissus fibreux et dans de nombreuses tumeurs; dans les cancers du colon, son expression est notam-

ment fortement corrélée avec un pronostic vital défavorable [Tsuji *et al.*, 2007]. La périostine est elle aussi très exprimée dans le stroma de nombreuses tumeurs et a récemment été rapportée comme étant très exprimée par les (myo)fibroblastes présents dans les cholangiocarcinomes. Elle serait par ailleurs également associée au pronostic du cholangiocarcinome [Utispan *et al.*, 2010].

2.3 Méthodologie Générale

Dans une cohorte de 14 patients, les échantillons tissulaires de 4 d'entre eux ont été sélectionnés pour réaliser l'étude protéomique car ils présentaient, d'un point de vue histologique, une organisation typique avec un stroma important et peu d'inflammation. Les échantillons de protéines ont été marqués par les cyanines 3 ou 5 puis l'étude de l'expression des protéines entre les zones tumorales et non tumorales a été réalisée pour chaque patient après séparation par électrophorèse en 2 dimensions (2-DE). Les gels ont été scannés et une analyse statistique de la différence d'expression d'environ 2500 spots présents dans les gels a été effectuée grâce au logiciel Ge Healthcare DeCyder software 5.01. Les 4 gels correspondant aux 4 patients ont été analysés séparément puis les différentes données ont été associées pour réaliser une analyse globale. Les ratios finaux entre les tissus tumoraux et les tissus non tumoraux ont été déterminés et les protéines dont le ratio était inférieur ou supérieur à 2 ont été retenues. La significativité de cette différence a été déterminée par un test-T sur les log ratio des échantillons. Les résultats obtenus ont été comparés aux résultats obtenus avec un autre logiciel (Progenesis SameSpot software version 3.2, non linear dynamics). Les différences significatives ont été exprimées entre les tissus tumoraux et non tumoraux avec un risque d'erreur de 1%, une puissance d'au moins 80% et s'ils étaient présents sur l'ensemble des gels. Les spots correspondant aux protéines exprimées de façon différente (avec les critères statistiques mentionnés ci-dessus) entre les zones tumorales et non tumorales ont été récupérés puis digérés afin d'identifier les protéines par spectrométrie de masse. L'expression de 3 protéines particulières (l'actine α -ML, la périostine et la protéine 14-3-3) a été analysée sur les 14 patients par immunohistochimie. L'expression de la périostine a également été étudiée par western blot.

2.4 Résultats principaux

2.4.1 Expression différentielle des protéines

Dans cette étude, 172 spots de protéines montraient une variation significative lors de l'analyse sur gel. Parmi eux, 49 spots représentant 70 protéines étaient sur-exprimés dans la tumeur par rapport au tissu non tumoral. Parmi les 123 spots montrant une expression diminuée, 51 spots correspondant à 68 protéines ont été analysés.

2.4.2 Protéines sous-exprimées

Beaucoup des protéines sous-exprimées dans les cholangiocarcinomes sont déjà connues comme étant sous-exprimées dans d'autres tumeurs et notamment, les carcinomes hépatocellulaires.

2.4.3 Protéines sur-exprimées

Les protéines sur-exprimées dans les cholangiocarcinomes comparées au tissu non tumoral peuvent être classées en 3 groupes distincts :

- les protéines du cytosquelette,
- les protéines impliquées dans l'apoptose ou la survie cellulaire,
- les protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire.

Parmi toutes les protéines identifiées, plusieurs sont déjà connues comme étant sur-exprimées dans plusieurs types de tumeurs et notamment, les carcinomes hépatocellulaires. L'analyse protéomique confirme que certaines protéines comme l'actine α -ML et la périostine sont bien sur-exprimées dans le stroma tumoral. D'autres protéines, comme la protéine 14-3-3 qui est impliquée dans la survie cellulaire, sont également sur-exprimées. Leur étude pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement des cholangiocarcinomes et pourrait conduire à l'élaboration de nouvelles cibles thérapeutiques.

2.4.4 Immunohistochimie

Confirmant l'analyse protéomique, nous avons montré que l'expression de l'actine α -ML, de la protéine 14-3-3 et de la périostine est très importante dans le tissu tumoral. Dans la tumeur, la protéine 14-3-3 est exprimée uniquement par les cholangiocytes tumoraux. Dans le tissu non tumoral, certains cholangiocytes l'expriment également mais plus faiblement. L'actine α -ML est très fortement exprimée par les myofibroblastes présents dans le stroma autour de la tumeur, mais également par les myofibroblastes infiltrés dans la tumeur. Dans le tissu non tumoral, l'actine α -ML est très peu exprimée. Son expression est classiquement retrouvée dans les cellules musculaires lisses vasculaires, notamment autour des veines centrilobulaires et autour des veines et des artères portales. La périostine qui est une protéine de la MEC est très présente à proximité des myofibroblastes présents dans le stroma péri-tumoral et entre les cholangiocytes tumoraux. La périostine n'est pas exprimée dans le tissu non tumoral. Des doubles marquages pour l'actine α -ML et la périostine montre une colocalisation au niveau des myofibroblastes péri- et intra-tumoraux.

2.5 Discussion

Dans cette étude, nous avons comparé les protéines exprimées dans la tumeur et dans le tissu non tumoral prélevé à distance de la tumeur. Les cholangiocarcinomes étant des tumeurs relativement rare et les échantillons à disposition étant peu nombreux, nous avons décidé de réaliser cette étude sur des échantillons présentant des critères histologiques typiques. L'analyse sur gel 2D a montré, pour les 4 patients étudiés, une large gamme de protéines exprimées de façon différente dans les zones tumorales et non tumorales. Nos résultats ont confirmé pour certaines de ces protéines, des observations déjà réalisées dans des modèles expérimentaux ou d'autres tumeurs comme les cancers du colon ou les hépatocarcinomes [Kim *et al.*, 2006, Rousseau *et al.*, 2007, Ioannou *et al.*, 2007, Loilome *et al.*, 2006]. La majorité des protéines sur-exprimées dans la zone tumorale sont des protéines du cytosquelette ou impliquées dans le métabolisme, l'apoptose ou la survie cellulaire. Les protéines sous-exprimées sont quant à elles majoritairement des protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire. Parmi les protéines sur-exprimées, la sous unité ribosomale P0 est impliquée dans la prolifération du cancer du sein [Chang *et al.*, 2008], l'alpha-actinine 4, l'annexine V, le facteur d'élongation 1 delta et l'ezrine sont impliquées

dans le développement des hépatocarcinomes [Nishiyama *et al.*, 1990, Fella *et al.*, 2005, Shuda *et al.*, 2000, Zhang *et al.*, 2006]. Nous avons montré pour la première fois que la protéine 14-3-3 et la périostine sont fortement exprimées dans les cholangiocarcinomes. La protéine 14-3-3 joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire et la suppression de l'apoptose [Masters *et al.*, 2001, Fan *et al.*, 2007] et pourrait peut-être constituer un marqueur permettant d'évaluer l'évolution de la tumeur. De plus, la protéine 14-3-3 sigma peut être sécrétée via des exosomes et induire l'expression des MMP-1 et MMP-3 qui participent à la migration cellulaire et augmentent le pouvoir invasif de la tumeur [Chavez-Muñoz *et al.*, 2008]. La périostine est connue comme étant exprimée dans le stroma des mélanomes [Tilman *et al.*, 2007] et des cancers du colon [Bao *et al.*, 2004]. Nous avons montré que la périostine est exprimée de façon très importante dans le stroma des cholangiocarcinomes par les myofibroblastes. Des études récentes ont montré que la périostine pouvait induire la migration cellulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse dans des cellules cancéreuses pancréatiques [Kanno *et al.*, 2008]. De plus, un taux élevé de périostine est présent dans le sérum des patients souffrant de cancer du thymus ou de cancer du sein avec métastase osseuse [Sasaki *et al.*, 2003]. La détection de la périostine et d'autres molécules sur-exprimées comme la protéine 14-3-3 pourrait être éventuellement utile pour suivre l'évolution d'une tumeur, et notamment des cholangiocarcinomes.

Aujourd'hui, les cholangiocarcinomes ont une incidence en très nette augmentation et toute la difficulté réside dans le diagnostic précoce de la maladie. Dans cette étude, nous avons mis en évidence un certain nombre de protéines qui pourraient avoir un rôle dans le développement et la progression des tumeurs. Certaines de ces protéines fortement exprimées dans les zones tumorales au niveau des cholangiocarcinomes, sont également retrouvées dans d'autres types de cancers et pourraient éventuellement devenir de nouveaux marqueurs biologiques. Bien sûr, des études complémentaires sont nécessaires pour établir des corrélations entre l'expression de ces protéines et le développement ou le pronostic de la maladie.

Chapitre 3

Mise en place de modèles de lésion
du système nerveux central *in vitro*
et *in vivo*

3.1 But de l'étude

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux mécanismes impliqués dans la réparation du système nerveux central (ou SNC). Nous avons plus particulièrement étudié les rôles joués par les astrocytes et les processus mis en jeu lors de leur activation. Plus précisément, les effets de l'activation de la voie Fas sur la mort, et la prolifération astrocytaire, ainsi que sur la sécrétion des MMP-2 et -9 et de TIMP-1, ont été analysés.

Lors de cette étude, nous avons mis en place deux modèles de lésion du SNC :

- D'une part, un modèle *in vitro* de culture d'astrocytes de rats activés ou non par du lipopolysaccharide (LPS) ; dans ce travail, nous avons également séparé différentes populations d'astrocytes à l'aide d'une technique de tri par fractionnement par couplage flux/force de sédimentation (SdFFF).
- D'autre part, un modèle *in vivo* de lésion contrôlée du cortex cérébral chez le rat dont nous avons testé la reproductibilité grâce à la mise en place de tests fonctionnels. De plus, ce modèle *in vivo* a été développé pour tester différentes substances présentant éventuellement des effets neuroprotecteur et/ou neurorégénérateur en interagissant avec des molécules comme le TGF- β qui est connu pour son action sur la MEC, notamment au niveau du système MMPs/TIMPs.

3.2 Introduction

Qu'elles soient d'origine traumatique, neurodégénérative (maladie d'Alzheimer et maladie de Parkinson) ou ischémique, les lésions du système nerveux central (SNC) constituent chez l'Homme une importante source de mortalité et de morbidité. Parmi ces différentes lésions, celles d'origine traumatique représentent la principale cause de décès chez l'enfant et le jeune adulte [Ghajar, 2000]. Par ailleurs, on considère qu'environ 150 000 personnes sont touchées chaque année en France par un traumatisme crânien nécessitant une prise en charge spécifique. Les lésions traumatiques du cerveau constituent donc un enjeu scientifique, médical et socio-économique considérable pour les sociétés modernes [Ghajar, 2000]. Cependant, notre compréhension incomplète des processus de gliose réactionnelle qui permettent le maintien de l'intégrité du tissu lésé mais inhibent la repousse axonale, constitue un frein important au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

3.2.1 Les cellules du système nerveux central

Les cellules composant le SNC sont classées en deux groupes distincts, les neurones et les cellules gliales (la névroglie). Ces dernières sont elles-mêmes subdivisées en 4 types de cellules : les oligodendrocytes, les cellules épendymaires, les cellules microgliales (ou microglie) et enfin les astrocytes.

Les neurones

Les neurones se distinguent des autres cellules de l'organisme par leur capacité unique à donner naissance à des informations et à les transmettre rapidement sur de grandes distances. Les neurones représentent environ 10 % des cellules totales du SNC. Ils possèdent quatre éléments constitutifs : les dendrites, le soma, l'axone, et les terminaisons synaptiques. Les dendrites reçoivent l'information venant d'autres neurones et la conduisent vers le soma. Le soma intègre l'information venant de ses multiples dendrites et émet un

influx électrochimique. Ces influx sont transportés le long de l'axone jusqu'aux terminaisons synaptiques, ou jonctionnelles, qui entrent en contact avec d'autres neurones ou avec d'autres effecteurs tels que les muscles ou le système endocrinien.

Les cellules gliales

Les cellules gliales sont indispensables au maintien de l'environnement biochimique des neurones. Ainsi, les cellules gliales maintiennent le pH et l'osmolarité des liquides extracellulaires. De plus, elles améliorent la conduction axonale des influx électrochimiques, modulant la neurotransmission au niveau des jonctions synaptiques, et facilitent la régénération des nerfs après des lésions nerveuses périphériques, notamment en guidant l'axone lors d'une repousse et en réorganisant le réseau neuronal.

La microglie

La microglie (ou microgliocytes) représente approximativement 13 % des cellules du SNC. Ce sont de petites cellules qui appartiennent à la famille des macrophages. Quand le tissu du SNC est lésé, les cellules microgliales migrent vers la région atteinte où elles prolifèrent et phagocytent les débris cellulaires.

Les cellules épendymaires

Ce sont des cellules épithéliales situées dans les ventricules. Certaines d'entre elles forment des structures anatomiques appelées les plexus choroïdes synthétisant ainsi le liquide céphalo-rachidien LCR. La surface des cellules épendymaires est constituée de petits prolongements cytoplasmiques, des cils, dont le battement favorise le déplacement du LCR.

Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont des cellules gliales hautement spécialisées, formant la gaine de myéline qui entoure les axones du SNC. Les oligodendrocytes représentent environ 32 % des cellules du SNC. Ils se trouvent dans tous les principaux faisceaux de fibres du SNC. Chaque oligodendrocyte possède plusieurs prolongements, dont chacun isole une petite portion d'un seul axone, optimisant ainsi la conduction de l'influx nerveux.

Les astrocytes

Les astrocytes possèdent de nombreux prolongements ramifiés qui leur donnent un aspect étoilé et ils représentent environ 45 % des cellules du SNC. Les astrocytes sont en contact avec les autres types cellulaires par le biais de pieds astrocytaires et se rejoignent fréquemment pour former une barrière secondaire qui isole un peu plus le SNC des autres tissus. Les « pieds » couvrent également les cellules endothéliales de la plupart des vaisseaux du parenchyme cérébral et forment avec les capillaires sanguins la barrière hémato-encéphalique (BHE). Les astrocytes présentent 3 principales caractéristiques. Tout d'abord, ils contiennent des filaments intermédiaires particuliers, les gliofilaments, groupés en faisceaux, et composés d'une protéine spécifique des astrocytes (dans le cerveau) : la GFAP ("glial fibrillary acidic protein" ou protéine acide gliofibrillaire). Ensuite, les astrocytes présentent des grains de glycogène, absents des autres cellules nerveuses, et qui sont disséminés dans le corps cellulaire et les prolongements astrocytaires. Enfin, ils présentent des jonctions inter-astrocytaires de type "gap" qui permettent la signalisation

intercellulaire via des canaux jonctionnels. Ces jonctions sont le support anatomique des réseaux astrocytaires. Les astrocytes jouent un rôle de soutien architectural et de maintien de l'homéostasie des neurones. Ils interviennent également lors de la transmission synaptique et jouent un rôle important de filtration au niveau de la BHE. Ils interagissent avec les méninges et contrôlent la qualité du LCR. Enfin, ils jouent un rôle important lors de la réparation des lésions du SNC.

3.2.2 Physiopathologie du traumatisme crânien

Les traumatismes crâniens sont provoqués principalement par des chutes, des accidents domestiques ou des accidents de la route, ces derniers étant responsables à eux seuls chaque année de 3 à 5 000 cas de traumatismes graves en France [Ghajar, 2000]. Lorsqu'ils ne sont pas mortels, ces traumatismes entraînent des séquelles de nature et de gravité très variées, comme des déficits cognitifs (problèmes de langage, pertes de mémoire...), moteurs ou émotionnels. Ainsi, 20 à 30 % des patients gardent des séquelles permanentes ne leur permettant pas un retour à une qualité de vie normale [Thornhill *et al.*, 2000]. Les lésions induites par un traumatisme crânien sont très hétérogènes et particulièrement dynamiques et peuvent engendrer de nombreux processus physiopathologiques. En effet, les atteintes primaires, induites au moment de l'impact, sont généralement suivies de nombreux dommages secondaires. Parmi ces lésions secondaires, il peut y avoir formation d'une dépolarisation anormale engendrée par un afflux massif d'ions entraînant l'apparition d'un œdème. Il en résulte une forte libération d'acides aminés excitateurs qui peut induire des phénomènes d'excitotoxicité. D'autres processus peuvent être observés comme une rupture de la BHE ainsi que des phénomènes ischémiques. Ces mécanismes, dits secondaires, conduisent à la mort neuronale ainsi qu'à l'activation des cellules de la microglie et des cellules astrocytaires (pour revue : [Jain, 2008]). Ces phénomènes contribuent à la réduction du volume du tissu cérébral et au développement d'une gliose réactionnelle, processus qui sont généralement considérés comme les principaux facteurs responsables des déficits neurologiques observés à la suite d'un traumatisme crânien [Faden, 2002].

3.2.3 Gliose réactionnelle

De nombreuses données expérimentales ont permis de définir le phénomène de gliose réactionnelle comme un processus présentant 4 caractéristiques [Sofroniew, 2009]. Premièrement, la gliose réactionnelle est caractérisée par une phase de modifications fonctionnelles des astrocytes s'exprimant à l'échelle moléculaire, comme une augmentation de l'expression de la GFAP, ou cellulaire et apparaissant en réponse à toute forme de lésion ou de maladie du SNC [Pekny et Nilsson, 2005]. Deuxièmement, les changements subis par les astrocytes réactifs varient avec la sévérité de la lésion, allant de simples altérations au niveau moléculaire à des hypertrophies cellulaires, voire, dans des cas beaucoup plus graves, à une prolifération et à la formation d'une cicatrice. Troisièmement, les changements de la gliose réactionnelle sont régulés de manière spécifique au contexte par des signaux intra- et intercellulaires. Enfin, les changements subis lors de la gliose réactionnelle peuvent altérer l'activité des astrocytes autant par des gains que par des pertes de fonctions, induisant des effets bénéfiques ou délétères sur les cellules environnantes [Sofroniew, 2009]. Bien que le rôle fonctionnel de cette réaction astrocytaire ne soit pas complètement élucidé, on considère généralement qu'elle pourrait constituer une tentative de rétablissement de l'intégrité du tissu cérébral en isolant la région endommagée par sécrétion excessive de MEC [Sofroniew et Vinters, 2010]. En effet, les astrocytes actifs participent à la phagocytose des débris cellulaires issus de la lésion et combler les espaces extracellulaires vides résultant de la dégénérescence des cellules neuronales

et gliales. Cependant, cet environnement post-lésionnel constitue également une barrière physique empêchant la migration du cône de croissance et une barrière chimique inhibant l'élongation axonale. Le phénomène de gliose réactionnelle s'oppose donc également à la réparation neuronale et entrave ainsi la restauration des fonctions physiologiques altérées par la lésion [McGraw *et al.*, 2001]. Une meilleure connaissance des processus de remodelage du tissu cicatriciel pourrait par conséquent permettre de définir de nouvelles approches thérapeutiques pour améliorer le traitement des traumatismes du SNC.

3.2.4 Métalloprotéases matricielles

Les métalloprotéases matricielles (MMPs) (Voir Partie I, Chapitre 4) constituent une famille multigénique d'endopeptidases dépendantes du zinc et du calcium dont on dénombre aujourd'hui 26 membres [Nagase *et al.*, 2006]. La plupart des MMPs est sécrétée sous forme de zymogènes inactifs ou pro-enzymes qui sont activés par des protéases ou d'autres MMPs. Dans les tissus, l'activité protéolytique des MMPs est contrôlée par les TIMPs (« tissue inhibitors of metalloproteinases ») qui constituent une famille de 4 membres (TIMP1, 2, 3 et 4). Les MMPs contrôlent par clivage protéolytique la formation de certains composants de la MEC parmi lesquels le collagène, la laminine, les protéoglycanes ainsi que l'activité de molécules membranaires ou solubles impliquées dans la transmission des signaux intracellulaires telles que des cytokines, des facteurs trophiques, des protéines d'adhésion et différents récepteurs. Les MMPs ont une distribution large au sein de l'organisme et elles permettent un contrôle de l'environnement péricellulaire en assurant par exemple le remodelage du tissu cicatriciel au niveau dermique, rénal ou hépatique [Desmoulière *et al.*, 2003]. Le système des MMPs et des TIMPs est ainsi notamment impliqué dans la prolifération cellulaire, la différenciation, l'angiogénèse et l'apoptose [Mannello et Gazzanelli, 2001]. Au sein du SNC, 4 MMPs ont été identifiées (la MMP-2, la MMP-3, la MMP-7 et la MMP-9), les plus étudiées étant la MMP-2 (gélatinase A) et la MMP-9 (gélatinase B) du fait de leur large distribution [Rosell et Lo, 2008]. Ces MMPs dégradent spécifiquement le collagène de type IV, la laminine et la fibronectine, principaux constituants de la membrane basale des vaisseaux sanguins. Elles sont sécrétées sous forme pro-MMPs par les cellules endothéliales, les astrocytes et les neurones. La concentration des TIMPs dépasse généralement de loin celle des MMPs dans les tissus et les liquides extracellulaires, limitant de ce fait leur activité protéolytique. Il se forme ainsi une balance entre l'activité des MMPs et des TIMPs qui détermine le potentiel de dégradation de la MEC. Les variations d'expression de ces molécules permettraient par ailleurs la mise en place de certaines structures du cerveau au cours du développement comme le cervelet [Vaillant *et al.*, 1999] et pourraient être impliquées dans les processus de plasticité neuronale [Galko et Tessier-Lavigne, 2000]. Des données croissantes indiquent en outre que les MMPs sont surexprimées dans diverses pathologies cérébrales, notamment lors des traumatismes crâniens. En effet, *in vitro*, il a été montré une augmentation de la sécrétion de la MMP-2 et de la MMP-9 dans des cultures corticales après simulation d'une lésion mécanique [Wang *et al.*, 2002]. *In vivo*, chez le rat immature, l'utilisation d'inhibiteurs de la MMP-2 atténue sensiblement les lésions cérébrales traumatiques d'une manière dose-dépendante [Sifringer *et al.*, 2007]. Chez l'Homme, une augmentation des concentrations de la MMP-2 et de la MMP-9 est observée dans le liquide céphalorachidien ainsi que dans le compartiment plasmatique suite à un traumatisme crânien [Vilalta *et al.*, 2008].

3.2.5 Transforming Growth Factor- β

Le Transforming Growth Factor- β (TGF- β) est un facteur de croissance qui joue un rôle pléiotrope au sein de l'organisme [Javelaud et Mauviel, 2004] et qui est impliqué dans de nombreux processus physiologiques essentiels comme le développement embryonnaire, la réparation tissulaire, la différenciation ou encore le contrôle de la croissance cellulaire [Böttner *et al.*, 2000]. Il existe trois isoformes du TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3) codées par trois gènes distincts. Les réponses cellulaires aux différents membres de la famille du TGF- β sont initiées par des récepteurs membranaires de types sérine-thréonine kinase qui activent en aval les facteurs de transcription de la famille Smad [Javelaud et Mauviel, 2004]. D'un point de vue fonctionnel, l'implication de ces 3 isoformes a été montré dans des pathologies telles que la fibrose [Varga, 2002], les maladies neurodégénératives [Flanders *et al.*, 1998] ou la carcinogenèse [de Caestecker *et al.*, 2000]. Néanmoins, le TGF- β 1 semble plus particulièrement impliqué dans les processus physiopathologiques post-lésionnels [Krieglstein *et al.*, 2002]. Dans le SNC, le TGF- β 1 peut être sécrété par les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules de la microglie ; il est généralement stocké sous une forme latente dans la matrice extracellulaire [Lesné *et al.*, 2002]. Dans la physiopathologie du traumatisme crânien, son implication a été mise en évidence dans les phénomènes inflammatoires en permettant l'activation des cellules de la microglie [Lesné *et al.*, 2002]. Il participe aussi aux mécanismes de réparation tissulaire en favorisant l'activation des astrocytes ainsi que leur migration au sein du tissu vers la zone lésée. Une autre fonction importante du TGF- β 1 est de réguler l'expression des protéines de la MEC au niveau du site de la lésion en inhibant la production des MMPs et en augmentant l'expression d'inhibiteurs de protéases comme les TIMPs [Verrecchia et Mauviel, 2002, Brionne *et al.*, 2003]. Le TGF- β 1 augmente ainsi le dépôt de MEC, composé principalement de protéoglycanes sécrétés par les astrocytes activés, favorisant par conséquent la formation de la cicatrice gliale [Moon et Fawcett, 2001]. Un effet neuroprotecteur est par ailleurs également attribué au TGF- β 1. Des études montrent en effet qu'il joue un rôle de protection au niveau des neurones glutamatergiques lors de phénomènes d'excitotoxicité en modulant l'expression des récepteurs de type NMDA [Buisson *et al.*, 1998, Docagne *et al.*, 2003]. Il joue aussi un rôle anti-apoptotique en diminuant la présence des récepteurs dits de mort cellulaire tels que le récepteur Fas [Stuart *et al.*, 2004].

3.3 Etude *in vitro*

3.3.1 Matériel et Méthodes

Animaux

Les animaux utilisés lors des prélèvements de tissu cérébral appartiennent à la souche Sprague Dawley (élevage Despres, France). Les manipulations sur les rats ont été réalisées conformément à la réglementation en vigueur définie par le ministère de l'agriculture et la direction des services vétérinaires.

Culture cellulaire

Les animaux nouveau-nés sont sacrifiés 3 jours après leur naissance (P3) par décapitation. Le cortex est prélevé (Figure 3.1) sur les différentes coupes de cerveau, puis stocké dans du milieu HBSS.

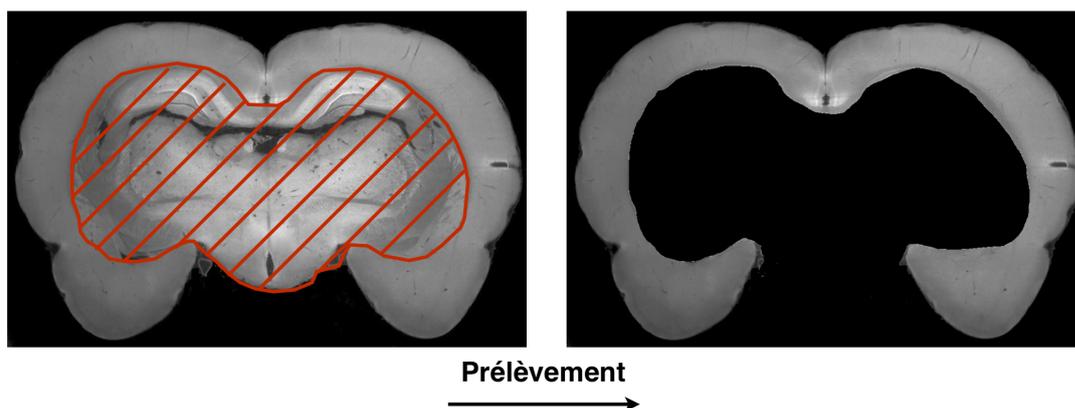


FIGURE 3.1 – Technique de prélèvement du cortex. Photos de l'Institut Paul Scherrer (Suisse) adaptées pour le manuscrit.

Les cortex sont dissociés mécaniquement et les cellules sontensemencées dans 15 mL de milieu de culture (DMEM, Invitrogen, USA) supplémenté avec 10 % sérum de veau foetal, 1 % L-glutamine, 1 % acides aminés non essentiels et 1 % penicilline/streptomycine dans des flasques de 75cm² (F75, Nunc, USA) à la concentration de 33.10^3 cellules/mL, soit 500.10^3 cellules/flasque. Les flasques sont incubées à 37°C avec 5 % de CO₂ sous atmosphère humide. Les flasques sont agitées 45 min chaque jours afin de décoller les cellules les moins adhérentes comme les neurones, la microglie et les oligodendrocytes dans le but d'enrichir les cultures en astrocytes. Le milieu est changé une fois par semaine jusqu'à confluence [Taylor *et al.*, 2007].

Séparation des sous populations d'astrocytes par SdFFF

Après séparation, la population totale (passage des cellules dans l'appareil sans réalisation du tri) et les différentes fractions (F1, F2 et F3) (Figure 3.2) sont remises en culture de la même manière que pour les cellules cultivées sans séparation (Annexe A).

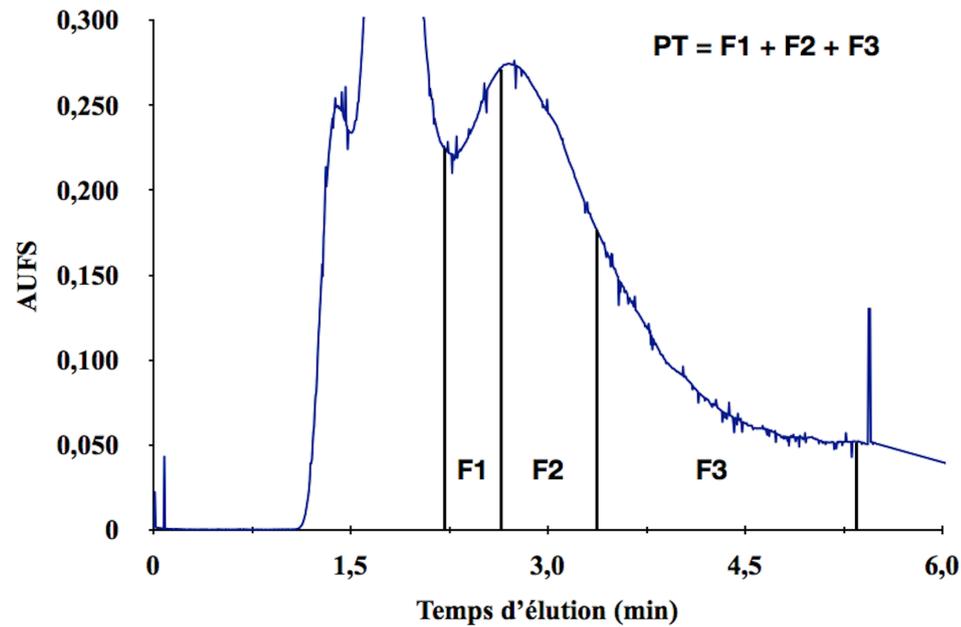


FIGURE 3.2 – Fractogramme type obtenu lors du passage des échantillons en SdFFF. Schématisation des fractions récupérées après SdFFF.

Traitements

Les cellules sont traitées 24 h avec un anticorps agoniste du récepteur Fas (clone JO2, BD Pharmingen, Paris, France) à la concentration de 20 ng/mL. La simulation du contexte lésionnel *in vitro* est effectuée en traitant les cellules avec du LPS à la concentration de 150 ng/mL (LPS, Sigma-aldrich, France). Cette activation des cultures astrocytaires par le LPS mime, au moins partiellement, l'activation des astrocytes présente lors d'une lésion du SNC.

Tests de viabilité

Les cellules sont ensemencées en plaques 96 puits à la concentration de 10 000 cellules/puits, puis cultivées pendant une semaine. La viabilité cellulaire a été évaluée en utilisant un test XTT ((sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) (Roche applied science, Meylan, France) en suivant les recommandations du fournisseur. Le test est basé sur la capacité métabolique des cellules vivantes à réduire le sel de tetrazolium en formazan, composé soluble détectable grâce à un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 450 nm. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle au nombre de cellules viables et ce test peut donc être également utilisé pour évaluer la prolifération cellulaire [Mosmann, 1983].

Analyse de la mort cellulaire

L'apoptose des cellules a été mesurée grâce au dosage des nucléosomes cytoplasmiques solubles présents dans les cellules apoptotiques. Pour cela, le kit Cell Death Detection ELISA PLUS (Roche Applied Science) a été utilisé selon les recommandations du fournisseur.

Test de plaie *in vitro*

Les tests de plaie *in vitro* ont été réalisés en pratiquant des scratches dans un tapis cellulaire à confluence ou grâce à des inserts en silicone ibidi[®] (Biovalley, Marne-la-Vallée, France) comme décrit par le fournisseur.

Immunocytochimie

Une fois les cellules arrivées à confluence, les cellules sont remises en culture dans des microplaques de 48 puits (Nunc, USA) contenant des lamelles de verre de 10 mm de diamètre à raison de $60 \cdot 10^3$ cellules/mL. Après 1 semaine de culture, les cellules sont traitées pendant 24 h puis fixées 30 min à température ambiante avec du paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich, France) préparé à 4 % w/v dans du PBS 1X. Puis 2 h de saturation avec du PBS 1X 3 % BSA sont effectuées. Les cellules sont ensuite incubées dans la BSA 4 % pendant une nuit à 4°C avec un anticorps primaire dilué à la concentration de travail conseillée par le fournisseur (Table 3.1).

Ac Anti-	Dilution	Espèce	Clone	Cible	Fournisseur
TIMP-1	1/100	Lapin	H-150	TIMP-1	Santa Cruz
GFAP	1/2000	Lapin	-	Astrocytes	Dako-Cytomation
GFAP	1/500	Souris	-	Astrocytes	Invitrogen
Actine α -musculaire lisse	1/2000	Souris	-	Myo-fibroblastes	Sigma
MMP-2	1/200	Souris	MMP-2/8B4	MMP-2	Abcam
MMP-9	1/500	Lapin	-	MMP-9	Abcam
O4	1/1000	Souris	O4	Oligo-dendrocytes	R&D
β -Tubuline III	1/2000	Souris	5G8	Neurones	Promega
F4/80	1/200	Rat	CI :A3-1	Microglie	Biolegend

TABLE 3.1 – Anticorps primaires utilisés pour l'immunocytochimie.

L'anticorps primaire est retiré. Les cellules sont incubées 2 h à température ambiante avec les anticorps secondaires (Alexa fluor 594 : fluorescence rouge et Alexa fluor 488 : fluorescence verte, Molecular Probes Invitrogen, USA) selon les recommandations du fournisseur. Un contre marquage nucléaire au 4',6'-Diamidino-2-Phénylindole dihydrochloride (DAPI, Sigma-Aldrich, France) à 1 μ g/mL est effectué. Les lames sont montées avec du milieu de montage pour fluorescence (fluorescent mounting medium, DakoCytomation, USA). L'analyse des résultats s'effectue sous un microscope à fluorescence (Leica, Allemagne), et l'acquisition des images est réalisée grâce à une caméra numérique et au logiciel informatique d'acquisition Pixia. Le comptage standardisé des différentes populations sur chaque lamelle est effectué à raison de trois champs par lamelle. Le traitement des résultats obtenus est réalisé grâce au logiciel de traitement d'images The Gimp (GNU Image Manipulation Program).

Western blot

Une fois les cellules arrivées à confluence, les cellules sont remises en culture dans des microplaques de 6 puits à raison de 100.10^3 cellules/mL. Après 1 semaine de culture, les cellules sont traitées pendant 24 h puis l'extraction des protéines est réalisée. La détection des MMP a été réalisée sur gel SDS-PAGE. Les concentrations des gels de concentration et de migration sont respectivement de 4 % et 12 %. Les protéines ont été transférées sur membrane de PVDF. Le transfert et la charge sont contrôlés par le rouge Ponceau. La membrane est ensuite incubée avec les anticorps primaires décrits dans la Table 3.2.

Ac Anti-	Dilution	Espèce	Clone	Cible	fournisseur
MMP-2	1/200	Souris	MMP-2/8B4	MMP-2	Abcam
MMP-9	1/500	Lapin	-	MMP-9	Abcam

TABLE 3.2 – Anticorps primaires utilisés pour le Western Blot.

Les membranes sont incubées 1 h 30 à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à l'HRP (HorseRadish Peroxidase, Table 3.3).

Ac Anti	Dilution	Espèce	Clone	Cible	fournisseur
Lapin	1/2000	Chèvre	-	Anticorps de lapin	DakoCytomation
Souris	1/1000	Chèvre	-	Anticorps de souris	DakoCytomation

TABLE 3.3 – Anticorps secondaires.

La détection a été effectuée avec l'ECL Plus detection kit (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) comme décrit par le fournisseur.

Analyse statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant les logiciels PAST (PALaeontological STatistics) et Sigma Stats (SPSS, USA). Les moyennes de chaque condition ont été comparées entre elles en utilisant le test statistique approprié.

3.3.2 Résultats

Caractérisation des cultures primaires d'astrocytes

Afin de déterminer la proportion de chaque type cellulaire présent dans les cultures primaires, nous avons réalisé une révélation immunocytochimique avec les différents marqueurs caractéristiques des cellules composant le cortex cérébral : la β -tubuline III (neurones), la GFAP (astrocytes), F4/80 (la microglie) et O4 (les oligodendrocytes). Nous avons ensuite déterminé le pourcentage de chaque population par rapport au nombre total de cellules présentes.

Le pourcentage de cellules de la névroglie classiquement présent dans le cerveau est d'environ 90 % avec environ 50 % d'astrocytes. Après 3 semaines de culture sous agitation régulière (45 min par jour), nous obtenons une population d'astrocytes représentant environ 85 % des cellules totales (Figure 3.3). Nous avons donc un enrichissement qui va nous permettre de nous assurer que les résultats obtenus lors des manipulations ultérieures sont majoritairement représentatifs de la population astrocytaire.

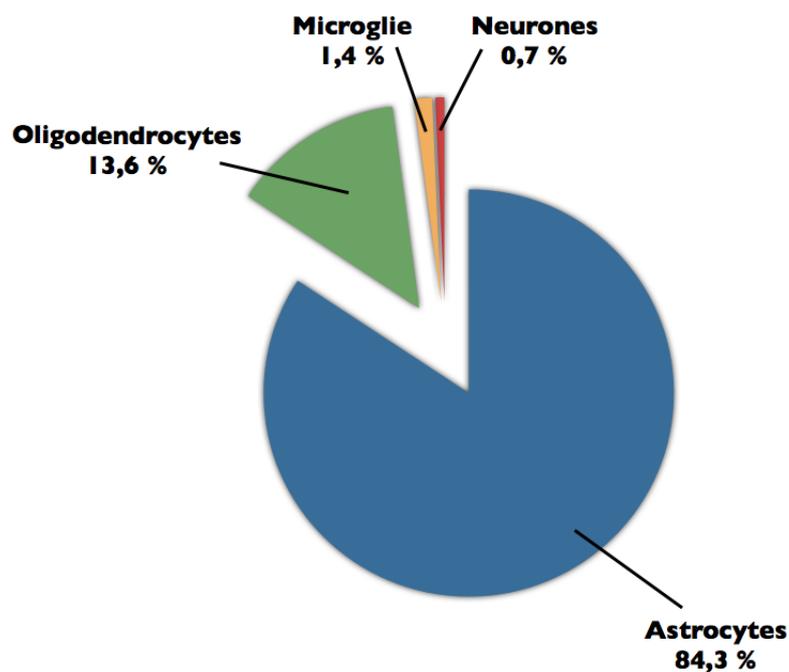


FIGURE 3.3 – Pourcentage des différents types cellulaires présents dans les cultures primaires d'astrocytes de rats après 3 semaines de remise en culture sous agitation.

Apoptose dans les cultures primaires

Nous avons procédé au traitement des cultures astrocytaires avec un anticorps agoniste de la voie pro-apoptotique Fas. En premier lieu, nous avons vérifié la réponse des cultures à l'activation de cette voie ainsi qu'à l'activation des astrocytes par le LPS (Figure 3.4).

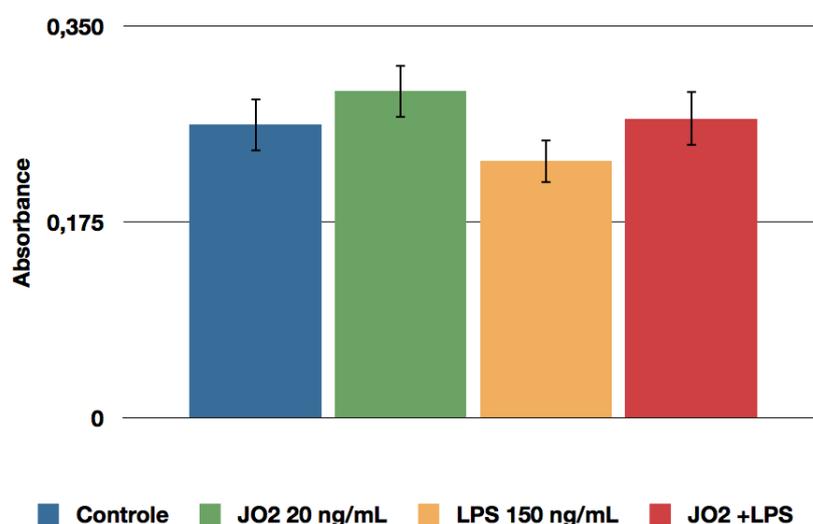


FIGURE 3.4 – Quantification de l'apoptose dans les cultures primaires après activation de la voie Fas par un anticorps agoniste JO2 (20 ng/mL) et/ou activation astrocytaire par le LPS (150 ng/mL).

Nous n'avons pas enregistré de modifications significatives de l'apoptose dans nos cultures quelque soit le traitement. Dans nos conditions, aucune induction de l'apoptose n'est donc

observée.

Prolifération astrocytaire

Nous avons ensuite étudié la viabilité que nous avons corrélée à la prolifération (Figure 3.5). L'activation de la voie Fas entraîne une augmentation significative de la prolifération

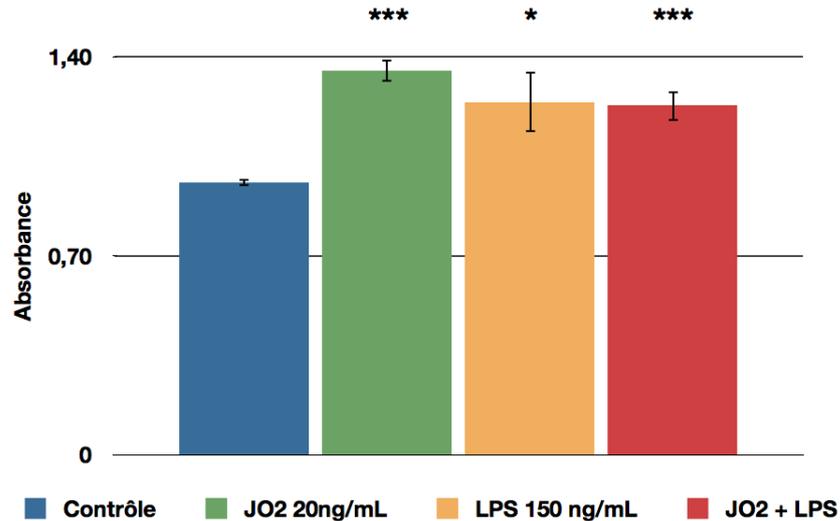


FIGURE 3.5 – Test de prolifération astrocytaire dans les cultures primaires après activation de la voie Fas par un anticorps agoniste JO2 (20 ng/mL) et/ou activation astrocytaire par le LPS (150 ng/mL). ** $p < 0,05$ vs control, *** $p < 0,001$ vs control

astrocytaire. Nous avons également observé, comme cela est décrit dans la littérature, une augmentation significative de la prolifération astrocytaire après traitement par le LPS. Lors de l'activation concomitante des deux voies, cette augmentation de la prolifération est aussi présente; cependant, nous n'avons pas observé de différence significative entre les différents traitements.

Expression des MMPs et de TIMP-1

Nous avons ensuite étudié la modification de l'expression de la MMP-2, de la MMP-9 et de TIMP-1, les 3 acteurs majeurs du remodelage matriciel au cours de la réparation du SNC.

Localisation cytoplasmique Nous avons tout d'abord regardé si l'activation de la voie Fas et le traitement par le LPS pouvait modifier la localisation cytoplasmique de ces 3 molécules.

Quelque soit le traitement, nous n'avons pas enregistré de modification de la localisation cytoplasmique de la MMP-2, de la MMP-9 et de TIMP-1 que se soit en immunofluorescence classique (Figure 3.6) ou en microscopie confocale (données non montrées).

Expression de la MMP-2 et de la MMP-9 Nous avons ensuite réalisé des western blots pour étudier plus précisément l'expression de ces 3 acteurs.

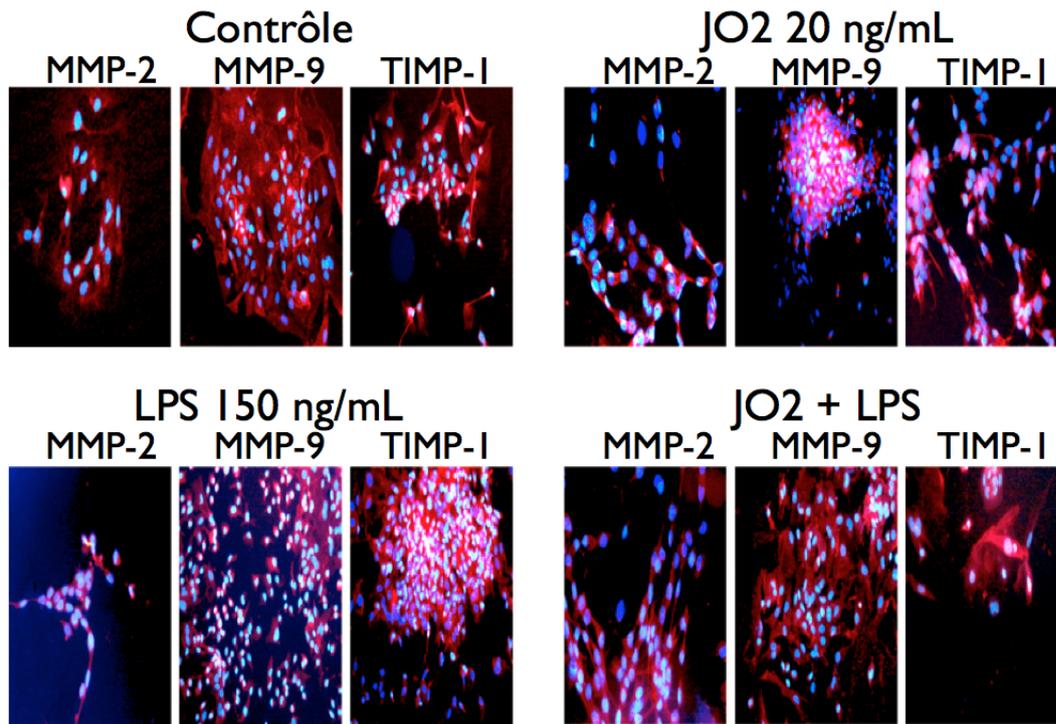


FIGURE 3.6 – Localisation cytoplasmique de la MMP-2, de la MMP-9 et de TIMP-1 lors de l'activation de la voie Fas par un anticorps agoniste JO2 (20 ng/mL) et/ou activation astrocytaire par le LPS (150 ng/mL).

Lors de cette étude, nous avons observé uniquement la présence de la pro-MMP-2 dans les lysats cellulaires. Quelque soit le traitement, nous n'avons pas observé de variation significative de l'expression de la pro-MMP-2 (Figure 3.7).

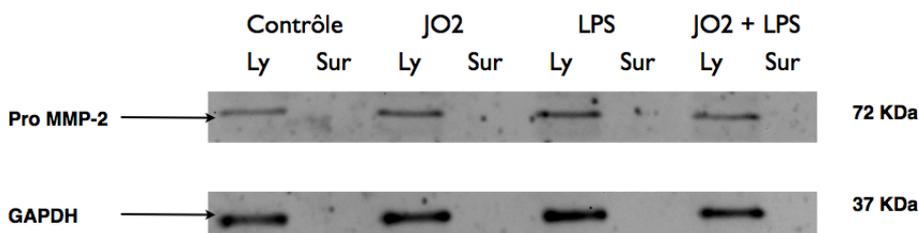


FIGURE 3.7 – Expression de la MMP-2 lors de l'activation de la voie Fas par un anticorps agoniste JO2 (20 ng/mL) et/ou activation astrocytaire par le LPS (150 ng/mL).

Sur : surnageants, Ly : lysat

En ce qui concerne la MMP-9, nous avons observé la présence, comme pour la MMP-2, de la pro-forme de la molécule dans les lysats cellulaires. Quelque soit le traitement, il n'y a pas de variation significative de l'expression de la pro-MMP-9 (Figure 3.8). Par contre, nous avons observé la forme active de la MMP-9 dans les surnageants de culture et ce, dans toutes les conditions. Nous avons observé une diminution de l'expression de la forme active de la MMP-9 lors de l'activation de la voie Fas par l'anticorps agoniste et lors de l'activation des astrocytes par le LPS. Cet effet est potentialisé par l'activation concomitante des astrocytes par l'anticorps anti-Fas et le LPS (Figure 3.8).

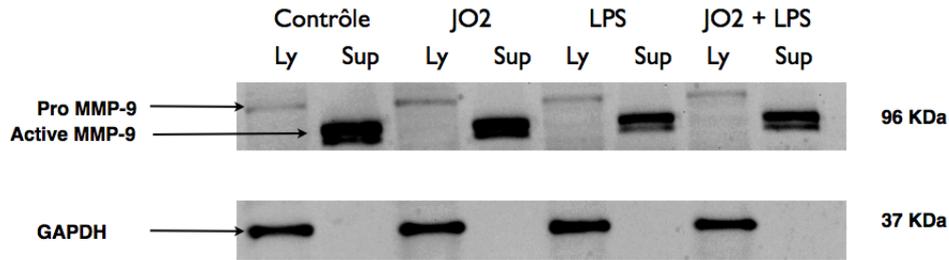


FIGURE 3.8 – Expression de la MMP-9 lors de l'activation de la voie Fas par un anticorps agoniste JO2 (20ng/mL) et/ou activation astrocytaire par le LPS (150 ng/mL).
Sur : surnageants, Ly : lysat

Expression de TIMP-1 Quelque soit les conditions, nous n'avons pas détecté d'expression de TIMP-1 en western blot.

Séparation des astrocytes par SdFFF

Après séparation des cellules du cortex par SdFFF, nous avons étudié après 1 semaine de culture contrairement aux 3 semaines nécessaires lors de la méthode de culture classique, en plus de la population totale (PT), 3 fractions distinctes (F1, F2, F3). La PT est composée à 74 % de cellules GFAP positives (astrocytes), la F1 est composée de 96 % de cellules GFAP positives et la F3 de 98 % de cellule GFAP positives (Figure 3.9). La F2, quant à elle, est principalement composée d'autres types cellulaires marqués à la β -tubuline III (neurones), avec F4-80 (microglie) et O4/O1 (oligodendrocytes) (non montré). Dans les fractions F1 et F3 nous observons un enrichissement en astrocytes très important bien supérieur à la technique classiquement décrite (3 semaines de culture sous agitation).

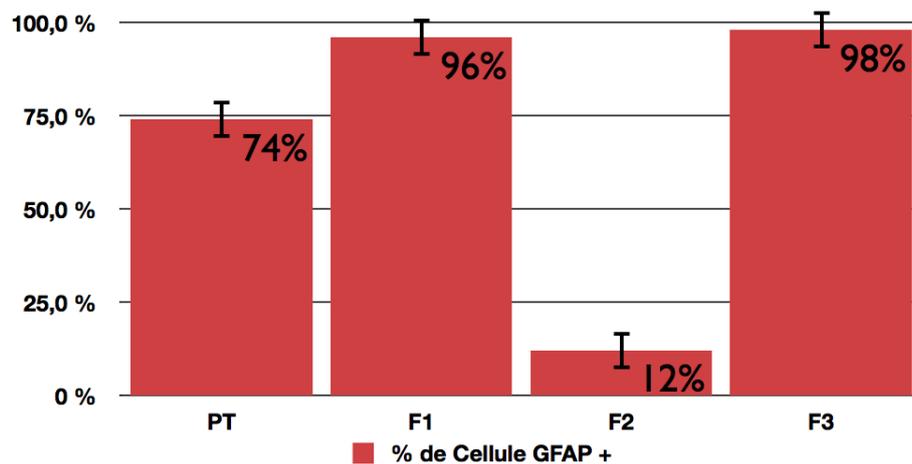


FIGURE 3.9 – Pourcentage de cellules GFAP positives présentes dans les différentes fractions après séparation par SdFFF. Des microphotographies des cultures immunomarquées sont analysées à raison de 3 champs par condition pour n=6. Les cellules sont comptées et rapportées au nombre de cellules totales (contremarquage au DAPI.)

De plus, nous avons pratiqué une analyse morphologique des cellules présentes en F1 et F3 et nous avons observé que les cellules de la fraction F1 étaient de grande taille et très étalées dans la boîte de culture, alors que les cellules de la fraction F3 étaient petites et avaient tendance à former des amas (Figure 3.10).

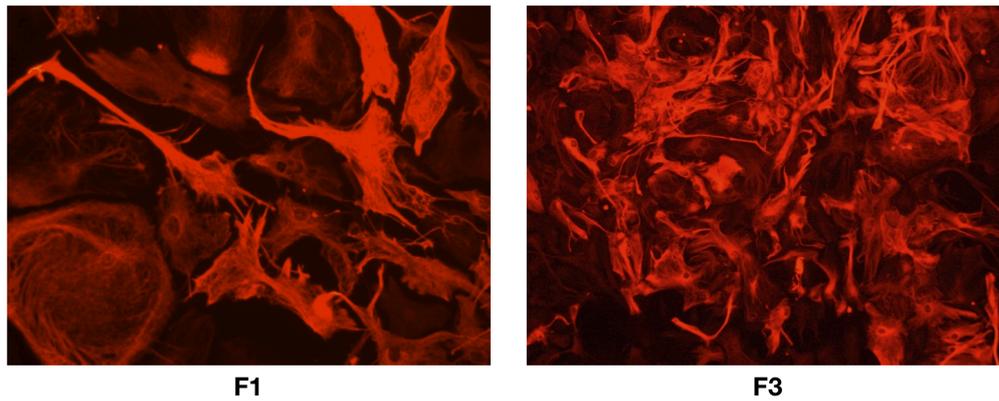


FIGURE 3.10 – Analyse microscopique de la morphologie des cellules des fractions F1 et F3 après séparation par SdFFF et immunomarquage pour la GFAP.

Sous populations astrocytaires Nous avons ensuite pratiqué un double marquage pour la GFAP et l'actine α -ML sur les différentes fractions obtenues par SdFFF (Figure 3.11).

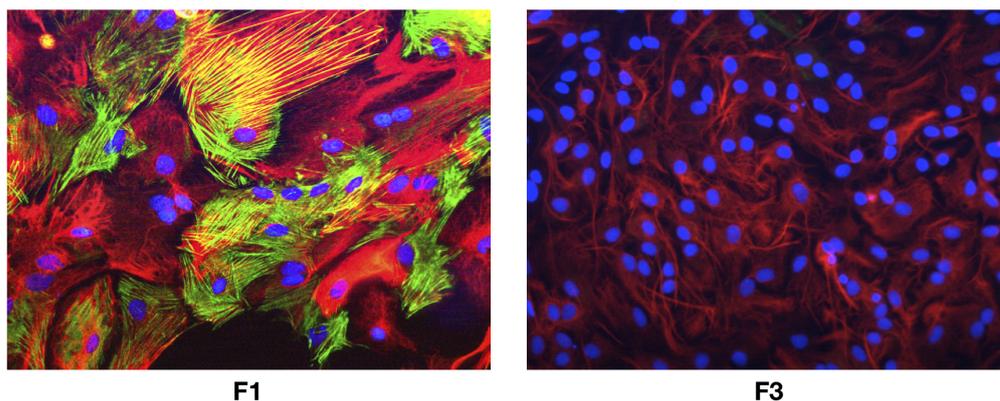


FIGURE 3.11 – Expression de l'actine α -ML (vert) et de la GFAP (rouge) dans les fractions F1 et F3 après séparation par SdFFF.

Nous avons montré que la PT est composée majoritairement de cellules GFAP positives (76 %) avec quelques cellules marquées pour l'actine α -ML (5 %). Quant aux différentes fractions, la F3 est composée majoritairement de cellules uniquement GFAP positives (88 %) contrairement à la F1 qui est composée majoritairement de cellules exprimant à la fois la GFAP et l'actine α -ML (58 %) (Figure 3.12). La F2 est, quant à elle, composée de 20 % de cellules GFAP positives, 24 % de cellules actine α -ML positives, 10 % de cellules exprimant à la fois la GFAP et l'actine α -ML ; le reste des cellules dans cette fraction F2 (environ 46 %) n'est marqué avec aucun des marqueurs utilisés et concerne les oligodendrocytes, la microglie et les neurones (non montré). Grâce à la technique de séparation par SdFFF, nous avons réussi à séparer 2 populations d'astrocytes, l'une présente dans la F3 exprimant très majoritairement uniquement la GFAP, l'autre présente dans la F1 exprimant à la fois le marqueur astrocytaire (GFAP) et le marqueur de différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, l'actine α -ML. De plus, comme dans les myofibroblastes, l'actine α -ML de ces astrocytes est exprimée dans les fibres de stress (Figure 3.11).

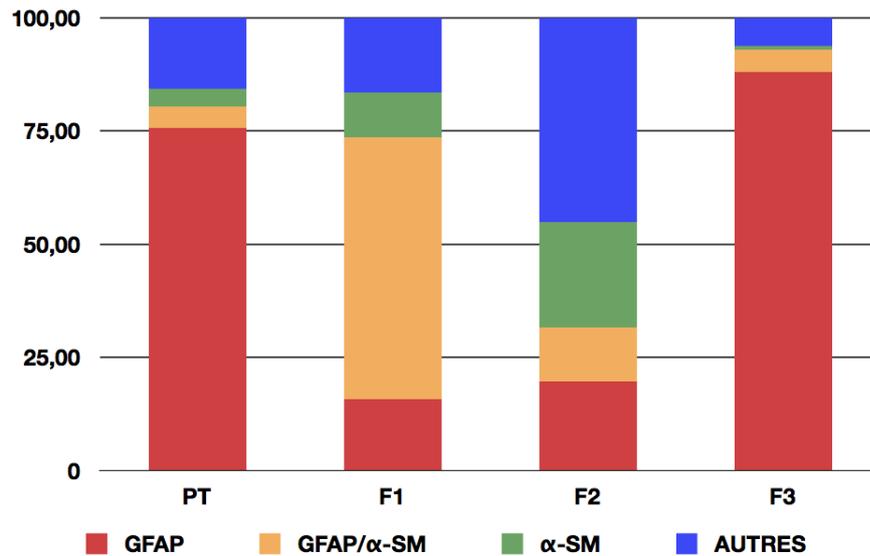


FIGURE 3.12 – Pourcentage de cellules marquées pour la GFAP et l'actine α -ML dans les différentes fractions après séparation par SdFFF. Des microphotographies des cultures sont analysées à raison de 3 champs par conditions pour $n=6$. Les cellules sont comptées et rapportées au nombre de cellules totales (contremarquage au DAPI).

Viabilité cellulaire et apoptose au sein des fractions

Viabilité cellulaire (test XTT) Après 1 semaine de culture, nous n'avons pas observé de différence significative de viabilité cellulaire dans les différentes fractions, excepté pour la fraction F2 où une diminution drastique de la viabilité est observée (Figure 3.13).

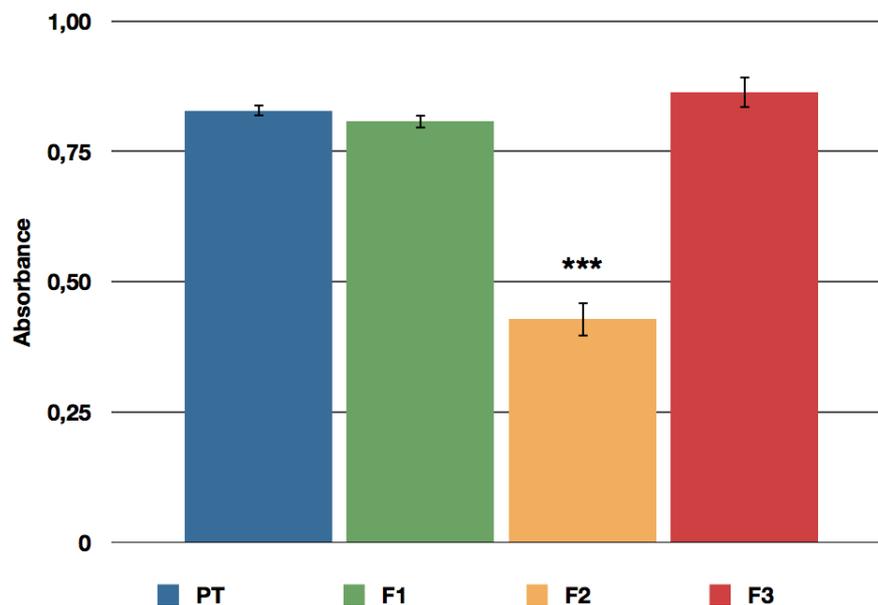


FIGURE 3.13 – Evaluation de la viabilité cellulaire dans les différentes fractions après séparation par SdFFF. *** $p < 0,001$ entre les fractions ($n=6$).

Apoptose dans les différentes fractions Les résultats observés grâce au dosage des nucléosomes solubles sont en accord avec les résultats obtenus avec le test XTT. Nous n'avons pas de variation significative de l'apoptose dans les différentes fractions,

excepté dans la F2 où nous observons une très forte augmentation de l'apoptose (Figure 3.14).

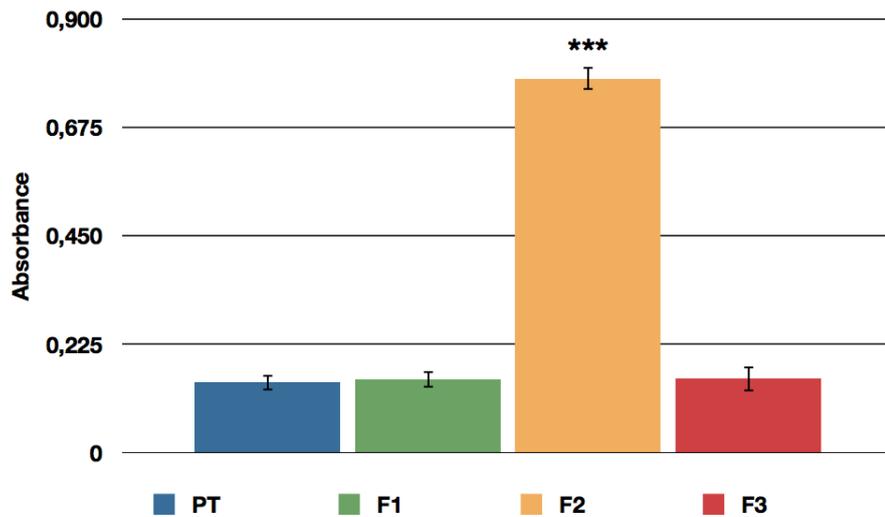


FIGURE 3.14 – Evaluation de l'apoptose dans les différentes fractions après séparation par SdFFF. *** $p < 0,001$ entre les fractions ($n=6$).

Modèle de plaie *in vitro*

La capacité de recolonisation par les cellules d'une lésion pratiquée dans un tapis cellulaire constitué des différentes fractions cellulaires a été analysée grâce à des scratches réalisés à l'aide d'un cône jaune dans un tapis cellulaire (Figure 3.15). Une méthode standardisée utilisant des inserts en silicone a également été mise en oeuvre.

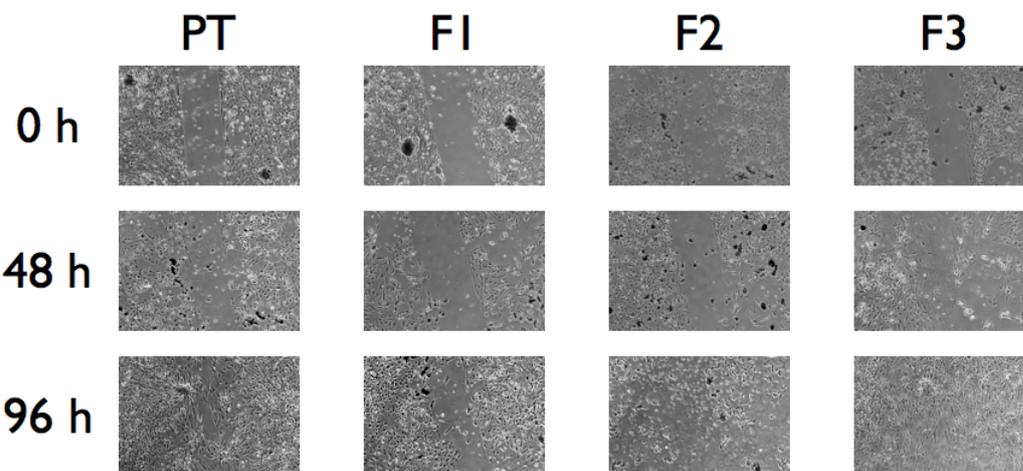


FIGURE 3.15 – Recolonisation des plaies *in vitro* par les cellules présentes dans les différentes fractions 0 h, 48 h et 96 h après la réalisation de la plaie.

Après comptages du nombre de cellules ayant recolonisé la lésion, nous avons observé qu'au cours des 48 premières heures, les cellules présentes dans les fractions F1 et F2 ne recolonisent pas la plaie (Figure 3.16). Par contre, la PT et la fraction F3 recolonise la plaie de façon significativement plus importante. Après 96 h, la recolonisation par la fraction F3 est quasiment totale, ne laissant pratiquement plus apparaître la plaie initiale. La PT continue sa recolonisation ainsi que la fraction F1. Par contre, concernant la fraction F2, on observe clairement une mort cellulaire importante (débris cellulaire,

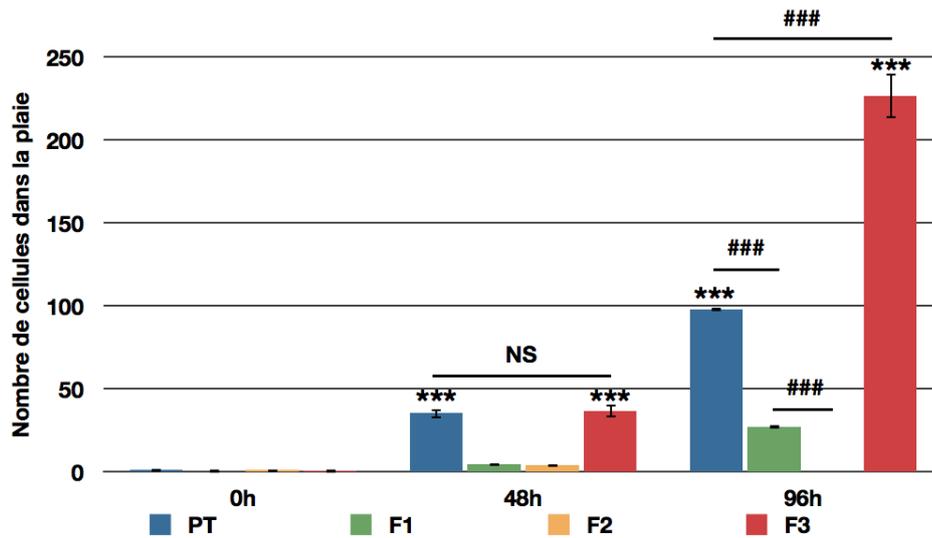


FIGURE 3.16 – Comptages du nombres de cellules présentes au sein des plaies à 0 h, 48 h et 96 h dans les différentes fractions obtenues après séparation par SdFFF. *** $p < 0,001$ versus 0 h. ### $p < 0,001$ entre les fractions (n=3).

cellules flottantes) en accord avec les résultats observés avec les tests de viabilité cellulaire (Figure 3.13) et de quantification de l'apoptose (Figure 3.14).

Discussion

Lors de cette étude, nous avons obtenu, dans un premier temps, des populations cellulaires enrichies en astrocytes qui nous ont permis de développer un modèle *in vitro* reproduisant au moins en partie, l'activation astrocytaire observée après lésion du SNC. Nous avons montré que, contrairement à ce qui est décrit pour d'autres types cellulaires, l'activation de la voie pro-apoptotique Fas n'induit pas, dans nos conditions d'étude, l'apoptose des astrocytes. Ce phénomène pourrait être dû à une diminution drastique de l'expression de la caspase 8 dans les astrocytes d'animaux nouveau-nés [Barca *et al.*, 2010]. Cependant, d'autres études ont montré que les astrocytes acquerraient progressivement cette résistance à la mort induite par Fas et par d'autres récepteurs de mort et la conserverait tout au long de la vie [Song *et al.*, 2006]. L'insensibilité des astrocytes à la mort induite par les récepteurs de mort serait un autre moyen de maintenir l'intégrité du SNC. Lors d'une lésion du SNC, les astrocytes vont être activés et vont alors sécréter de nombreux facteurs, notamment des cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines pro-inflammatoires vont induire progressivement l'activation, de façon autocrine et paracrine, des astrocytes impliqués dans la réparation de la lésion, conduisant finalement à la formation de la cicatrice gliale. Une des conséquences ultimes de cette activation serait le rétablissement de la sensibilité à la mort induite par les récepteurs de mort que l'on observe dans les stades avancés de la cicatrisation [Falsig *et al.*, 2004]. En fait, nous avons observé une augmentation de la prolifération astrocytaire lors de l'activation de la voie Fas. Cette prolifération est du même ordre que la prolifération induite par l'activation des astrocytes traités avec du LPS. Ceci montre que l'activation des astrocytes lors d'une lésion du SNC dépend bien sûr de nombreux facteurs et que les voies de signalisation semblent très profondément imbriquées. Mais, de plus, ces processus d'activation ne semblent pas similaires aux processus classiquement décrits dans d'autres types cellulaires. Le fait que la localisation cytoplasmique des MMPs ne soit pas modifiée et que l'expression de leur pro-forme soit maintenue semble indiquer que la régulation de l'expression des MMPs dans ce modèle *in vitro* ne se fait pas au niveau nucléaire permettant ainsi la synthèse nor-

male de ces MMPs. La régulation s'effectuerait donc plutôt au niveau de leur activation. La présence uniquement dans le surnageant de culture de la forme active de la MMP-9 laisserait supposer que la MMP-9 serait sécrétée dans nos conditions sous la forme de pro MMP-9 et qu'elle serait cliver dans le milieu extra cellulaire par d'autres molécules. L'activation de la voie Fas montre une nette diminution de l'expression de la forme active de la MMP-9 que l'on retrouve dans le surnageant. Ceci pourrait être due à une modulation indirecte du système MMPs/TIMPs par les cytokines pro-inflammatoires. En effet, il a été suggéré que la voie de transduction de Fas et le système MMPs/TIMPs pourraient interagir dans les astrocytes pour moduler leurs réponses aux stimuli environnementaux [Ogier *et al.*, 2005]. L'absence d'expression de la forme active de la MMP-2 et de TIMP-1 pourrait traduire un stade précoce d'activation des astrocytes ; une stimulation plus longue de la voie Fas pourrait permettre l'apparition de l'expression de ces deux protéines. Cette présence séquentielle de ces différentes protéines serait en accord avec les différentes phases pro-inflammatoires observées lors de l'activation des astrocytes [Falsig *et al.*, 2004]. Après cette étude réalisée sur des populations cellulaires classiquement enrichies en astrocytes, nous avons pu, dans un second temps, grâce à l'utilisation de la technique de séparation par SdFFF, séparer 2 sous-populations d'astrocytes : une population exprimant exclusivement la GFAP et une population qui exprime à la fois la GFAP et l'actine α -ML, isoforme d'actine qui apparaît lors de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes [Hinz, 2010]. Cette dernière population est obtenue dans la F1 et n'a qu'un faible potentiel de recolonisation des lésions produites *in vitro* ; de plus, les cellules de cette fraction expriment l'actine α -ML dans les fibres de stress, traduisant un accrochage fort au support qui limite de ce fait la migration. Dans la littérature, l'expression de l'actine α -ML dans des astrocytes n'a été rapporté que dans un seul article s'intéressant à la sclérose en plaque [Moreels *et al.*, 2008]. Nos observations démontrant que les astrocytes peuvent acquérir l'expression de l'actine α -ML apportent une notion tout à fait nouvelle concernant l'implication des astrocytes dans la formation de la cicatrice gliale. En fait, une sous-population d'astrocytes pourrait vraisemblablement acquérir un phénotype myofibroblastique lors des processus de réparation du SNC de façon similaire à ce qui est retrouvé dans la réparation des autres organes et lors de la formation de la réaction stromale.

Conclusion

Notre travail a permis la mise en place d'un modèle d'étude des astrocytes qui mime l'activation des astrocytes lors d'une lésion du SNC. Nous avons montré que dans ce modèle, l'activation de la voie Fas n'induit pas l'apoptose des astrocytes mais induit leur prolifération. Nous avons également observé que l'activation de la voie Fas peut moduler l'expression de la MMP-9, les mécanismes précis de cette régulation restant encore à déterminer. De plus, nous avons pu séparer 2 populations d'astrocytes distinctes qui présentent des morphologies différentes, et dont l'une d'entre elles peut vraisemblablement acquérir un phénotype myofibroblastique. Nous devons encore caractériser précisément ces différentes populations (en étudiant notamment les protéines de la MEC qu'elles sont capables de sécréter) et étudier les facteurs impliqués dans cette différenciation myofibroblastique. De plus, nous devons bien sûr vérifier la présence de ces populations *in vivo* en utilisant le modèle de lésion corticale contrôlée développé dans le laboratoire.

3.4 Etude *in vivo*

3.4.1 Matériel et méthodes

Animaux

Les expériences sont réalisées sur des rats mâles Sprague-Dawley de poids compris entre 260 et 280 g (élevage Despres, France) et maintenus en cage individuelle avec un accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. De plus, il a été fait en sorte de limiter le nombre d'animaux et de leur assurer les meilleures conditions de bien-être avant, pendant et après les expériences. Lésion traumatique par contusion corticale contrôlée L'anesthésie des rats est réalisée par l'inhalation d'isoflurane (induction 1 %; entretien 5 % dans un mélange gazeux air/azote 50 % / 50 %; Medical Supplies and Services, Angleterre), puis par une solution composée de kétamine (150 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg) administrée par voie intrapéritonéale. L'animal est ensuite fixé sur un cadre stéréotaxique (David Kopf Instruments, USA). Une craniotomie circulaire d'un diamètre de 5 mm est pratiquée à l'aide d'un foret ($\emptyset < 1$ mm) monté sur une mini-perceuse. La craniotomie est unilatérale et centrée sur le cortex sensori-moteur (Antériorité : 0,0 mm; Latéralité 3,0 mm par rapport au bregma et selon l'atlas stéréotaxique de Paxinos et Watson, 2007). Une attention particulière est portée à la réalisation de cette étape afin de préserver l'intégrité des méninges. La lésion traumatique est opérée par contusion directe du cortex cérébral grâce à un piston magnétique (P 01-23x80, LinMot, Inc., Suisse) directement monté sur le cadre stéréotaxique. Le piston est incliné de 10° de manière à ce que l'impact soit parallèle à la surface du cerveau. Le piston est relié à un servocontrôleur électronique (E 100-MT, LinMot, Inc., Suisse), lui-même connecté à un système informatique équipé du logiciel Injury Device [Bilgen, 2005]. Ce logiciel permet de régler précisément la vitesse, la profondeur et la durée de la contusion. L'appareillage ne permet cependant pas de dépasser une vitesse de 1,5 m/s. Pour cette étude, des impacts ont donc été produits à une vitesse de 1,5 m/s avec une durée de 250 ms et une profondeur de 3 mm ou de 4 mm, dans le but d'induire des lésions de sévérités différentes. Après la contusion, un pansement hémostatique résorbable est déposé dans l'orifice puis celui-ci est rebouché avec du ciment osseux (Osteonics, USA) pour rétablir la pression intracrânienne et éviter la perte de liquide céphalo-rachidien. Ce ciment contient également un antibiotique pour prévenir une éventuelle infection. L'incision est suturée avec du fil résorbable puis une période de repos de 2 jours est observée avant le début des expériences ultérieures. Le groupe de rats contrôles est soumis à l'anesthésie générale et à la craniotomie mais ne reçoit aucun impact.

Histologie

Deux jours après la lésion, les rats sont anesthésiés (voir plus haut) puis sont perfusés via le ventricule gauche avec 150 mL de PBS (pH 7,4; 0,01 M) suivis par 500 mL de paraformaldéhyde 4 % à la vitesse de 25 mL/min pour fixer les tissus. Les cerveaux sont ensuite prélevés et conservés une nuit dans du paraformaldéhyde 4 % puis rincés avec du PBS avant d'être inclus en paraffine. Enfin, des coupes de 5 μ m sont réalisées à l'aide d'un microtome puis colorées à l'hématoxyline-éosine. L'hématoxyline permet de colorer le noyau des cellules en bleu foncé tandis que le cytoplasme est coloré en rose par l'éosine. Les coupes sont ensuite montées à l'aide d'un milieu « Permout » (Dako fluorescent mounting medium, Dako, USA) entre lame et lamelle puis observées à l'aide d'un microscope (MZFL III Leica, Allemagne) associé à une caméra numérique (Kappa, Allemagne).

Evaluation des performances sensori-motrices

L'évaluation des performances sensori-motrices est réalisée à l'aide du test de marche sur une poutre (« Beam Walking Test »). Ce test permet d'évaluer les performances sensori-motrices des animaux en examinant leur capacité à rester en équilibre et à marcher sur une poutre étroite surélevée sans tomber ou glisser d'un côté ou de l'autre de cette poutre.

Dispositif utilisé Pour élaborer ce test, nous avons utilisé une poutre de 2 m de long avec une épaisseur et une largeur de 3 cm. La poutre est fixée à une hauteur de 80 cm du sol. L'aire de départ est composée d'une plate-forme de 30 cm de coté surplombée d'une lampe de 50W produisant une lumière aversive. L'aire d'arrivée se compose d'une boîte de 30 cm de coté pouvant accueillir le rat, lui permettant ainsi de se cacher dans l'obscurité (Figure 3.17).

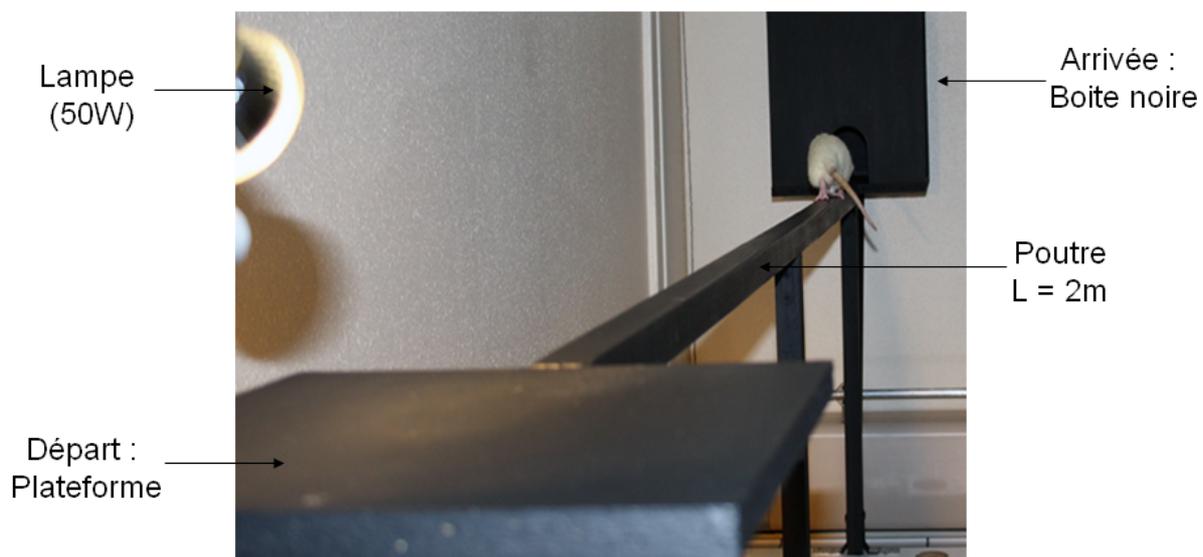


FIGURE 3.17 – Dispositif utilisé pour le « Beam Walking Test ».

Chronologie des expériences Les animaux sont tout d'abord soumis à une phase d'apprentissage qui dure 3 jours à raison de 3 essais par jour (Figure 3.18). L'apprentissage du rat débute par une période d'1 min dans la boîte noire. Ensuite, l'animal est placé sur la poutre à 50 cm du point d'arrivée et il est incité à marcher sur celle-ci pour rejoindre la boîte noire. Il sera ensuite éloigné par tranche de 50 cm jusqu'à la plate-forme de départ. Une semaine plus tard, un test de référence est effectué juste avant le traumatisme crânien (J0). Les sessions suivantes sont réalisées 2 jours, 7 jours, 14 jours, 21 jours et 28 jours après le traumatisme crânien. Chaque session comprend 3 essais consécutifs. Entre chaque essai, l'animal est placé 30 s dans la boîte noire.

Procédure générale d'acquisition A chaque essai, le rat est placé sur l'aire de départ. S'il ne s'engage pas sur la poutre au bout de 30 s, l'expérimentateur l'incite à s'élancer. Si l'animal ne quitte pas la plate-forme au bout de 1 min, il est considéré comme n'étant pas capable de réaliser la tâche. Le temps mis par le rat pour traverser la poutre (latence) est chronométré par l'expérimentateur. Par ailleurs, une caméra numérique reliée à un PC permet de filmer l'arrière de l'animal progressant sur la poutre et enregistre chaque essai grâce au logiciel Logitech Quickam. Les vidéos obtenues servent à

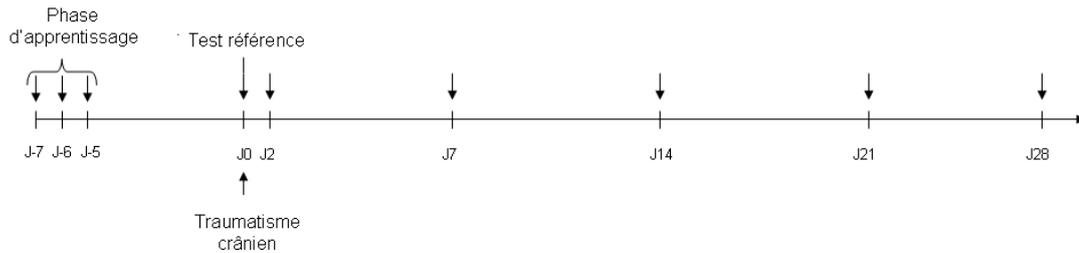


FIGURE 3.18 – Chronologie des expérimentations pour le « Beam Walking Test ».

déterminer le nombre de fautes de placement au niveau de la patte arrière contralatérale à la lésion. Les performances des animaux sont évaluées grâce à une échelle de score empruntée à [Korenova *et al.*, 2009] et modifiée pour les besoins de l'expérience (Table 3.4).

Score	Latence	Nombres de fautes de la patte arrière contralatérale
0	$\leq 4s$	≤ 1
1	Entre 4,1 et 8,0s	Entre 1,1 et 2,0
2	Entre 8,1 et 12,0s	Entre 2,1 et 3,0
3	Entre 12,1 et 20,0s	Entre 3,1 et 5,0
4	Entre 20,1s et plus	Entre 5,1 et 8,0
5	L'animal n'est pas capable de réaliser la tâche	Plus de 8 fautes ou l'animal n'est pas capable de réaliser la tâche

TABLE 3.4 – Echelle des scores d'évaluation des performances sensori-motrices (d'après Korenova *et al.*, 2009).

Les scores de latence et de faute au niveau de la patte arrière contralatérale sont cumulés. Un score total de 0 indique une grande facilité dans l'exécution de la tâche alors qu'un score de 10 signifie que l'animal est incapable d'accomplir la tâche.

Evaluation des performances cognitives

L'évaluation des performances cognitives est réalisée à l'aide du test de la piscine de Morris (« Morris Water Maze »). Ce test met en jeu la motivation des animaux à s'échapper de l'eau contenue dans une piscine en montant sur une plate-forme cachée jouant le rôle de renforcement positif. La réalisation de cette tâche requiert de l'animal qu'il établisse, à l'aide de repères distaux invariants, une carte précise de l'environnement dans lequel il évolue afin d'apprendre et de restituer la position de la plate-forme à partir de n'importe quel point de la piscine. Il existe différentes modalités utilisables pour ce test. Nous avons choisi de mettre en place un protocole permettant l'étude des capacités d'apprentissage et de mémorisation.

Dispositif utilisé Le matériel est composé d'une cuve circulaire (1,25 m de diamètre) virtuellement séparée en 4 cadrans par le logiciel SmartJunior (Panlab, Espagne). La piscine contient une plate-forme transparente (12 cm de diamètre) située 2 cm sous la surface et permettant à l'animal de se maintenir hors de l'eau. Cette plate-forme est située dans le cadran sud-ouest. L'eau est colorée par un pigment non toxique (Vert SOF, Les ocres de France, France) afin de dissimuler la plate-forme. Des repères sous forme de

symboles géométriques sont installés au 4 points cardinaux de la piscine (Figure 3.19). La température de l'eau est de 24°C.

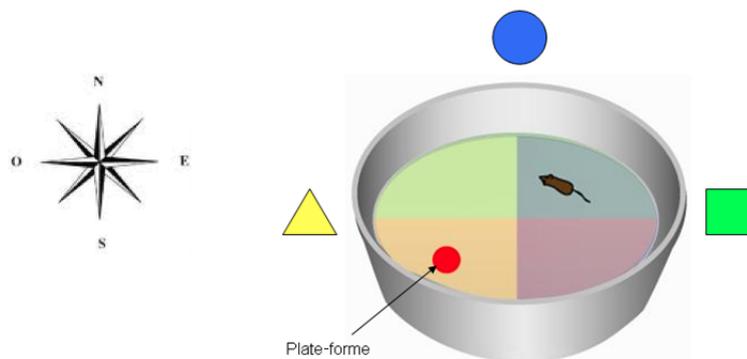


FIGURE 3.19 – Dispositif du « Morris Water Maze ».

Chronologie des expériences Les expériences se déroulent selon 2 phases, la première permet d'évaluer les déficits d'apprentissage et la seconde les déficits de restitution de la mémoire spatiale (Figure 3.20). Des études indiquent que le test de la piscine de Morris permet de mettre en évidence les effets de traitement favorisant l'amélioration des capacités d'apprentissage des animaux lorsqu'il est réalisé 14 jours après le traumatisme [Kline *et al.*, 2000, Wagner *et al.*, 2002]. Nous avons donc choisi de tester les capacités d'apprentissage des animaux à partir du 14ème jour après la lésion et durant 4 jours consécutifs (J 14 à J 17). Chacun de ces jours, l'animal est soumis à 4 essais durant lesquels il doit trouver la plate-forme. La seconde phase débute le 21ème et le 28ème jour après le traumatisme. Les animaux sont soumis à 2 essais consécutifs au cours desquels la plate-forme est retirée de la piscine. Le temps passé dans le cadran sud-ouest où se trouvait la plate-forme est alors mesuré. L'absence de plate-forme permet d'évaluer la mémoire de l'animal en analysant le niveau de persévérance à chercher la plate-forme dans la zone cible située de manière invariable dans le cadran sud-ouest.

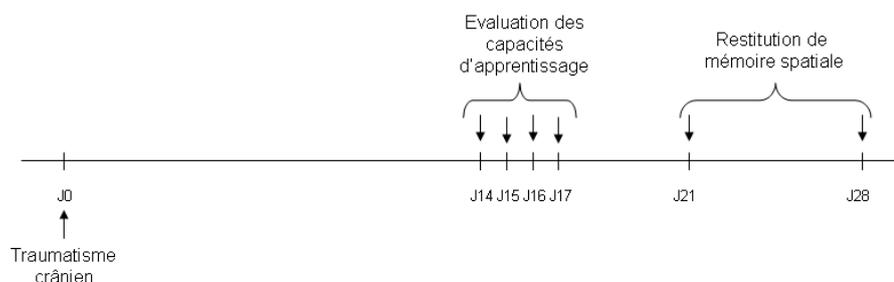


FIGURE 3.20 – Chronologie des expérimentations pour le « Morris Water Maze ».

Procédure générale d'acquisition A chaque essai, l'animal est lâché dans l'eau, la tête face au rebord de la piscine à partir d'un point périphérique variable (séquence

pseudo-aléatoire). Dans les expériences évaluant les capacités d'apprentissage (phase 1), le rat dispose d'un temps maximum de 90 s pour rejoindre la plate-forme. A la fin de chaque essai, les animaux sont autorisés à rester sur la plate-forme durant 15 s pendant lesquelles ils peuvent associer les repères extérieurs avec la position de la cible. Une présentation de la plate-forme (15 s) est toujours effectuée si le rat ne la trouve pas dans le temps imparti. Chaque essai est filmé par une caméra numérique et le temps mis par l'animal pour trouver la plate-forme est mesuré grâce au logiciel SmartJunior (Panlab, Espagne). Un temps de repos de 5 min est respecté entre chaque essai. Aux jours 21 et 28, la plate-forme est enlevée et chaque rat effectue 2 essais de 60 s durant lesquels le temps passé dans le cadran sud-ouest où se trouvait la plate-forme est mesuré grâce au logiciel SmartJunior (Panlab, Espagne).

Mise au point d'une technique de dosage des MMPs compatible avec la technique de microdialyse

La microdialyse intracérébrale *in vivo* chez l'animal anesthésié ou vigile est un outil qui permet une analyse dynamique des variations de concentration de nombreuses substances présentes dans le milieu extracellulaire cérébral. Nous souhaiterions utiliser cette approche expérimentale pour suivre les variations des taux de MMPs sécrétées au niveau extracellulaire dans la zone péri-lésionnelle. Cette technique est peu invasive, mais elle implique néanmoins l'implantation d'une sonde de microdialyse au sein du tissu lésé. A l'intérieur de la sonde circule un liquide physiologique infusé à l'aide d'une pompe. Après un certain temps, il s'établit un équilibre de dialyse de part et d'autre de la membrane et le liquide collecté en sortie de sonde (dialysat) contient donc une fraction du liquide extracellulaire. C'est à partir de ces dialysats que sont déterminées les concentrations de diverses substances d'intérêt grâce à différentes techniques de dosage. Cependant, les membranes de dialyse ne permettent la diffusion que de petites molécules (de 20 à 100 kDa). Cette technique pourrait donc s'avérer inadaptée à l'étude des MMPs car le poids moléculaire de certaines de ces protéines (92 kDa pour la MMP 9) est très proche du poids moléculaire maximum diffusible à travers la membrane. Pour contourner ce problème, [Bendrik *et al.*, 2008] ont récemment décrit un protocole utilisant un substrat fluorogénique de ces protéases directement infusé via la sonde. Le dosage s'effectue alors à partir du produit de clivage de ce substrat fluorogénique retrouvé dans le dialysat, permettant ainsi d'évaluer l'activité MMP endogène. Dans le but de reproduire une méthodologie similaire à celle employée par [Bendrik *et al.*, 2008], différents kits et substrats commerciaux ont été testés :

- « MMP-9 Drug Discovery kit » (BML-AK10, Enzo, USA) ;
- « Innozyme Gélatinase MMP-2 / MMP-9 » (Calbiochem, Allemagne) ;
- « MMP-2 / MMP-9 substrate I et II ».

Nos expériences préliminaires ont été réalisées sur des surnageants de culture obtenus à partir de la lignée U118 (glioblastome humain) qui expriment des MMPs. Les rats sont traités avec un oligonucléotide anti-sens dirigé contre l'ARN messager du TGF- β 1 (collaboration avec Nicholas M. Dean, Excaliard Pharmaceuticals, USA). Le traitement est administré dans le ventricule latéral contralatéral à la lésion grâce à une canule d'injection (Alzet, Brain Infusion Kit1, Charles River, France) fixée sur le crâne à l'aide de résine acrylique et de vis (Antériorité : -0,8 mm ; Latéralité : 1,5 mm ; Profondeur : 3,2 mm par rapport au bregma). La canule est reliée à une mini-pompe osmotique (Alzet, model 1002, Charles River, France) par l'intermédiaire d'un cathéter (Longueur : 2 cm ; \varnothing int : 0,69 mm). La pompe est remplie d'une solution contenant 16,7 mg/mL de l'oligonucléotide qu'elle délivre à un débit de 0,25 μ L par heure (100 μ g/jour) pendant 14 jours. En prenant en compte le volume mort du cathéter (11 μ L), le traitement commence donc à être délivré quelques heures avant la fin du second jour suivant l'opération.

La pompe est implantée sous la peau de l'animal au niveau du cou. Une pompe contenant une solution de sérum physiologique (0,9 % de NaCl) est utilisée chez les animaux contrôles.

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés par la moyenne des valeurs individuelles obtenues pour un même traitement ou une même condition expérimentale. Les comparaisons statistiques de plusieurs moyennes sont, selon les expériences, effectuées grâce à des analyses ANOVA à mesures répétées ou non, suivies de tests post-oc de Tukey. Toutes les analyses statistiques sont effectuées grâce au logiciel SigmaStat (SPSS Inc, USA). La probabilité est considérée comme significative lorsque $p < 0,05$.

3.4.2 Résultats

Evaluation de l'étendue du territoire lésé en fonction de la profondeur d'impact

Notre appareillage ne permettant pas de dépasser une vitesse d'impact de 1,5 m/s, des lésions de sévérités différentes sont réalisées avec une contusion de 3 mm ou 4 mm de profondeur. L'étendue du territoire endommagé après lésion traumatique du cortex cérébral est tout d'abord évaluée par des observations macroscopiques. Comme l'indique la Figure 3.21a, la contusion opérée avec une profondeur d'impact de 3 mm induit, 2 jours plus tard, une légère compression centrée sur le cortex pariétal. Cette dernière apparaît peu profonde et relativement peu hémorragique. En revanche, lorsque la contusion est réalisée avec une profondeur d'impact de 4 mm (Figure 3.21b), l'étendue du territoire lésé est plus importante, s'étendant en partie au niveau du cortex frontal. Par ailleurs, la zone apparaît plus hémorragique et le volume du tissu détruit est également beaucoup plus important.

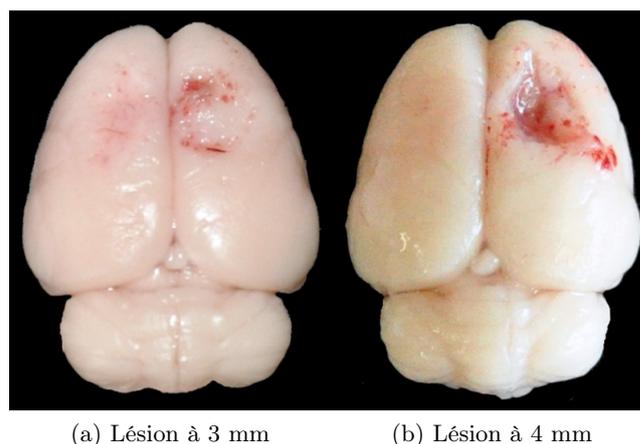


FIGURE 3.21 – Etude macroscopique de l'effet de la profondeur de l'impact.

Afin de compléter ces observations macroscopiques, des analyses histologiques sont réalisées à partir de coupes de cerveaux colorées à l'hématoxyline/éosine. Comme l'indique la Figure 3.22a, la contusion opérée avec une profondeur d'impact de 3 mm n'induit, deux jours plus tard, qu'une légère atteinte corticale sans endommager les structures sous-corticales, l'intégrité du corps calleux et du striatum étant préservé. Par contre, lorsque la contusion est réalisée avec une profondeur d'impact de 4 mm (Figure 3.22b),

on constate une destruction massive du cortex accompagnée d'une altération importante des structures sous-corticales ipsilatérales.

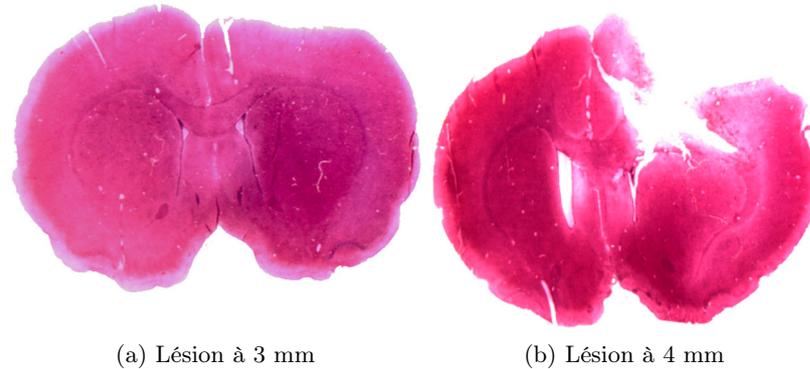


FIGURE 3.22 – Coloration à l'Hémostoxyline-Eosine.

Plus précisément, on observe une lésion du corps calleux ainsi qu'un affaissement et une déformation du striatum. Ces dommages sont également accompagnés d'une dilatation du ventricule latéral contralatéral. Par ailleurs, la présence de sang dans les ventricules latéraux suggère la rupture d'un nombre important de vaisseaux sanguins avec comme conséquence la présence de zones hémorragiques et ischémiques.

Evaluation des performances sensori-motrices chez les animaux ayant subi un impact de 3 mm ou 4 mm de profondeur

Les capacités sensori-motrices des animaux sont évaluées grâce au test de marche sur une poutre (Figure 3.23).

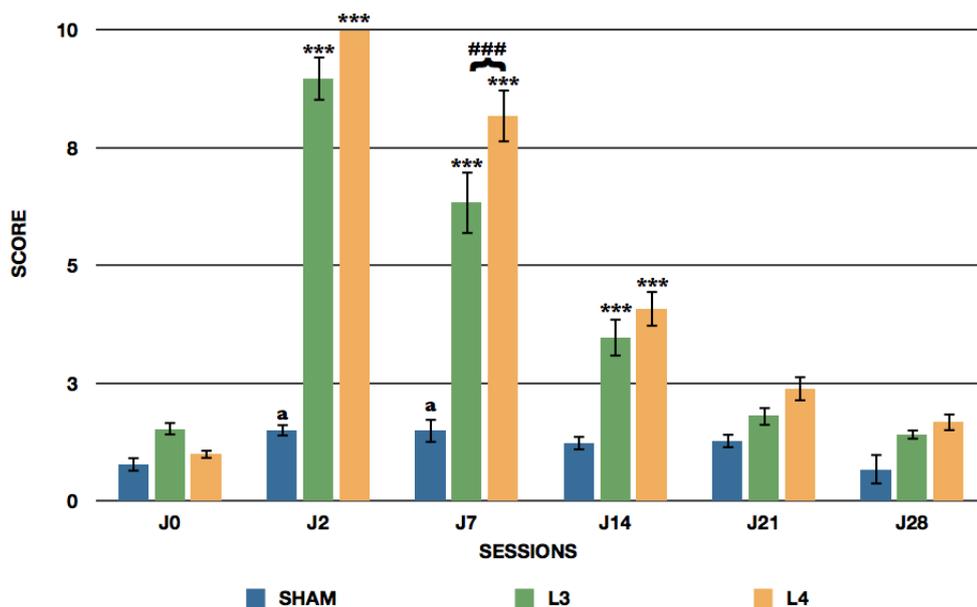


FIGURE 3.23 – Evaluation des capacité sensori-motrices grâce au test de marche sur la poutre. *** $p < 0,001$ et a $p < 0,05$ vs. controle. ### $p < 0,001$ entre lésés 3 mm et lésés 4 mm.

Une analyse ANOVA à 1 facteur et à mesures répétées réalisée à partir des scores obte-

nus par le groupe contrôle (sans lésion) avec le [temps] comme facteur, suivie d'un test post-oc de Tukey, indique une diminution significative des capacités sensori-motrices des animaux ($F(5,35) = 3,639$; $p = 0,013$; $n = 6$). Plus précisément, et comparativement aux performances enregistrées avant la lésion, les scores obtenus sont significativement plus élevés 2 jours (+ 52 %; $p = 0,045$; $n = 6$) et 7 jours (+ 52 %; $p = 0,045$; $n = 6$) après la lésion. En revanche, aucune différence n'est observée lors des sessions ultérieures.

Une analyse ANOVA à 2 facteurs réalisée à partir des scores obtenus par les différents groupes (Contrôle; L3 = rats lésés avec une profondeur d'impact de 3 mm; L4 = rats lésés avec une profondeur d'impact de 4 mm), avec le [temps] et le [groupe] comme facteurs, suivie d'un test post-oc de Tukey, indique une interaction [temps] x [groupe] ($F(10, 143) = 23,593$; $p < 0,001$; $n = 6$ à 10). En revanche, aucune différence n'est observée entre les différents groupes lors du test de référence à J0. Cette analyse indique, par ailleurs, que les animaux du groupe L3 présentent une diminution significative des capacités sensori-motrices ($p < 0,001$; $n = 6$ à 8). Plus précisément, comparativement au groupe contrôle, on observe des déficits sensori-moteurs significatifs le deuxième jour après la lésion (- 598 %; $p < 0,001$; $n = 6$ à 10), le septième jour après la lésion (- 422 %; $p < 0,001$; $n = 6$ à 10) et le quatorzième jour après la lésion (- 284,4 %; $p < 0,001$; $n = 6$ à 10). De même, on constate une diminution significative des capacités sensori-motrices des animaux du groupe L4, comparativement au groupe contrôle ($p < 0,001$; $n = 6$ à 8). Cette différence se révèle plus précisément 2 jours après la lésion (- 666,6 %; $p < 0,001$; $n = 6$ à 8) et 7 jours après la lésion (- 544,6 %; $p < 0,001$; $n = 6$ à 8). Enfin, comparativement au groupe L3, le groupe L4 présente une diminution significative des capacités sensori-motrices. Cette différence se révèle plus précisément le septième jour après la lésion (- 222,4 %; $p < 0,001$; $n = 8$ à 10), mais une tendance est également décelable 2 jours après la lésion avec des valeurs proches de la significativité (- 111 %; $p = 0,07$; $n = 8$ à 10).

Evaluation des performances cognitives chez les animaux ayant subi un impact de 3 mm ou 4 mm de profondeur

Les résultats obtenus par les animaux dans les expériences d'évaluation des capacités d'apprentissage grâce au test de la piscine de Morris sont présentés dans la Figure 3.24.

Une analyse ANOVA à 1 facteur et à mesures répétées, avec le [temps] comme facteur, réalisée à partir des données obtenues par les animaux contrôles dans les expériences destinées à évaluer les capacités d'apprentissage, suivie d'un test post-oc de Tukey, met en évidence une diminution significative de la latence de découverte de la plate-forme ($F(3,23) = 22,109$; $p < 0,001$; $n = 6$). Plus précisément, et comparativement au premier jour du test (J14), les animaux contrôles présentent une diminution significative de la latence de découverte de la plate-forme le 15ème jour après la lésion (- 55,48 %; $p = 0,001$; $n = 6$), le 16ème jour après la lésion (- 81,88 %; $p < 0,001$; $n = 6$) et le 17ème jour après la lésion (- 79,41 %; $p < 0,001$; $n = 6$). Cependant, aucune différence significative n'est observée entre les jours 15, 16 et 17 après la lésion.

La capacité d'apprentissage des animaux est testée du 14ème jour au 17ème jour après la lésion, en mesurant le temps mis par l'animal pour trouver la plate-forme située dans le cadran sud-ouest. Une analyse ANOVA à 1 facteur à mesures répétées réalisée à partir des résultats obtenus par le groupe contrôle et suivie par un test post-oc de Tukey indique une diminution significative des latences en fonction du temps (***) : $p < 0,001$ vs. J14). Une analyse ANOVA à 2 facteurs réalisée à partir des résultats obtenus par les différents groupes (contrôle, L3, L4) suivie d'un test post-oc de Tukey ne révèle aucune interaction entre les 2 facteurs (Figure 3.25). La mémoire spatiale des animaux est testée

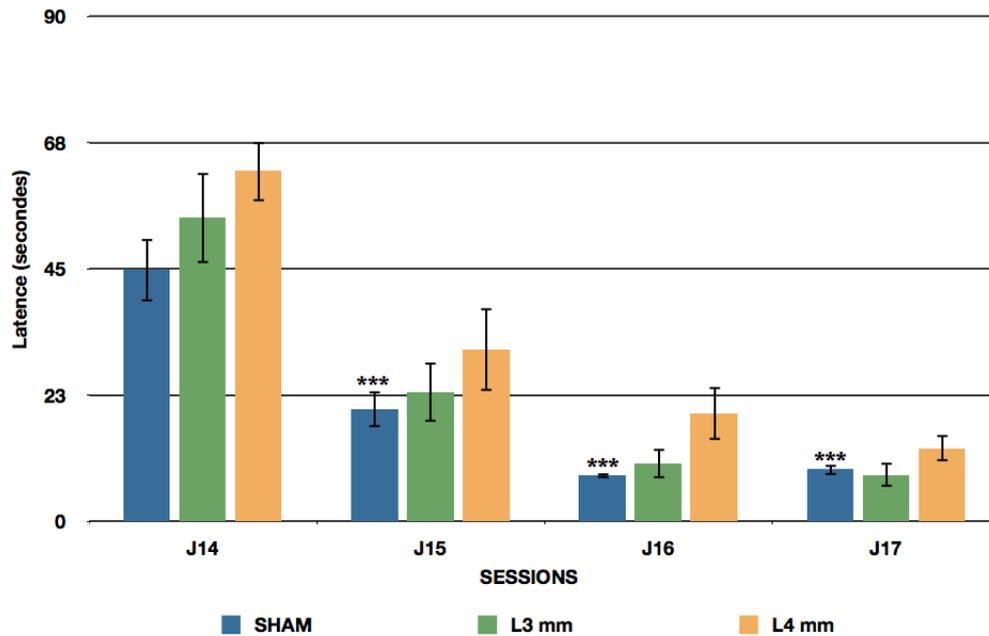


FIGURE 3.24 – Evaluation des capacités cognitives des animaux après lésion unilatérale du cortex par contusion corticale contrôlée à 3 mm ou 4 mm de profondeur. La capacité d'apprentissage des animaux est testée du 14ème jour au 17ème jour après la lésion, en mesurant le temps mis par l'animal pour trouver la plate-forme située dans le cadran sud-ouest. (***) : $p < 0,001$ vs. J 14).

21 jours et 28 jours après la lésion. La plate-forme est retirée de la piscine. On mesure le temps que passent les animaux dans le cadran où se trouvait la plate-forme (sud-ouest). Une analyse ANOVA à 2 facteurs réalisée à partir des résultats obtenus par les différents groupes (contrôle, L3, L4) suivie d'un test post-oc de Tukey ne révèle aucune interaction entre les 2 facteurs. L'ANOVA à 2 facteurs réalisée à partir des résultats obtenus par chacun des différents groupes (contrôle, L3, L4) avec [le groupe] et [le temps] comme facteurs, suivie d'un test post-oc de Tukey, n'indique aucune interaction [temps] x [groupe] ($F(6,79) = 0,529$; $p = 0,784$; $n = 6$ à 10). Néanmoins, bien que ces résultats ne soient pas significatifs, une tendance à l'augmentation des latences semble se dégager chez les animaux lésés, pour ce qui concerne notamment les animaux du groupe L4. Les résultats obtenus par les animaux dans les expériences destinées à évaluer les capacités de restitution de la mémoire spatiale, sont présentés dans la Figure 3.25. Une ANOVA à 1 facteur et à mesures répétées, avec le [temps] comme facteur, réalisée à partir des données obtenues par les animaux contrôles suivie d'un test post-oc de Tukey, ne met en évidence aucune différence significative au niveau du temps passé dans le cadran sud-ouest de la piscine entre J21 et J28 ($F(1,11) = 4,051$; $p = 0,1$; $n = 6$). De même, une ANOVA à 2 facteurs réalisée à partir des résultats obtenus par chacun des différents groupes (contrôle, L3, L4), avec le [groupe] et le [temps] comme facteurs, suivie d'un test post-oc de Tukey, n'indique aucune interaction [temps] x [groupe] ($F(2,39) = 0,371$; $p = 0,693$; $n = 6$ à 8).

L'ANOVA à 2 facteurs réalisée à partir des résultats obtenus par chacun des différents groupes (contrôle, L3, L4) avec [le groupe] et [le temps] comme facteurs, suivie d'un test post-oc de Tukey, n'indique aucune interaction [temps] x [groupe] ($F(6,79) = 0,529$; $p = 0,784$; $n = 6$ à 10). Néanmoins, bien que ces résultats ne soient pas significatifs, une tendance à l'augmentation des latences semble se dégager chez les animaux lésés, pour ce qui concerne notamment les animaux du groupe L4. Les résultats obtenus par les animaux dans les expériences destinées à évaluer les capacités de restitution de la

mémoire spatiale, sont présentés dans la Figure 3.25. Une ANOVA à 1 facteur et à mesures répétées, avec le [temps] comme facteur, réalisée à partir des données obtenues par les animaux contrôles suivie d'un test post-oc de Tukey, ne met en évidence aucune différence significative au niveau du temps passé dans le cadran sud-ouest de la piscine entre J21 et J28 ($F(1,11) = 4,051$; $p = 0,1$; $n = 6$). De même, une ANOVA à 2 facteurs réalisée à partir des résultats obtenus par chacun des différents groupes (contrôle, L3, L4), avec le [groupe] et le [temps] comme facteurs, suivie d'un test post-oc de Tukey, n'indique aucune interaction [temps] x [groupe] ($F(2,39) = 0,371$; $p = 0,693$; $n = 6$ à 8).

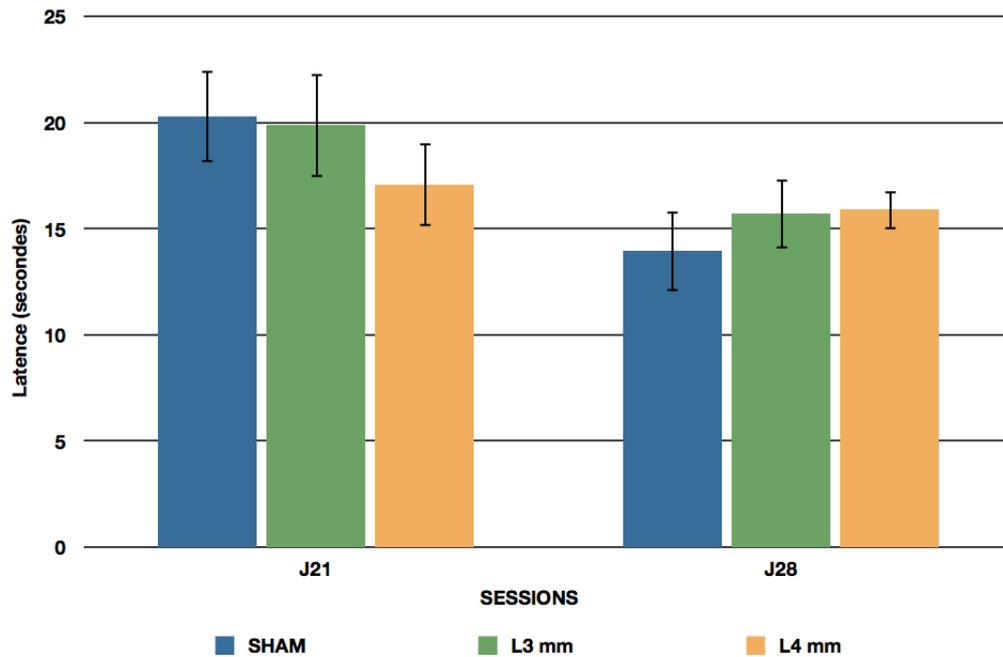


FIGURE 3.25 – La mémoire spatiale des animaux est testée 21 jours et 28 jours après la lésion. La plate-forme est retirée de la piscine. On mesure le temps que passent les animaux dans le cadran où se trouvait la plate-forme (sud-ouest).

Effets de l'inhibition du TGF- β 1 sur les performances sensori-motrices chez les animaux ayant subi un impact de 3 mm de profondeur

L'inhibition de l'ARNm du TGF- β 1 est réalisée à l'aide d'un oligonucléotide anti-sens administré par voie intra-cérébro-ventriculaire (ICV) pendant 14 jours grâce à une mini-pompe osmotique, chez les animaux ayant subi une lésion de 3 mm de profondeur. Les rats contrôles sont traités selon les mêmes modalités mais avec une solution physiologique (NaCl 0,9 %). Une ANOVA à 2 facteurs réalisée à partir des scores obtenus par les différents groupes (contrôles; Oligo. @-TGF- β 1 = rats traités avec un oligonucléotide anti-sens dirigé contre l'ARNm du TGF- β 1) avec le [temps] et le [traitement] comme facteurs, suivi d'un test post-oc de Turkey, n'indique aucune interaction [temps] x [traitement] ($F(6,87) = 0,419$; $p = 0,864$; $n = 5$ à 6). Cependant, une tendance à l'amélioration des performances sensori-motrices chez les animaux traités avec l'oligonucléotide anti-sens semble se dégager le 2ème jour et le 7ème jour après la lésion. Une valeur proche de la significativité est d'ailleurs observée à J 7 ($p = 0,06$; $n = 8$). Bien que les résultats ne soient pas significatifs, la récupération fonctionnelle semble donc plus rapide pour les rats traités (Figure 3.26).

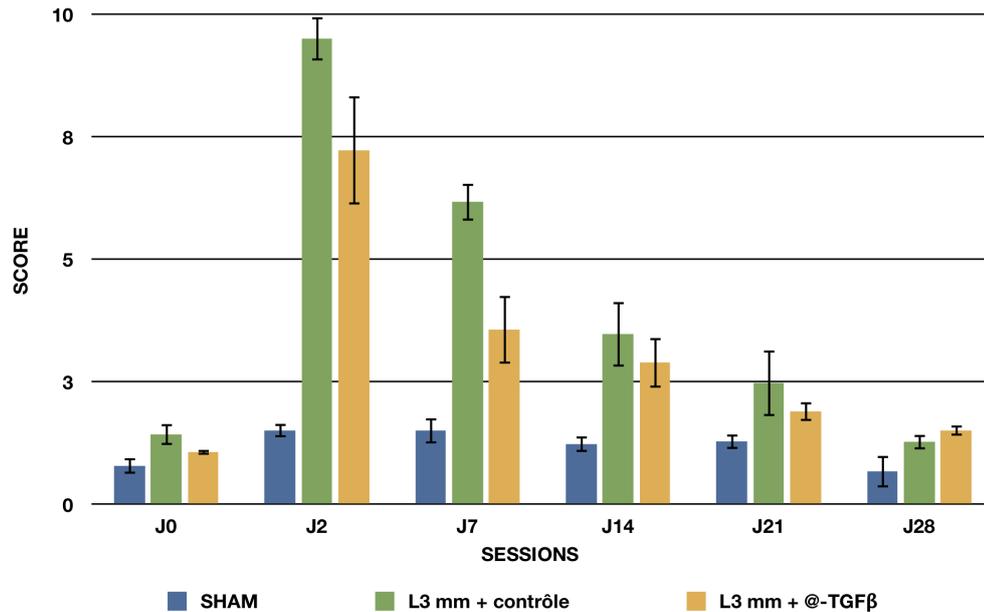


FIGURE 3.26 – Effet de l’inhibition de l’ARNm du TGF- β 1 sur l’évaluation des performances sensori-motrices des animaux après lésion unilatérale du cortex par contusion corticale contrôlée à 3 mm de profondeur.

L’inhibition de l’ARNm du TGF- β 1 est réalisée à l’aide d’un oligonucléotide anti-sens dirigé contre l’ARNm du TGF- β 1 (L3 + Oligo. @-TGF- β 1). Les rats contrôles sont traités selon les mêmes modalités mais avec une solution physiologique (L3 + NaCl). Une ANOVA à 2 facteurs réalisée à partir des résultats obtenus par les différents groupes avec le [temps] et le [traitement] comme facteurs suivie d’un test post-oc de Tukey n’indique aucune interaction entre les facteurs ($F(6,87) = 0,419$; $p = 0,864$; $n = 5$ à 6).

Effets de l’inhibition du TGF- β 1 sur les performances sensori-motrices chez les animaux ayant subi un impact de 4 mm de profondeur

Une ANOVA à 2 facteurs réalisée à partir des scores obtenus par les différents groupes (contrôles; Oligo. @-TGF- β 1 = rats traités avec un oligonucléotide anti-sens dirigé contre l’ARNm du TGF- β 1)(Figure 3.27)avec le [temps] et le [traitement] comme facteurs suivie d’un test post-oc de Turkey n’indique aucune interaction [temps] x [traitement] ($F(5,83) = 1,206$; $p = 0,315$; $n = 6$ à 8). Malgré l’absence d’interaction, cette analyse indique une différence significative au sein du facteur traitement ($p = 0,014$; $n = 6$ à 8). Cette différence est cependant indépendante du facteur temps et se révèle ponctuellement à J21 (+ 21 %; $p < 0,05$; $n = 6$ à 8).

L’inhibition de l’ARNm du TGF- β 1 est réalisée à l’aide d’oligonucléotide anti-sens dirigé contre l’ARNm du TGF- β 1 (L4 + Oligo. @-TGF- β 1). Les rats contrôles sont traités selon les mêmes modalités mais avec une solution physiologique (L4 + NaCl). Une ANOVA à 2 facteurs réalisée à partir des résultats obtenus par les différents groupes avec le [temps] et le [traitement] comme facteurs suivie d’un test post-oc de Tukey n’indique aucune interaction entre les facteurs ($F(5,83) = 1,206$; $p = 0,315$; $n = 6$ à 8).

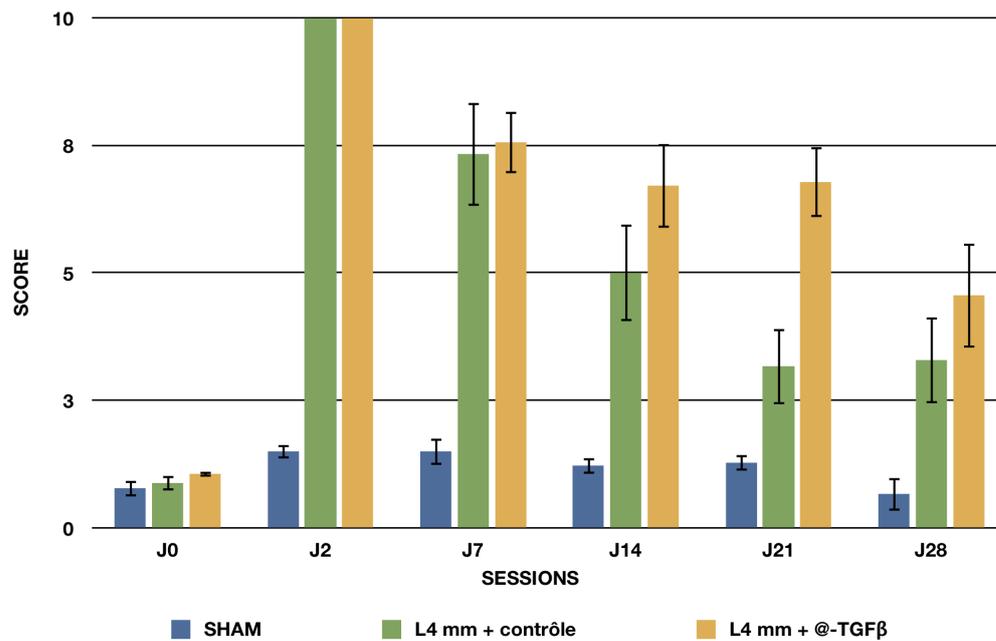


FIGURE 3.27 – Effet de l’inhibition de l’ARNm du TGF- β 1 sur l’évaluation des performances sensori-motrices des animaux après lésion unilatérale du cortex par contusion corticale contrôlée à 4 mm de profondeur.

Effets de l’inhibition du TGF- β 1 sur les performances cognitives chez les animaux ayant subi un impact de 3 mm de profondeur

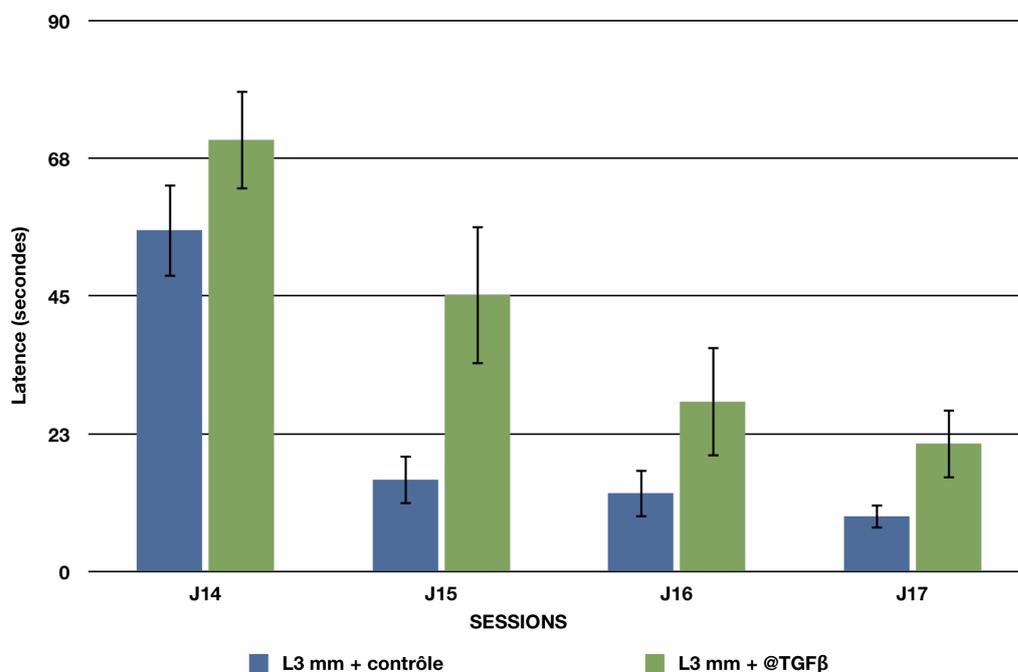


FIGURE 3.28 – Effet de l’inhibition de l’ARNm du TGF- β 1 sur l’évaluation des capacités cognitives après lésion unilatérale du cortex par contusion corticale contrôlée à 3 mm.

Une ANOVA à 2 facteurs réalisée à partir des scores obtenus par les différents groupes (contrôles ; Oligo. @-TGF- β 1 = rats traités avec un oligonucléotide anti-sens dirigé contre

l'ARNm du TGF- β 1) avec le [temps] et le [traitement] comme facteurs suivie d'un test post-oc de Turkey n'indique aucune interaction [temps] x [traitement] ($F(3,43) = 0,618$; $p = 0,608$; $n = 5$ à 6) (Figure 3.28). Malgré l'absence d'interaction, une différence significative est observée au sein du facteur traitement ($p = 0,02$; $n = 6$). Bien que cet effet soit indépendant du facteur temps, il se relève néanmoins à J15 de manière significative (+ 30 %; $p < 0,001$; $n = 5$ à 6).

Une ANOVA à 2 facteurs réalisée à partir des résultats obtenus dans les expériences destinées à évaluer la mémoire spatiale, avec le [temps] et le [traitement] comme facteurs suivie d'un test post-oc de Turkey n'indique aucune interaction [temps] x [traitement]. Une tendance semble néanmoins se dégager à J 21 entre les animaux du groupe contrôle et les animaux traités (Figure 3.29). Ces derniers semblent passer légèrement moins de temps que le groupe contrôle dans le quart sud-ouest.

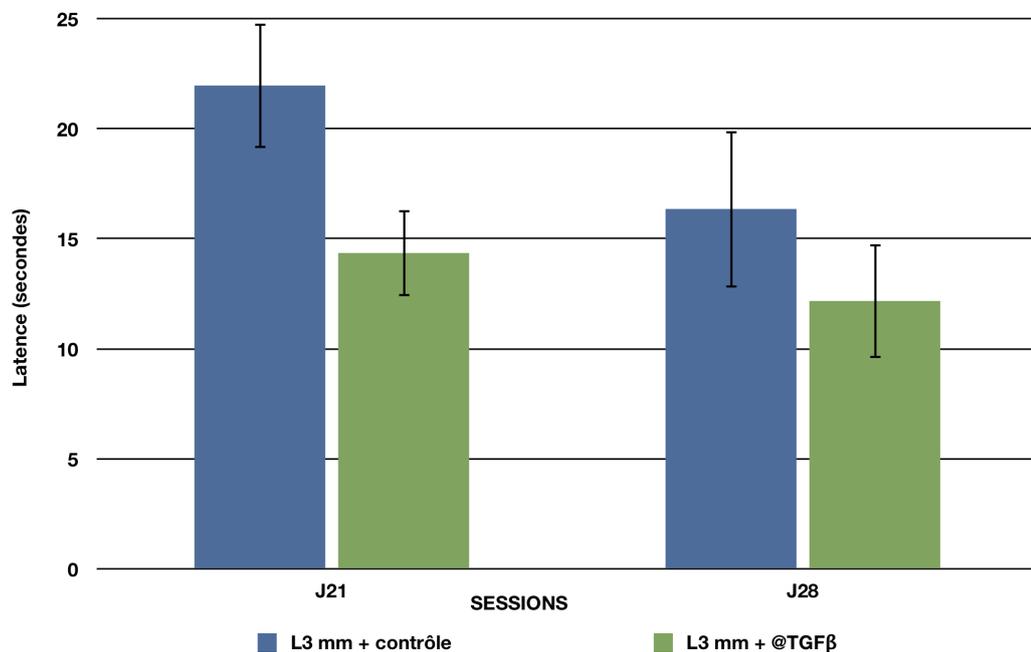


FIGURE 3.29 – Effet de l'inhibition de l'ARNm du TGF- β 1 la mémoire spatiale des animaux après lésion unilatérale du cortex par contusion corticale contrôlée à 3 mm.

Effets de l'inhibition du TGF- β 1 sur les performances cognitives chez les animaux ayant subi un impact de 4 mm de profondeur

Une ANOVA à 2 facteurs réalisée à partir des résultats obtenus dans les expériences destinées à évaluer la mémoire spatiale, par les différents groupes (contrôles; Oligo. @-TGF- β 1 = rats traités avec un oligonucléotide anti-sens dirigé contre l'ARNm du TGF- β 1) avec le [temps] et le [traitement] comme facteurs suivie d'un test post-oc de Turkey n'indique aucune interaction [temps] x [traitement] ($F(6,87) = 0,419$; $p = 0,864$; $n = 8$ à 6).) (Figure 3.30).

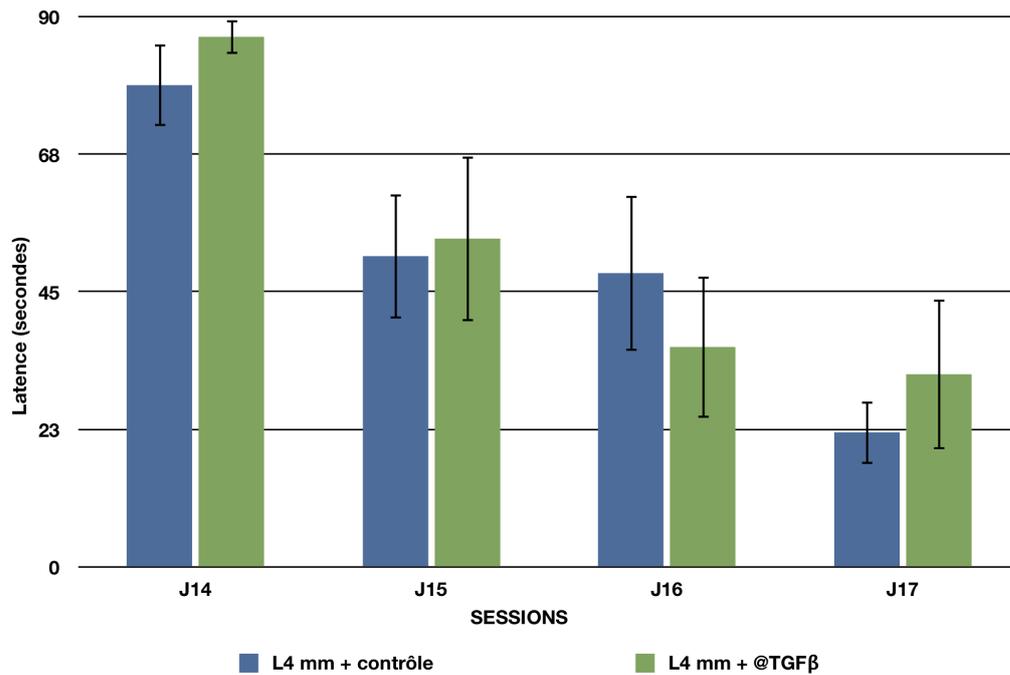


FIGURE 3.30 – Effet de l’inhibition de l’ARNm du TGF- β 1 sur l’évaluation des capacités cognitives lésion unilatérale du cortex par contusion corticale contrôlée à 4 mm.

La mémoire spatiale des animaux est testée 21 jours et 28 jours après la lésion. La plate-forme est retirée de la piscine. On mesure le temps que passent les animaux dans le cadran où se trouvait la plate-forme (sud-ouest). Une analyse ANOVA à 2 facteurs réalisée à partir des résultats obtenus par les différents groupes suivis d’un test post-oc de Tukey ne révèle aucune interaction entre les 2 facteurs (Figure 3.31).

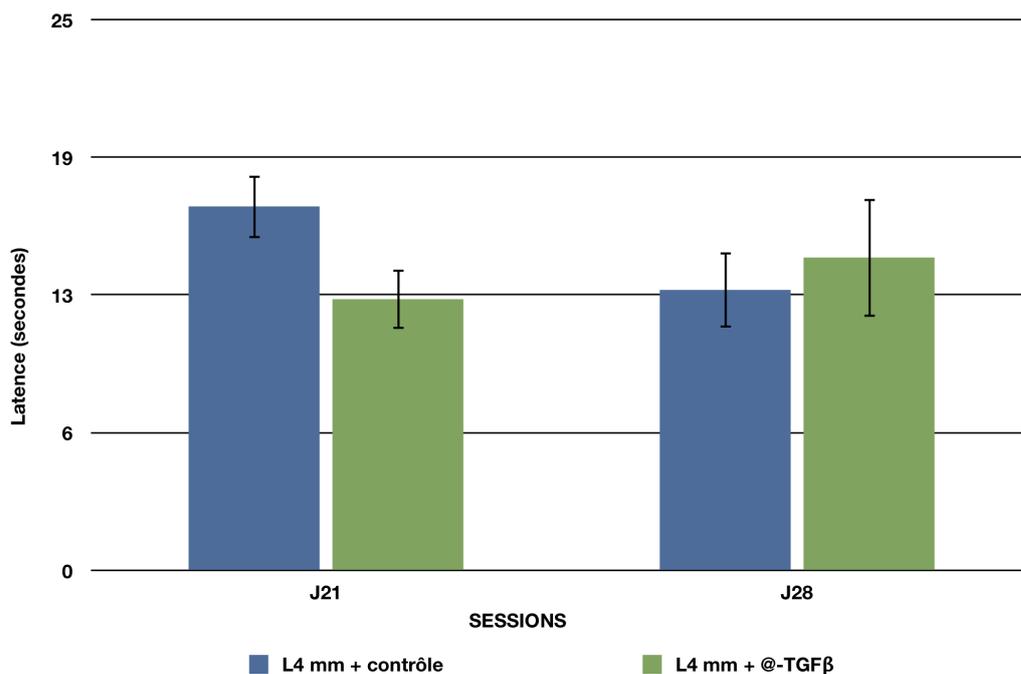


FIGURE 3.31 – Effet de l’inhibition de l’ARNm du TGF- β 1 sur la mémoire spatiale après lésion unilatérale du cortex par contusion corticale contrôlée à 4 mm.

Dosages de l'activité des MMPs

Différents kits commerciaux de dosage de l'activité des MMPs ont été testés dans le but de mettre au point une méthode adaptée aux expériences de microdialyse *in vivo*. Afin de limiter le nombre d'animaux, les expériences préliminaires ont été réalisées sur des surnageants de cultures (lignée de glioblastomes humains U118 qui expriment les MMPs que nous recherchons dans le dialysat). Cependant, aucune de nos expériences n'a permis de détecter de fluorescence dans les surnageants de culture. Les kits de dosage utilisés pourraient donc ne pas être assez sensibles pour détecter une faible activité des MMPs. Cette faible activité pourrait s'expliquer par une faible expression de ces protéases par la lignée de glioblastome utilisée (U118-MG). Cette hypothèse est, cependant, peu encourageante car les taux de MMPs présents dans les surnageants de culture sont théoriquement plus élevés que ceux attendus dans les dialysats (le taux de dialyse n'étant, généralement, que de 10 %). Néanmoins, l'utilisation d'une méthode de dosage reposant sur la technique de zymographie ou d'ELISA pourrait constituer une alternative intéressante.

3.4.3 Discussion

Evaluation de l'étendue du territoire lésé en fonction de la profondeur d'impact

Les observations macroscopiques et microscopiques indiquent que les rats ayant subi une contusion avec une profondeur d'impact de 4 mm présentent des dommages beaucoup plus importants que les animaux soumis à un impact de 3 mm de profondeur à une vitesse de contusion identique. En effet, notre appareillage ne nous permet pas de dépasser une vitesse de 1,5 m/s alors que celles utilisées dans la majorité des autres études sont généralement supérieures. Néanmoins, les dommages que nous avons observés chez les animaux soumis à une contusion de 4 mm de profondeur sont similaires à ceux relatés 3 jours après la lésion par [Hoane *et al.*, 2006] avec une vitesse de 2,5 m/s et une profondeur d'impact de 2 mm. De même, [Chen *et al.*, 2007] ont observé, 4 jours après contusion du cortex à une vitesse de 4 m/s et à une profondeur d'impact de 2 mm, des lésions similaires à celles présentées par les animaux soumis, dans nos expériences, à un impact de 4 mm de profondeur. En revanche, [Khan *et al.*, 2009] ont mis en évidence des dégâts importants 7 jours après impact à une vitesse de 1,5 m/s et une profondeur de 3 mm alors que nous n'avons observé que de légers dommages avec ces paramètres. Ces résultats mettent donc en évidence que les paramètres lésionnels semblent relativement spécifiques du matériel utilisé. Par ailleurs, nos propres expériences indiquent qu'une légère modification de ces paramètres peut conduire à d'importantes différences au niveau de l'étendue des territoires lésés, renforçant de ce fait l'intérêt de nos analyses macroscopiques et microscopiques.

Evaluation des performances sensori-motrices chez les animaux ayant subi un impact de 3 mm ou 4 mm de profondeur

La diminution des performances sensori-motrices observée à 2 jours et 7 jours après la lésion chez les animaux contrôles peut paraître étonnante. Néanmoins, comparativement aux déficits présentés par les animaux des groupes L3 et L4, l'amplitude des déficits sensori-moteurs des animaux du groupe contrôle est faible. L'anesthésie générale et la craniotomie subies par les animaux contrôles pourraient expliquer cette diminution des performances sensori-motrices. En effet, des résultats similaires ont également été observés chez des animaux contrôles [Piot-Grosjean *et al.*, 2001]. L'absence de significativité entre les groupes contrôle, L3, L4 à 21 jours et 28 jours après la lésion traduit une

récupération fonctionnelle des rats lésés. Ceci suggère que les animaux pourraient être capables de développer des stratégies d'adaptation, notamment grâce aux phénomènes de plasticité neuronale. De nouveaux circuits neuronaux favorisés par les mécanismes de repousse axonale pourraient se mettre en place afin de compenser le déficit occasionné par la lésion. Par ailleurs, la lésion n'étant opérée que de manière unilatérale, il n'est pas à exclure que le cortex sensori-moteur contralatéral puisse également contribuer à ces phénomènes d'adaptation. Ces phénomènes de récupération des performances sensori-motrices sont conformes aux données de la littérature. Cependant, le délai avec lequel les animaux retrouvent des capacités comparables à celles des témoins est variable. Des études font état de phénomènes de récupération en 7 jours [Moreira *et al.*, 2007], 14 jours [Bueno-Nava *et al.*, 2008], voire une récupération partielle au bout d'un mois [Gornicka-Pawlak *et al.*, 2009]. Cette variabilité dans le délai de récupération dépend probablement de l'étendue du territoire lésé et de la méthode de lésion utilisée : percutané par fluide [Bueno-Nava *et al.*, 2008], compression corticale [Moreira *et al.*, 2007], lésion chimique [Gornicka-Pawlak *et al.*, 2009] ou contusion corticale contrôlée [Chen *et al.*, 2008]. L'augmentation des déficits sensori-moteurs présentés par des animaux soumis à des dommages tissulaires plus importants valide la méthodologie employée pour réaliser cette analyse comportementale. Néanmoins, compte-tenu de l'importante différence au niveau de l'étendue des lésions présentées par les animaux L3 et L4, l'ampleur des déficits sensori-moteurs entre ces 2 groupes semble relativement faible, suggérant que notre test pourrait avoir un pouvoir discriminatif limité. Une augmentation de la difficulté de réalisation de la tâche pourrait probablement permettre de pallier ce problème. Cette hypothèse semble confortée par les études dans lesquelles la poutre est inclinée [Gaur *et al.*, 2009] ou encombrée d'obstacle [Arcadi *et al.*, 1998].

Evaluation des performances cognitives chez les animaux ayant subi un impact de 3 mm ou 4 mm de profondeur

Les résultats obtenus par les animaux contrôles dans les expériences évaluant les capacités d'apprentissage indiquent une vitesse d'apprentissage particulièrement rapide. Néanmoins, les résultats obtenus par les animaux lésés sont surprenants, notamment en ce qui concerne le groupe d'animaux lésés L4. En effet, compte-tenu de l'étendue des lésions présentées par ces animaux, il paraît improbable que leurs déficits cognitifs soient de si faible ampleur comparativement aux deux autres groupes d'animaux. Pour des raisons techniques, nous avons dû utiliser une piscine d'un diamètre de 125 cm alors qu'il semblerait plus indiqué de réaliser ce test dans une piscine de 180 cm de diamètre pour des rats. Cette réduction du diamètre de la piscine pourrait augmenter les probabilités que l'animal trouve la plate-forme par hasard et induire un biais expérimental. Par ailleurs, la salle dans laquelle ont été réalisées ces expériences a également été utilisée pour l'analyse des performances sensori-motrices, multipliant alors les points de repères disponibles et rendant la tâche plus facile à réaliser pour l'animal. Par ailleurs, nous avons également observé une forte variabilité au sein des animaux d'un même groupe. Il serait donc judicieux de recommencer ces analyses avec un matériel plus adapté, dans une pièce spécifiquement dédiée et avec des échantillons de taille plus importante.

Effets de l'inhibition du TGF- β 1 sur les performances sensori-motrices chez les animaux ayant subi un impact de 3 mm de profondeur

Le TGF- β 1 est impliqué dans la régulation des protéines de la MEC au niveau des sites de lésion en inhibant la production des MMPs et en augmentant l'expression de protéases comme les TIMPs [Verrecchia et Mauviel, 2002, Brionne *et al.*, 2003]. Il induit par ailleurs l'activation des astrocytes favorisant, par conséquent, la formation de la

cicatrice gliale [Moon et Fawcett, 2001]. Il semble également jouer un rôle dans les processus inflammatoires en activant les cellules de la microglie [Lesné *et al.*, 2002]. Enfin, il participe à la neuroprotection en inhibant notamment les phénomènes d'excitotoxicité [Docagne *et al.*, 2003]. Nos analyses histologiques indiquent que, 2 jours après la lésion traumatique opérée avec une profondeur d'impact de 3 mm, les animaux présentent une destruction du cortex cérébral relativement modérée. Il est par conséquent probable que, chez ces animaux, le phénomène de réaction astrocytaire soit lui-même également modéré, tout comme les phénomènes d'inflammation ou d'excitotoxicité. La tendance à une meilleure récupération des performances sensori-motrices chez les animaux soumis à l'inhibition du TGF- β 1 suggère une meilleure réparation du tissu neuronal chez ces animaux comparativement à ceux traités avec une solution physiologique. Cet effet pourrait indiquer que, dans le cas d'une lésion modérée, les effets bénéfiques de l'inhibition du TGF- β 1 sur la repousse axonale (inhibition de la gliose réactionnelle et inhibition de l'inflammation) sont prédominants. L'effet délétère résultant de l'inhibition des phénomènes de neuroprotection serait alors négligeable compte tenu de l'étendue limitée des lésions. Ces interprétations sont cependant à considérer avec réserve en raison de la non-significativité de nos résultats. Pour tester cette hypothèse, il serait néanmoins intéressant de réaliser une analyse histologique approfondie entre les animaux contrôles et les animaux traités.

Effets de l'inhibition du TGF- β 1 sur les performances sensori-motrices chez les animaux ayant subi un impact de 4 mm de profondeur

Nos analyses histologiques indiquent que 2 jours après la lésion traumatique opérée avec une profondeur d'impact de 4 mm, les animaux présentent une destruction massive du cortex accompagnée d'altérations importantes au niveau des structures sous-corticales ipsilatérales. Cette lésion sévère se traduit probablement par une réaction astrocytaire massive accompagnée de phénomènes d'inflammation et d'excitotoxicité très importants. La tendance à une moins bonne récupération sensori-motrice chez les animaux soumis à ce type de lésion et à une inhibition du TGF- β 1, suggère une moins bonne réparation du tissu neuronal comparativement aux animaux traités avec une solution physiologique. Cette interprétation s'oppose à celle avancée pour expliquer l'effet bénéfique du traitement anti-TGF- β 1 chez des animaux soumis à une lésion traumatique modérée (L3). Néanmoins, l'effet délétère de l'inhibition du TGF- β 1 sur les phénomènes de neuroprotection, qui pourrait se révéler négligeable dans le cadre d'une lésion modérée, pourrait en revanche être prédominant dans le cadre d'une lésion sévère. En effet, compte tenu de l'étendue du territoire lésé dans le cas d'un impact avec une profondeur de 4 mm, il est probable que le traitement anti-TGF- β 1 ne soit pas suffisant pour inhiber les phénomènes de cicatrisation gliale et d'inflammation à un niveau permettant de compenser les processus d'excitotoxicité. Ces derniers, favorisés par la sévérité du traumatisme et renforcés par l'inhibition du TGF- β 1, pourraient en effet masquer les effets bénéfiques observés lors d'une lésion modérée. Cette interprétation semble en accord avec le fait que cet effet délétère se révèle plus tardivement que l'effet bénéfique observé précédemment. Une analyse histologique approfondie pourrait là encore nous permettre de tester cette hypothèse.

Effets de l'inhibition du TGF- β 1 sur les performances cognitives chez les animaux ayant subi un impact de 3 mm de profondeur

Les animaux traités avec l'oligonucléotide anti-sens dirigé contre l'ARNm du TGF- β 1 semblent apprendre la tâche moins rapidement et présentent une moins bonne restitution de la mémoire spatiale que les animaux contrôles. La tendance à une diminution des

capacités d'apprentissage et de mémorisation observées chez les animaux lésés avec une profondeur d'impact de 3 mm et soumis à l'inhibition du TGF- β 1 suggère une altération des processus de réparation tissulaire. Ces résultats sont cependant incohérents avec ceux obtenus par les mêmes animaux lors de l'évaluation des capacités sensori-motrices. Néanmoins, il nous est difficile d'interpréter et de discuter ces résultats compte tenu de leur non significativité (pas d'interaction entre les facteurs temps et traitement) et du fait que nos expériences avec des lésions de sévérités différentes n'ont pas permis de valider la méthodologie employée pour la réalisation de ce test.

Effets de l'inhibition du TGF- β 1 sur les performances cognitives chez les animaux ayant subi un impact de 4 mm de profondeur

Les résultats nous semblent une fois de plus difficile à interpréter et à discuter compte tenu de leur non significativité (pas d'interaction entre les facteurs temps et traitement) et du fait que nos expériences avec des lésions de sévérités différentes n'ont pas permis de valider la méthodologie employée pour la réalisation de ce test.

Conclusions

Lors de cette étude nous avons mis au point un modèle de lésion du cortex cérébral contrôlé, ainsi que des test comportementaux afin d'étudier les déficits causés par la lésion et afin d'étudier l'effet potentiellement neurorégénérateur de molécule comme le TGF- β . Cependant, le modèle reste à perfectionner notamment dans le cas de la piscine de Morris afin de nous placer dans des conditions plus optimales qui permettront une meilleure appréciation des observations. Une étude histologique plus détaillée des lésions est également nécessaire, en utilisant notamment différents marqueurs d'activation des astrocytes comme l'actine α -ML. Enfin, nos travaux concernant l'étude de différents traitements neuroprotecteurs agissant sur le comportement astrocytaire et la formation de la cicatrice gliale, doivent être précisés.

Chapitre 4

Effets de la stimulation de la voie TLR4 sur la prolifération et la migration des cellules de glioblastomes induites par l'activation de la voie Fas

En révision

4.1 But de l'étude

Dans cette étude, nous avons étudié les interactions entre la voie pro-apoptotique Fas et la voie TLR4 afin de déterminer si, comme c'est le cas dans les lymphocytes B [Acosta-Rodríguez *et al.*, 2007], l'activation de la voie TLR4 est capable d'augmenter la susceptibilité des glioblastomes à mourir lors de l'activation de la voie Fas.

4.2 Introduction

Le glioblastome (ou astrocytome de grade IV) est la tumeur primitive du cerveau la plus fréquente et la plus agressive. Le principal traitement demeure actuellement la résection chirurgicale complète, mais cette résection complète est en réalité pratiquement impossible à cause du caractère très invasif de cette tumeur. La rechute est quasiment inévitable et le taux de survie très faible. Différents traitements, associés à la résection chirurgicale, sont utilisés comme la radiothérapie ou l'administration de temozolomide, médicament anticancéreux commercialisé sous le nom de TEMODAL par les laboratoires Schering Plough. Cependant, définitivement, ce type de tumeur reste associé à un très mauvais pronostic avec moins 30 % de survie à 1 an, 5 % à 3 ans et 3 % à 5 ans (Populations Européenne et US) [Brandes *et al.*, 2008]. Aujourd'hui, des études sur les radiosensibilisateurs, l'hypoxie, le métabolisme, l'angiogenèse et la nature infiltrante de ces tumeurs [Palanichamy et Chakravarti, 2009], ainsi que l'étude des mécanismes impliqués dans l'apoptose ou l'arrêt de la croissance sont en cours. L'activation de la voie Fas (CD95/APO-1) est connue pour induire l'apoptose dans certaines tumeurs et pour induire par conséquent, la régression de ces tumeurs [Arai *et al.*, 1997]. Fas est une glycoprotéine transmembranaire qui appartient à la super famille des récepteurs au « tumor necrosis factor » (TNF). L'interaction de Fas avec son ligand (Fasl) entraîne le recrutement de différentes molécules adaptatrices qui vont former le « death-inducing complex » (DISC) [Ashkenazi et Dixit, 1998] et entraîner la création d'un signal pro-apoptotique par l'intermédiaire de l'activation de la voie des caspases [Scaffidi *et al.*, 1999]. Dans le cas des glioblastomes, l'activation de la voie Fas est liée à une augmentation de la pathogénicité [Shinohara *et al.*, 2000] provoquée par une prolifération cellulaire liée à l'activation des protéines « extracellular signal-regulated kinases » (ERK) [Shinohara *et al.*, 2000]. Au contraire, des études récentes ont montré que le lipopolysaccharide (LPS) provenant de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif et de certains virus pouvait expérimentalement, grâce à l'activation du « Toll-like receptor 4 » (TLR4), limiter l'extension des glioblastomes [Chicoine *et al.*, 2007]. L'association de TLR4/MD2/CD14 constitue le récepteur au LPS [Cohen, 2002]. Le CD14 est une protéine qui peut se retrouver sous une forme soluble ou associée à la membrane cellulaire. La forme soluble peut se lier au domaine extracellulaire du TLR4, le tout étant stabilisé par le MD2 à la surface de la cellule. Le TLR4/MD2/CD14 possède une forte affinité pour le LPS et va initier une cascade d'événements provoquant l'activation du NF-KB qui va ensuite classiquement induire la transcription de différents facteurs [Barton et Medzhitov, 2003]. De plus, l'activation de la voie du LPS, associée avec l'expression de la cytokine « B cell activating factor belonging to the TNF family » (BAFF) qui est impliquée normalement dans la survie et la maturation des lymphocytes B, va augmenter la sensibilité des cellules B à la mort induite par l'activation de la voie Fas [Acosta-Rodríguez *et al.*, 2007]. Les lymphocytes B murins activés de façon concomitante par le LPS et BAFF sont protégés d'une apoptose spontanée mais sont davantage susceptibles à la mort cellulaire induite par Fas. Ce processus est associé à une augmentation très importante de l'expression de Fas par un mécanisme qui passe notamment par l'inhibition de la voie mitogen-activated protein kinase (MEK)/ERK [Acosta-Rodríguez *et al.*, 2007]. De plus, il est classiquement admis

que les processus impliqués dans les différents stades de progression des cancers (prolifération cellulaire, réduction de l'apoptose, recrutement des cellules immunitaires, angiogénèse, induction de la multirésistance...), sont « protéases dépendants ». Parmi toutes les protéases, les caspases sont impliquées dans des mécanismes variés et notamment dans la cascade menant à l'apoptose [Pop et Salvesen, 2009]. Les MMPs également, par leur action sur leurs différents substrats, vont avoir des effets pro- ou anti-tumorigéniques et vont pouvoir interférer avec les mécanismes impliqués dans la croissance et la mort cellulaire [Fingleton, 2006]. Dans cette étude, les effets de l'activation des voies Fas et TLR4 sur la prolifération et la migration de deux lignées de glioblastomes humain en culture, ainsi que l'implication des caspases et des MMPs dans ces effets ont été analysés.

4.3 Méthodologie générale

Ce travail a été réalisé avec deux lignées de glioblastomes humains : U118-MG (ATCC n° HTB-15) et U87-MG (ATCC n° HTB-14). L'activation de la voie Fas a été réalisée à l'aide d'un anticorps agoniste (clone 7C11, beckman Coulter, Paris, France) conformément à des études précédemment réalisées dans le laboratoire [Bertrand *et al.*, 2009, Fauchais *et al.*, 2008]. L'activation de la voie TLR4 a été réalisée avec différentes concentrations de LPS. La prolifération cellulaire a été évaluée en utilisant un test XTT. Ce test est basé sur la capacité des cellules vivantes à réduire le sel de tetrazolium en formazan, composé soluble détectable grâce à un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 450 nm. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle au nombre de cellules viables et peut être utilisée pour évaluer la viabilité et la prolifération [Mosmann, 1983]. La validation de l'effet des traitements sur la prolifération des cellules de glioblastomes a été réalisée par cytométrie en flux grâce au Clik-iT EdU Flow Cytometry Assay Kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). L'apoptose cellulaire a été étudiée par dosage des nucléosomes solubles avec le kit Cell Death Detection ELISA PLUS (Roche Applied Science, Meylan, France). L'analyse de l'effet des caspases sur la prolifération des cellules de glioblastomes a été réalisée en utilisant un inhibiteur pan-caspases (BOK-FMK, Invitrogen). L'expression du TLR4 et des MMP-2 et 9 a été analysée par western blot après électrophorèse sur gel de polyacrylamide et révélation par électrochimiluminescence. Enfin, la migration cellulaire a été étudiée dans un modèle de plaie *in vitro* pratiqué sur un tapis cellulaire à confluence et confirmée par l'utilisation d'inserts en silicone (Biovalley, Marne-la-Vallée, France).

4.4 Résultats principaux

L'activation de la voie Fas induit une augmentation de la prolifération des deux lignées de glioblastomes. L'activation de la voie TLR4 par du LPS induit également la prolifération des cellules de glioblastomes quelque soit les concentrations utilisées. Dans les deux lignées, un effet dose dépendant est observé et nous avons choisi d'utiliser la concentration de 150 ng/ml de LPS pour les expériences ultérieures. La présence de TLR4 sur les deux lignées a été confirmée par western blot. L'activation des deux voies, de façon concomitante, provoque une diminution de la prolifération. Ces différents effets sur la prolifération ont été confirmés par cytométrie en flux. L'analyse de l'apoptose au sein des deux lignées montre que l'apoptose basale est plus élevée dans les U118-MG par rapport au U87-MG. L'activation de la voie Fas ne modifie pas l'apoptose des cellules U118-MG, mais augmente significativement l'apoptose des cellules U87-MG. De plus, l'activation de la voie TLR4 ne modifie pas l'apoptose basal dans aucune des deux lignées. Enfin, l'activation concomitante des deux voies ne modifie pas les observations faites après l'ac-

tivation de la voie Fas uniquement. L'utilisation d'un inhibiteur pan-caspases induit une inhibition significative de la prolifération induite par Fas dans les deux lignées cellulaires. Par contre, dans les deux lignées, cet inhibiteur ne modifie pas de façon significative la prolifération induite par l'activation de la voie TLR4. De plus, l'inhibiteur pan-caspases annule l'effet anti-prolifératif observé après activation concomitante des deux voies. Les tests de plaie *in vitro* montrent qu'une importante migration est observée lors de l'activation de la voie Fas par l'anticorps agoniste, alors qu'une augmentation minimale non significative est observée après activation de la voie TLR4. La stimulation concomitante des deux voies Fas et TLR4 ne produit pas de modification significative de la migration par rapport au contrôle. La MMP-9 est présente pour chaque condition, sous sa forme pro dans les lysats cellulaires et sous sa forme active à la fois dans les lysats cellulaires et les surnageants de culture. Dans les deux lignées cellulaires, une faible augmentation de la forme pro est observée dans les lysats cellulaires après activation des voies Fas ou TLR4. Après activation concomitante des deux voies, cette faible augmentation de la pro-MMP-9 disparaît. La forme active de la MMP-9 ne varie pas dans les lysats cellulaires quelque soit le traitement. Dans les surnageants, la forme active de la MMP-9 est augmentée après activation de la voie Fas, alors qu'elle est diminuée après activation du TLR4 et activation concomitante des deux voies. La forme pro de la MMP-2 a été détectée dans les lysats cellulaires ; la forme active n'a jamais été détectée que ce soit dans les lysats cellulaires ou dans les surnageants. Quelque soit le traitement, l'expression de la pro-MMP-2 n'est pas modifiée.

4.5 Discussion

Dans cette étude, nous avons montré une prolifération des deux lignées cellulaires (U118-MG et U87-MG) induite par l'activation de la voie Fas ; cet effet était inhibé par l'activation concomitante de la voie Fas et de la voie TLR4. Cet effet ne semble pas dû à une induction de l'apoptose, mais semble être dépendant des caspases. De plus, le traitement avec du LPS réduisait la migration cellulaire et l'expression de la MMP-9 active induite par l'activation de la voie Fas. Bien que l'activation de la voie Fas ait été classiquement décrite comme induisant l'apoptose, les astrocytes sont résistants à l'effet cytotoxique de Fas [Lee *et al.*, 2000] et d'autres études ont montré la résistance des glioblastomes à la mort induite par Fas [Riffkin *et al.*, 2001, Weller *et al.*, 1994]. Nos résultats confirment que l'activation de la voie de Fas, à côté de son effet classiquement décrit sur l'induction de l'apoptose, peut aussi au contraire induire la prolifération de populations cellulaires particulières. Récemment, il a été montré que, dans les cellules de glioblastomes, des modifications surviennent au niveau du DISC, provoquant une inhibition du clivage de la caspase 8 et le clivage du NF-KB, induisant alors une résistance des glioblastomes à l'apoptose [Bellail *et al.*, 2009]. En outre, le traitement avec du LPS induit également la prolifération des cellules de glioblastomes, avec un effet discret sur la lignée U118-MG, mais une forte induction sur la lignée U87-MG. Lorsque les lignées ont été traitées avec l'anticorps agoniste de Fas et du LPS conduisant à l'activation des voies Fas et TLR4, une diminution de la prolifération a été observée. Les mécanismes par lesquels la voie TLR4 est capable de moduler la prolifération induite par l'activation de la voie Fas ne sont pas actuellement connus. Nous avons clairement montré, par western blot, que le TLR4 est exprimé par les deux lignées de glioblastomes. Au contraire, Chicoine *et al.* (2007) n'ont pas montré d'expression de TLR4 ni de CD14 dans des cellules de glioblastomes traitées ou non expérimentalement *in vivo* avec du LPS ; dans ce travail, les auteurs suggèrent alors que l'effet du LPS observé serait dû à une expression de TLR4 par des éléments non tumoraux infiltrés comme la microglie ou les cellules inflammatoires. L'absence de TLR4 est aussi suggérée dans les astrocytes et les oligodendrocytes, cellules qui seraient

avec leurs progéniteurs à l'origine des glioblastomes [Lehnardt *et al.*, 2002]. Cependant, d'autres études ont montré que les astrocytes murins et humains sont capables d'exprimer TLR2, TLR3 et TLR4 en réponse à des infections virales et bactériennes, l'activation de ces récepteurs étant alors responsable de la production de cytokines pro-inflammatoires [Bowman *et al.*, 2003, Bsibsi *et al.*, 2002, Carpentier *et al.*, 2005]. De plus, certaines tumeurs sont connues pour exprimer les TLRs [Huang *et al.*, 2005]. Par exemple des études ont montré que la lignée de gliome GL261 exprime TLR2, TLR3 et TLR4. La stimulation de ces récepteurs avec les ligands correspondants induit une augmentation du CMH de classe I et la sécrétion d'IL-6 *in vitro* [Grauer *et al.*, 2008]. Quoiqu'il en soit, ayant prouvé que TLR4 est exprimé par les deux lignées de glioblastome U87-MG et U118-MG, on peut admettre que les effets provoqués par le traitement avec du LPS sont, dans notre étude, induits par la fixation du LPS à TLR4. De plus, Carpenter *et al.* (2009) ont décrit un nouveau composant du complexe TLR4 nommé « TLR4 interactor with leucine-rich repeats » (TRIL). TRIL qui est très exprimé dans les astrocytes, interagit avec le LPS et pourrait avoir une importance majeure dans la réponse de ces cellules aux stimulations du complexe TLR4 [Carpenter *et al.*, 2009]. En effet, le LPS a de nombreux autres effets biologiques, y compris des effets pro [Schildberg *et al.*, 2005, Sherwin *et Fern*, 2005] ou anti-apoptotiques [Chao *et al.*, 2005]. Nous avons observé que la diminution de la prolifération induite par l'activation concomitante des deux voies de signalisation n'était pas due à une augmentation de l'apoptose, mais que cet effet était caspases dépendant. En effet, si il est bien connu que les caspases sont des acteurs majeurs dans l'initiation et l'exécution de l'apoptose, il a également été montré que certaines caspases pouvaient à la fois, suivant les situations, promouvoir ou inhiber l'apoptose. Par exemple, c-FLIPL qui est une caspase tronquée, induit l'activation de la pro-caspase-8 et l'apoptose, mais c-FLIPL peut également inhiber l'apoptose [Chang *et al.*, 2002]. L'inhibiteur pan-caspases que nous avons utilisé, inhibe aussi c-FLIPL ; ceci pourrait expliquer la réduction par un traitement avec du LPS de la prolifération induite par l'activation de la voie Fas de façon caspases dépendante et sans induction de l'apoptose (Figure : 4.1).

L'activation de la voie Fas induit la migration des deux lignées de glioblastomes, mais la stimulation par du LPS ne modifie pas de manière significative cette migration. Dans notre étude, nous observons que la migration cellulaire induite par l'activation de la voie Fas disparaît totalement lorsque les cellules de glioblastomes sont traitées à la fois par l'anticorps agoniste de Fas et le LPS. Aujourd'hui il est bien admis que la migration des cellules est protéases dépendante avec une implication majeur des MMPs. Il est aussi bien connu, que l'activité protéolytique dans les tumeurs est régulée de façon complexe, aussi bien dans les cellules cancéreuses instables génétiquement, que dans les cellules du stroma, comme les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules inflammatoires [Guyot *et al.*, 2007b]. Des études *in vitro* et des études chez l'animal ont clairement démontré l'importance des protéases dans beaucoup de processus de carcinogenèse. Bien que les premiers essais cliniques portant sur des inhibiteurs de protéases soient restés sans succès, des études récentes montrent que l'utilisation d'inhibiteurs de MMPs associés avec des agents cytostatiques aurait un effet dans les stades précoces de développement d'un cancer (pour revue [Mannello *et al.*, 2005, Hidalgo *et Eckhardt*, 2001]). Ogier *et al.* (2005) ont observé que l'activation de Fas stimule la libération de MMP-9 par les astrocytes. De plus, il a été démontré que la MMP-9 faciliterait l'invasion des glioblastomes *in vitro* et qu'une surexpression de la MMP-9 serait corrélée avec la progression des gliomes *in vivo* [Komatsu *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2003a, Zhao *et al.*, 2007]. Ainsi, l'inhibition de l'expression de la MMP-9 après traitement des cellules de glioblastomes par l'anticorps agoniste de Fas et le LPS, pourrait être responsable de l'inhibition de la migration. Nos résultats montrent donc que l'activation concomitante des voies Fas et TLR4 provoque un effet anti-prolifératif, et inhibe la migration, tout en induisant une réduction de l'expression de la forme active de la MMP-9. De façon intéressante, dans notre étude, les

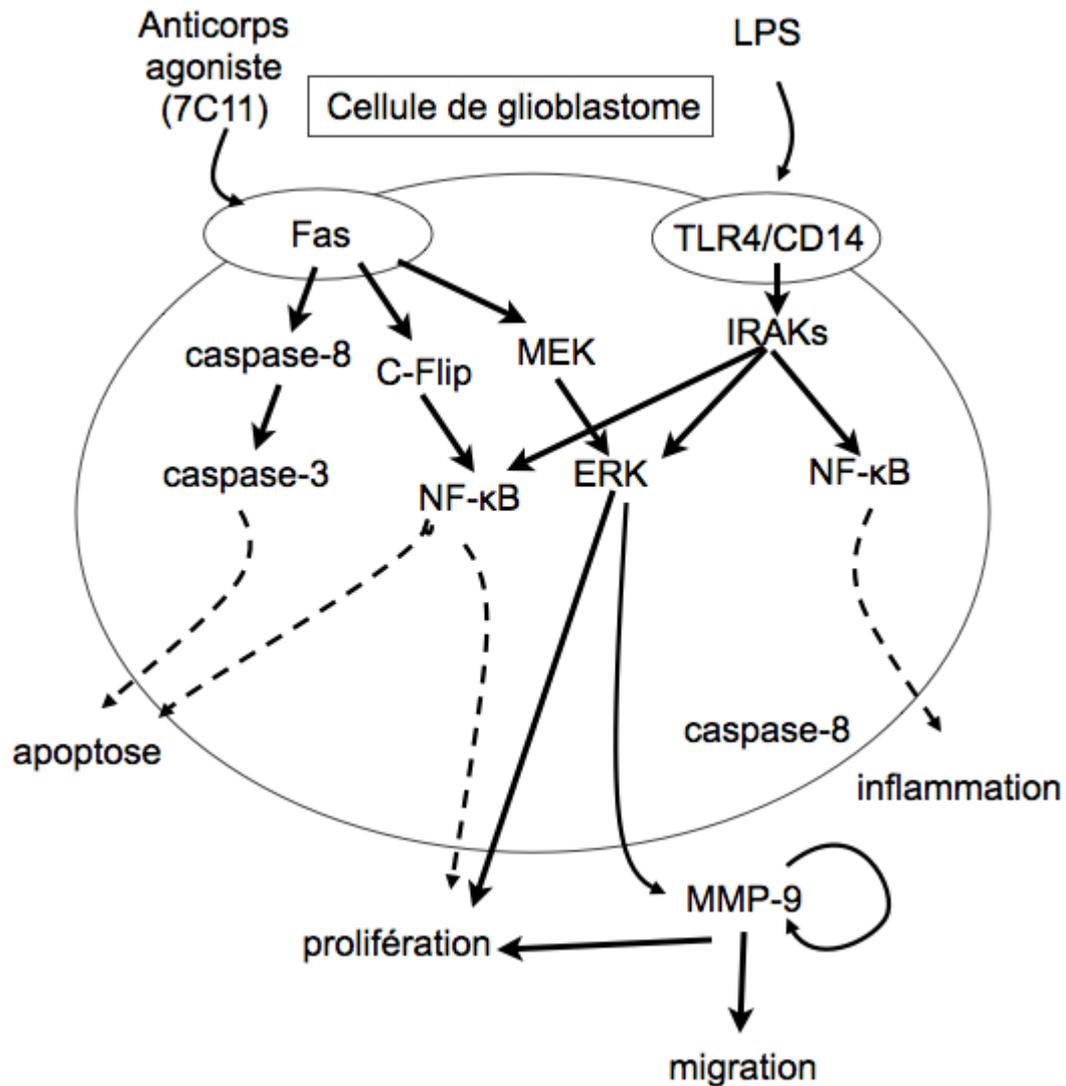


FIGURE 4.1 – Schématisation des interactions entre les voies Fas et TLR4 dans les cellules de glioblastome.

deux lignées de glioblastomes ont réagi de la même manière. Cependant, même si les deux lignées sont des astrocytomes de grade IV, la lignée U87-MG est souvent décrite comme étant très résistante à l'action de substances pouvant présenter des propriétés anti-cancéreuses. De fait, nous avons observé dans la lignée U87-MG, la présence de cellules souches qui pourraient être impliquées dans l'agressivité plus prononcée de ces cellules de glioblastomes [Bertrand *et al.*, 2009]. Les glioblastomes, et particulièrement ceux qui expriment le récepteur Fas, sont très résistants aux thérapies conventionnelles. La combinaison de deux agents anti-cancéreux pourrait être une bonne approche pour limiter cette résistance à la chimiothérapie. Par exemple, nous avons démontré expérimentalement *in vivo*, qu'un traitement avec le FasL et l'étoposide diminue la prolifération et induit l'apoptose dans des glioblastomes. En effet, la combinaison de ces deux molécules réduit de façon significative la taille des tumeurs après une xéno greffe de cellules de glioblastomes dans le cerveau de rats [Giraud *et al.*, 2007]. Ainsi, l'association de molécules capables d'induire des effets anti-prolifératifs et anti-migratoires pourrait offrir une nouvelle alternative thérapeutique pour traiter des glioblastomes qui pour la plupart d'entre eux répondent peu ou pas aux thérapeutiques actuellement disponibles.

4.6 Effects of TLR4 pathway stimulation on glioblastoma cell proliferation and migration induced by Fas pathway activation

SARRAZY Vincent, BILLET Fabrice, BORDEAU Nelly, JAUBERTEAU Marie-Odile,
DESMOULIERE Alexis

Université de Limoges, Faculté de Médecine et de Pharmacie, EA 3842, Institut
Fédératif de Recherche 145, Limoges, F-87025 France

Corresponding author : Dr. Alexis Desmoulière Department of Physiology, Faculty of
Pharmacy, University of Limoges, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges cedex,
France phone number : +33 555 43 58 73 fax number : +33 555 43 59 50 e-mail address :
alexis.desmouliere@unilim.fr

Abstract

Glioblastomas are the most frequent primary brain tumours in adult, and effective surgical or therapeutical strategies are not available leading to a very poor diagnosis. The Fas (CD95/APO-1) pathway is already described as an activator of the glioblastoma proliferation increasing the pathogenicity of this tumor. The lipopolysaccharide (LPS) pathway depending on Toll-like receptor 4 (TLR4) is currently the aim of various studies to limit the glioblastoma spreading, but the mechanisms involved are not completely known. In this work, the effects of Fas and TLR4 pathway activations were studied. The glioblastoma cell lines U87-MG (ATCC n° HTB-14) and U118-MG (ATCC n° HTB-15) were used. The Fas and the TLR4 pathways were activated by an agonist antibody (clone 7C11) or by different LPS concentrations respectively. Activation of the Fas pathway or of the TLR4 pathway induced cell proliferation. However, cell treatment by both agonist antibody and LPS decreased proliferation. Anti-proliferative effect of the simultaneous activation of Fas and TLR4 pathways was caspase dependent. Moreover, in the same conditions, we observed a decrease of the cell migration and of the matrix metalloproteinase (MMP)-9 expression. These data suggest that LPS which activates TLR4 pathway inhibits the proliferation observed in glioblastoma cell lines after activation of the Fas pathway. This work allows us to define new interactions between different pathways involved in glioblastoma invasion and pathogenicity, leading to new potential therapeutical approaches.

Key words : glioblastoma, Fas, TLR4/CD14, LPS, caspase, MMP, migration

Troisième partie

Conclusions

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des cellules impliquées dans la réparation tissulaire, notamment dans la fibrose hépatique et dans la formation de la cicatrice gliale dans le SNC. Dans ces deux organes, les types cellulaires impliqués dans les processus de réparation et dans le dépôt de MEC sont différents. Dans la fibrose hépatique, différentes sous-populations de fibroblastes peuvent acquérir un phénotype myofibroblastique et sécréter activement différentes protéines de la MEC. Dans le SNC, bien que les fibroblastes puissent être impliqués si la lésion est importante avec une rupture des méninges, ce sont les astrocytes qui jouent un rôle majeur dans les processus de cicatrisation.

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié, dans un modèle de tranches de foie en culture, les cellules fibrogéniques impliquées suivant le type de lésion hépatique. Dans des lésions de type cirrhose alcoolique, les CEF qui peuvent acquérir un phénotype myofibroblastique jouent un rôle majeur. Dans les cholestases hépatiques, ce sont principalement les fibroblastes portaux qui sont impliqués. Le marqueur principal de l'activation de ces cellules qui acquièrent donc un phénotype myofibroblastique, est l'actine α -ML. Le modèle de tranches de foie en culture est un modèle *ex vivo* très intéressant, car il permet de conserver l'organisation du tissu et donc, les interactions cellule-cellule et cellule-MEC. Dans ce travail, nous avons montré que, durant le remodelage du foie dans les tranches en culture, le comportement des cellules myofibroblastiques impliquées dans les différentes conditions pathologiques sera différent selon qu'elles dérivent des CEF ou des fibroblastes portaux. En effet, les CEF peuvent perdre l'expression de l'actine α -ML et réacquérir un phénotype plus quiescent alors que les fibroblastes portaux disparaissent par apoptose. Ce modèle nous a permis de suggérer l'importance du stress mécanique sur les fibroblastes portaux en corrélant les informations obtenues lors d'une décompression biliaire chirurgicale et lors d'une décompression biliaire « artificielle » obtenue lors de la mise en culture des tranches de foie : cette décompression provoque une modification des tensions dans le microenvironnement cellulaire, induisant l'apoptose dans les fibroblastes portaux et donc, une disparition du marquage pour l'actine α -ML. Récemment, une étude protéomique comparant ces deux populations fibrogéniques met encore davantage en évidence les différences entre ces deux populations de cellules fibrogéniques hépatiques en proposant de nouveaux marqueurs originaux et en soulignant le rôle bien sûr majeur des myofibroblastes dans la cicatrisation hépatique [Bosselut *et al.*, 2010]. En ce qui concerne notre travail, une analyse sur de plus nombreuses situations pathologiques présentant différents aspects histologiques, notamment, par exemple, des cirrhoses micronodulaires *versus* des cirrhoses macronodulaires, serait très importante pour conforter ces observations et obtenir de nouvelles informations.

Dans une autre partie de ce travail, nous nous sommes intéressés aux cholangiocarcinomes et plus particulièrement, aux fibroblastes impliqués dans la réaction stromale. Dans le foie, les cellules fibrogéniques à l'origine de la réaction stromale n'ont pas été clairement identifiées. La réaction stromale des carcinomes hépatocellulaires est généralement modeste. Au contraire, le cholangiocarcinome se caractérise par une fibrose intra-tumorale et péri-tumorale considérable suggérant un phénotype particulier des fibroblastes impliqués. De part leur localisation autour des ductules portes, il est fort probable que les fibroblastes portaux soient responsables de cette intense réaction stromale observée dans les cholangiocarcinomes. Nous avons pratiqué une étude protéomique pour comparer les protéines exprimées dans le foie non-tumoral avec les protéines exprimées dans la tumeur, et plus particulièrement, avec les protéines exprimées dans la partie stromale de la tumeur. La majorité des protéines sur-exprimées dans les cholangiocarcinomes sont des protéines impliquées dans le cytosquelette, le métabolisme et l'apoptose ou la survie cellulaire. Les protéines sous-exprimées sont quant à elles, majoritairement impliquées dans le métabolisme. Certaines de ces protéines ont déjà été montrées comme étant différentiel-

lement exprimées dans d'autres modèles expérimentaux ou dans d'autres tumeurs comme les cancers du colon ou du pancréas. Parmi ces protéines, l'actine α -ML est bien sûr très exprimée dans le stroma de la tumeur qui contient les myofibroblastes, et n'est quasiment pas exprimée dans le foie normal. De plus, nous avons montré que deux protéines, la protéine 14-3-3 et la périostine, sont particulièrement exprimées dans les cholangiocarcinomes. La protéine 14-3-3 est fortement exprimée dans les cellules tumorales : elle joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire et la suppression de l'apoptose et son expression pourrait constituer un nouvel indicateur pour évaluer l'évolution du cancer. De plus, la protéine 14-3-3 sigma peut être sécrétée via des exosomes et induire l'expression des MMP-1 et MMP-3 qui vont favoriser la migration cellulaire et augmenter le pouvoir invasif de la tumeur. La périostine est exprimée de façon très importante par les myofibroblastes du stroma. Des études récentes ont montré que la périostine pouvait induire la migration cellulaire ainsi que la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules cancéreuses pancréatiques ; tout comme la protéine 14-3-3, elle pourrait être utilisée comme un marqueur de la malignité d'un cancer.

La troisième partie de ce travail constitue la mise en place de modèles *in vitro* et *in vivo* de lésion du SNC dans le but de pouvoir étudier les processus impliqués dans la réparation du SNC. Le modèle *in vitro* est basé de façon très simple, sur l'activation des astrocytes par du LPS qui va mimer les effets d'une lésion et activer ainsi les astrocytes. Nous avons montré que l'activation de la voie pro-apoptotique Fas n'induit pas l'apoptose des astrocytes dans nos conditions de cultures. Au contraire, nous avons enregistré, lors de l'activation de la voie Fas, une augmentation de la prolifération astrocytaire. Cette prolifération est du même ordre que la prolifération induite lors de l'activation des astrocytes par du LPS. Bien sûr, l'activation des astrocytes lors d'une lésion du SNC, dépend de très nombreux facteurs et les voies de signalisation semblent très profondément imbriquées. De plus, nous avons identifié parmi la population astrocytaire du cortex, deux populations différentes morphologiquement et par les marqueurs qu'elles expriment : une population exclusivement GFAP positive et une population qui exprime à la fois la GFAP et l'actine α -ML, le marqueur de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Le pouvoir migratoire de cette population qui exprime l'actine α -ML dans les fibres de stress semble réduit. Grâce à une technique de tri originale, nous avons donc démontré que les astrocytes « normaux » développaient l'expression de l'actine α -ML *in vitro* ; ainsi, contrairement à ce qui est couramment admis, le phénotype des cellules impliquées dans la réparation du SNC serait finalement semblable au moins en partie au phénotype des cellules rencontrées lors de la réparation des autres organes et dans la réaction stromale aux tumeurs. Ce résultat constitue une observation tout à fait originale.

Le modèle *in vivo* est basé sur la contusion contrôlée du cortex cérébral chez le rat et la mise en place de tests comportementaux (test de marche sur la poutre et test de la piscine de Morris), afin de vérifier les déficits moteurs et cognitifs et afin d'étudier les effets de différents traitements neuroprotecteurs. Les observations macroscopiques et microscopiques indiquent que les rats ayant subi une contusion avec une profondeur d'impact de 4 mm présentent des dommages beaucoup plus importants que les animaux soumis à un impact de 3 mm de profondeur à une vitesse de contusion identique validant ainsi la pertinence du modèle. Les effets sur les capacités sensori-motrices des rats sont bien visibles quelque soit la profondeur de la lésion. Ces effets semblent cependant similaires quelque soit la profondeur de la lésion. Le premier traitement étudié a été l'inhibition du TGF- β 1 grâce à l'utilisation d'un oligonucléotide antisense. Dans les processus de réparation tissulaire, le TGF- β 1 favorise le dépôt des protéines de la MEC en inhibant la production des MMPs et surtout, en augmentant l'expression de certains inhibiteurs de protéases comme les TIMPs. Il induit par ailleurs l'activation des astrocytes favorisant, par conséquent, la formation de la cicatrice gliale. Il semble également jouer un rôle dans les processus inflammatoires en activant les cellules de la microglie. Enfin, il

participe à la neuroprotection en inhibant notamment, les phénomènes d'excitotoxicité. L'utilisation de l'oligonucléotide antisense améliore globalement les capacités sensorimotrices des animaux. Cependant, ces observations préliminaires doivent être confirmées et les mécanismes impliqués doivent être clairement déterminés. L'évaluation des performances cognitives en utilisant le test de la piscine de Morris n'est pas, pour l'instant, satisfaisant ; des améliorations techniques doivent être apportées pour rendre ce test plus discriminant.

Le dernier volet de ce travail est fondé sur l'étude des interactions entre la voie Fas et la voie du TLR4 dans deux lignées de glioblastomes en culture. Chez l'adulte, ce sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes et c'est la deuxième cause de mortalité par cancer chez l'enfant après la leucémie et la 3^{ème} chez l'adulte. Nous avons montré que l'activation de la voie Fas induit la prolifération des glioblastomes, et le traitement avec du LPS est capable d'inhiber cette prolifération induite par l'activation de la voie Fas. L'apoptose reste constante quelque soit le traitement, et l'utilisation d'un inhibiteur pancaspases annule les effets de cette activation de Fas, soulignant le rôle de ces protéases dans ces mécanismes. Des tests de plaie *in vitro* montrent que l'activation de la voie Fas augmente le pouvoir migratoire des cellules de glioblastome et que le traitement avec du LPS inhibe cette capacité. Parallèlement, on observe une augmentation de la MMP-9 après activation de la voie Fas et une diminution de son expression si un traitement avec du LPS est également réalisé. Il a déjà été décrit dans d'autres tumeurs une augmentation de la MMP-9 qui favorise la migration et les métastases, avec une corrélation forte *in vivo* entre l'expression de la MMP-9 et un pouvoir très invasif des glioblastomes. Nos résultats avec le LPS montrent qu'une activation des voies impliquant le récepteur TLR4 pourrait constituer une piste séduisante pour envisager de nouvelles solutions thérapeutiques.

Dans ce travail, nous avons montré des similitudes entre la réparation d'un organe comme le foie, la formation de la réaction stromale accompagnant le développement d'une tumeur, et la réparation du SNC. Bien que les cellules fibrogéniques impliquées soient différentes suivant les situations, CEF, fibroblastes portaux, astrocytes, il semble finalement que la différenciation myofibroblastique constitue un mécanisme commun retrouvé quelque soit l'organe. Concernant le SNC, nos observations très originales concernant une sous-population d'astrocytes capable d'exprimer l'actine α -ML doivent être confirmées. Les recherches actuellement menées pour trouver des voies capables d'interférer avec la différenciation myofibroblastique qui, bien que nécessaire dans les processus de réparation physiologique, devient délétère dans les situations pathologiques, pourraient donc concerner non seulement les fibroses d'organes et les tumeurs, mais également les lésions du SNC qui très souvent entraînent des déficits moteurs ou cognitifs majeurs suite au caractère irréversible de la cicatrice gliale.

Bibliographie

- [Acosta-Rodríguez *et al.*, 2007] ACOSTA-RODRÍGUEZ, E. V., CRAXTON, A., HENDRICKS, D. W., MERINO, M. C., MONTES, C. L., CLARK, E. A. et GRUPPI, A. (2007). Baff and lps cooperate to induce b cells to become susceptible to cd95/fas-mediated cell death. *Eur J Immunol*, 37(4):990–1000.
- [Arai *et al.*, 1997] ARAI, H., GORDON, D., NABEL, E. G. et NABEL, G. J. (1997). Gene transfer of fas ligand induces tumor regression in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(25):13862–13867.
- [Arcadi *et al.*, 1998] ARCADI, F. A., COSTA, C., IMPERATORE, C., MARCHESE, A., RAPISARDA, A., SALEMI, M., TRIMARCHI, G. R. et COSTA, G. (1998). Oral toxicity of bis(2-ethylhexyl) phthalate during pregnancy and suckling in the long-evans rat. *Food Chem Toxicol*, 36(11):963–970.
- [Ashkenazi et Dixit, 1998] ASHKENAZI, A. et DIXIT, V. M. (1998). Death receptors : signaling and modulation. *Science*, 281(5381):1305–1308.
- [Bao *et al.*, 2004] BAO, S., OUYANG, G., BAI, X., HUANG, Z., MA, C., LIU, M., SHAO, R., ANDERSON, R. M., RICH, J. N. et WANG, X.-F. (2004). Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the akt/pkb pathway. *Cancer Cell*, 5(4):329–339.
- [Barca *et al.*, 2010] BARCA, O., CARNEIRO, C., COSTOYA, J. A., SEÑARÍS, R. M. et ARCE, V. M. (2010). Resistance of neonatal primary astrocytes against fas-induced apoptosis depends on silencing of caspase 8. *Neurosci Lett*, 479(3):206–210.
- [Barton et Medzhitov, 2003] BARTON, G. M. et MEDZHITOV, R. (2003). Toll-like receptor signaling pathways. *Science*, 300(5625):1524–1525.
- [Bellail *et al.*, 2009] BELLAIL, A. C., TSE, M. C. L., SONG, J. H., PHUPHANICH, S., OLSON, J. J., SUN, S. Y. et HAO, C. (2009). Dr5-mediated disc controls caspase-8 cleavage and initiation of apoptosis in human glioblastomas. *J Cell Mol Med*, 14:1303–1317.
- [Bendrik *et al.*, 2008] BENDRIK, C., ROBERTSON, J., GAULDIE, J. et DABROSIN, C. (2008). Gene transfer of matrix metalloproteinase-9 induces tumor regression of breast cancer in vivo. *Cancer Res*, 68(9):3405–3412.
- [Bergers *et al.*, 2000] BERGERS, G., BREKKEN, R., MCMAHON, G., VU, T. H., ITOH, T., TAMAKI, K., TANZAWA, K., THORPE, P., ITOHARA, S., WERB, Z. et HANAHAN, D. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*, 2(10):737–744.
- [Bertrand *et al.*, 2009] BERTRAND, J., BEGAUD-GRIMAUD, G., BESSETTE, B., VERDIER, M., BATTU, S. et JAUBERTEAU, M.-O. (2009). Cancer stem cells from human glioma cell line are resistant to fas-induced apoptosis. *Int J Oncol*, 34(3):717–727.
- [Bilgen, 2005] BILGEN, M. (2005). A new device for experimental modeling of central nervous system injuries. *Neurorehabil Neural Repair*, 19(3):219–226.

- [Bonney *et al.*, 2008] BONNEY, G. K., CRAVEN, R. A., PRASAD, R., MELCHER, A. F., SELBY, P. J. et BANKS, R. E. (2008). Circulating markers of biliary malignancy : opportunities in proteomics? *Lancet Oncol*, 9(2):149–158.
- [Bosselut *et al.*, 2010] BOSSELUT, N., HOUSSET, C., MARCELO, P., REY, C., BURMESTER, T., VINH, J., VAUBOURDOLLE, M., CADORET, A. et BAUDIN, B. (2010). Distinct proteomic features of two fibrogenic liver cell populations : hepatic stellate cells and portal myofibroblasts. *Proteomics*, 10(5):1017–1028.
- [Böttner *et al.*, 2000] BÖTTNER, M., KRIEGLSTEIN, K. et UNSICKER, K. (2000). The transforming growth factor-betas : structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem*, 75(6):2227–2240.
- [Bowman *et al.*, 2003] BOWMAN, C. C., RASLEY, A., TRANGUCH, S. L. et MARRIOTT, I. (2003). Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia*, 43(3):281–291.
- [Brandes *et al.*, 2008] BRANDES, A. A., TOSONI, A., FRANCESCHI, E., RENI, M., GATTA, G. et VECHT, C. (2008). Glioblastoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol*, 67(2):139–152.
- [Brionne *et al.*, 2003] BRIONNE, T., TESSEUR, I., MASLIAH, E. et WYSS-CORAY, T. (2003). Loss of tgf-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. *Neuron*, 40(6):1133–1145.
- [Bsibsi *et al.*, 2002] BSIBSI, M., RAVID, R., GVERIC, D. et van NOORT, J. M. (2002). Broad expression of toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuro-pathol Exp Neurol*, 61(11):1013–1021.
- [Bueno-Nava *et al.*, 2008] BUENO-NAVA, A., MONTES, S., DELAGARZA-MONTANO, P., ALFARO-RODRIGUEZ, A., ORTIZ, A. et GONZALEZ-PINA, R. (2008). Reversal of noradrenergic depletion and lipid peroxidation in the pons after brain injury correlates with motor function recovery in rats. *Neurosci Lett*, 443(1):32–36.
- [Buisson *et al.*, 1998] BUISSON, A., NICOLE, O., DOCAGNE, F., SARTELET, H., MACKENZIE, E. et VIVIEN, D. (1998). Up-regulation of a serine protease inhibitor in astrocytes mediates the neuroprotective activity of transforming growth factor beta1. *FASEB J*, 12(15):1683–1691.
- [Carpenter *et al.*, 2009] CARPENTER, S., CARLSON, T., DELLACASAGRANDE, J., GARCIA, A., GIBBONS, S., HERTZOG, P., LYONS, A., LIN, L.-L., LYNCH, M., MONIE, T., MURPHY, C., SEIDL, K. J., WELLS, C., DUNNE, A. et O'NEILL, L. A. J. (2009). Tril, a functional component of the tlr4 signaling complex, highly expressed in brain. *J Immunol*, 183(6):3989–3995.
- [Carpentier *et al.*, 2005] CARPENTIER, P. A., BEGOLKA, W. S., OLSON, J. K., ELHOFY, A., KARPUS, W. J. et MILLER, S. D. (2005). Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia*, 49(3):360–374.
- [Cassiman *et al.*, 2006] CASSIMAN, D., BARLOW, A., BORGHT, S. V., LIBBRECHT, L. et PACHNIS, V. (2006). Hepatic stellate cells do not derive from the neural crest. *J Hepatol*, 44(6):1098–1104.
- [Chang *et al.*, 2002] CHANG, D. W., XING, Z., PAN, Y., ALGECIRAS-SCHIMNICH, A., BARNHART, B. C., YAISH-OHAD, S., PETER, M. E. et YANG, X. (2002). c-flip(1) is a dual function regulator for caspase-8 activation and cd95-mediated apoptosis. *EMBO J*, 21(14):3704–3714.
- [Chang *et al.*, 2008] CHANG, T.-W., CHEN, C.-C., CHEN, K.-Y., SU, J.-H., CHANG, J.-H. et CHANG, M.-C. (2008). Ribosomal phosphoprotein p0 interacts with gcip and overexpression of p0 is associated with cellular proliferation in breast and liver carcinoma cells. *Oncogene*, 27(3):332–338.

- [Chao *et al.*, 2005] CHAO, W., SHEN, Y., ZHU, X., ZHAO, H., NOVIKOV, M., SCHMIDT, U. et ROSENZWEIG, A. (2005). Lipopolysaccharide improves cardiomyocyte survival and function after serum deprivation. *J Biol Chem*, 280(23):21997–22005.
- [Chavez-Muñoz *et al.*, 2008] CHAVEZ-MUÑOZ, C., MORSE, J., KILANI, R. et GHAHARY, A. (2008). Primary human keratinocytes externalize stratifin protein via exosomes. *J Cell Biochem*, 104(6):2165–2173.
- [Chen *et al.*, 2008] CHEN, S.-F., HSU, C.-W., HUANG, W.-H. et WANG, J.-Y. (2008). Post-injury baicalein improves histological and functional outcomes and reduces inflammatory cytokines after experimental traumatic brain injury. *Br J Pharmacol*, 155(8):1279–1296.
- [Chen *et al.*, 2007] CHEN, S.-F., HUNG, T.-H., CHEN, C.-C., LIN, K.-H., HUANG, Y.-N., TSAI, H.-C. et WANG, J.-Y. (2007). Lovastatin improves histological and functional outcomes and reduces inflammation after experimental traumatic brain injury. *Life Sci*, 81(4):288–298.
- [Chicoine *et al.*, 2007] CHICOINE, M. R., ZAHNER, M., WON, E. K., KALRA, R. R., KITAMURA, T., PERRY, A. et HIGASHIKUBO, R. (2007). The in vivo antitumoral effects of lipopolysaccharide against glioblastoma multiforme are mediated in part by toll-like receptor 4. *Neurosurgery*, 60(2):372–380.
- [Clouzeau-Girard *et al.*, 2006] CLOUZEAU-GIRARD, H., GUYOT, C., COMBE, C., MORONVALLE-HALLEY, V., HOUSSET, C., LAMIREAU, T., ROSENBAUM, J. et DESMOULIÈRE, A. (2006). Effects of bile acids on biliary epithelial cell proliferation and portal fibroblast activation using rat liver slices. *Lab Invest*, 86(3):275–285.
- [Cohen, 2002] COHEN, J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420(6917):885–891.
- [Costa *et al.*, 2003] COSTA, A. M. A., TUCHWEBER, B., LAMIREAU, T., YOUSEF, I. M., BALABAUD, C., ROSENBAUM, J. et DESMOULIÈRE, A. (2003). Role of apoptosis in the remodeling of cholestatic liver injury following release of the mechanical stress. *Virchows Arch*, 442(4):372–380.
- [Couvelard *et al.*, 1993] COUVELARD, A., SCOAZEC, J. Y. et FELDMANN, G. (1993). Expression of cell-cell and cell-matrix adhesion proteins by sinusoidal endothelial cells in the normal and cirrhotic human liver. *Am J Pathol*, 143(3):738–752.
- [Darby *et al.*, 2010] DARBY, I., VUILLIER-DEVILLERS, K., PINAULT, E., SARRAZY, V., LEPREUX, S., BALABAUD, C., BIOULAC-SAGE, P. et DESMOULIÈRE, A. (2010). Proteomic analysis of differentially expressed proteins in peripheral cholangiocarcinoma. *Cancer Microenviron*, Online FirstTM:25 June 2010.
- [de Bovenkamp *et al.*, 2007] de BOVENKAMP, M. V., GROOTHUIS, G. M. M., MEIJER, D. K. F. et OLINGA, P. (2007). Liver fibrosis in vitro : cell culture models and precision-cut liver slices. *Toxicol In Vitro*, 21(4):545–557.
- [de Caestecker *et al.*, 2000] de CAESTECKER, M., PIEK, E. et ROBERTS, A. (2000). Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst*, 92(17):1388–1402.
- [Desmoulière *et al.*, 2003] DESMOULIÈRE, A., DARBY, I. et GABBIANI, G. (2003). Normal and pathologic soft tissue remodeling : role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest*, 83(12):1689–1707.
- [Docagne *et al.*, 2003] DOCAGNE, F., ALI, C., LESNE, S., NICOLE, O., MACKENZIE, E., BUISSON, A. et VIVIEN, D. (2003). Does transforming growth factor-beta (tgf-beta) act as a neuroprotective agent in cerebral ischemia? *J Soc Biol*, 197(2):145–150.
- [Dudas *et al.*, 2009] DUDAS, J., MANSUROGLU, T., BATUSIC, D. et RAMADORI, G. (2009). Thy-1 is expressed in myofibroblasts but not found in hepatic stellate cells following liver injury. *Histochem Cell Biol*, 131(1):115–127.

- [Ethell *et al.*, 2002] ETHELL, D. W., KINLOCH, R. et GREEN, D. R. (2002). Metalloproteinase shedding of fas ligand regulates beta-amyloid neurotoxicity. *Curr Biol*, 12(18):1595–1600.
- [Faden, 2002] FADEN, A. (2002). Neuroprotection and traumatic brain injury : theoretical option or realistic proposition. *Curr Opin Neurol*, 15(6):707–712.
- [Falsig *et al.*, 2004] FALSIG, J., LATTA, M. et LEIST, M. (2004). Defined inflammatory states in astrocyte cultures : correlation with susceptibility towards cd95-driven apoptosis. *J Neurochem*, 88(1):181–193.
- [Fan *et al.*, 2007] FAN, T., LI, R., TODD, N. W., QIU, Q., FANG, H.-B., WANG, H., SHEN, J., ZHAO, R. Y., CARAWAY, N. P., KATZ, R. L., STASS, S. A. et JIANG, F. (2007). Up-regulation of 14-3-3zeta in lung cancer and its implication as prognostic and therapeutic target. *Cancer Res*, 67(16):7901–7906.
- [Fauchais *et al.*, 2008] FAUCHAIS, A.-L., LALLOUÉ, F., LISE, M.-C., BOUMEDIENE, A., PREUD'HOMME, J.-L., VIDAL, E. et JAUBERTEAU, M.-O. (2008). Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in b cell survival. *J Immunol*, 181(5):3027–3038.
- [Fella *et al.*, 2005] FELLA, K., GLÜCKMANN, M., HELLMANN, J., KARAS, M., KRAMER, P.-J. et KRÖGER, M. (2005). Use of two-dimensional gel electrophoresis in predictive toxicology : identification of potential early protein biomarkers in chemically induced hepatocarcinogenesis. *Proteomics*, 5(7):1914–1927.
- [Fingleton, 2006] FINGLETON, B. (2006). Matrix metalloproteinases : roles in cancer and metastasis. *Front Biosci*, 11:479–491.
- [Flanders *et al.*, 1998] FLANDERS, K., REN, R. et LIPPA, C. (1998). Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol*, 54(1):71–85.
- [Folgueras *et al.*, 2004] FOLGUERAS, A. R., PENDÁS, A. M., SÁNCHEZ, L. M. et LÓPEZ-OTÍN, C. (2004). Matrix metalloproteinases in cancer : from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol*, 48(5-6):411–424.
- [Friedman et Bansal, 2006] FRIEDMAN, S. L. et BANSAL, M. B. (2006). Reversal of hepatic fibrosis – fact or fantasy? *Hepatology*, 43(2 Suppl 1):82–88.
- [Galko et Tessier-Lavigne, 2000] GALKO, M. et TESSIER-LAVIGNE, M. (2000). Function of an axonal chemoattractant modulated by metalloprotease activity. *Science*, 289(5483):1365–1367.
- [Gaur *et al.*, 2009] GAUR, V., AGGARWAL, A. et KUMAR, A. (2009). Protective effect of naringin against ischemic reperfusion cerebral injury : possible neurobehavioral, biochemical and cellular alterations in rat brain. *Eur J Pharmacol*, 616(1-3):147–154.
- [Geerts, 2004] GEERTS, A. (2004). On the origin of stellate cells : mesodermal, endodermal or neuro-ectodermal? *J Hepatol*, 40(2):331–334.
- [Ghajar, 2000] GHAJAR, J. (2000). Traumatic brain injury. *Lancet*, 356(9233):923–929.
- [Giraud *et al.*, 2007] GIRAUD, S., BESSETTE, B., BODA, C., LALLOUÉ, F., PETIT, D., MATHONNET, M. et JAUBERTEAU, M.-O. (2007). In vitro apoptotic induction of human glioblastoma cells by fas ligand plus etoposide and in vivo antitumour activity of combined drugs in xenografted nude rats. *Int J Oncol*, 30(1):273–281.
- [Gornicka-Pawlak *et al.*, 2009] GORNICKA-PAWLAK, E., JABŁOŃSKA, A., CHYLIŃSKI, A. et DOMAŃSKA-JANIK, K. (2009). Housing conditions influence motor functions and exploratory behavior following focal damage of the rat brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 69(1):62–72.
- [Grauer *et al.*, 2008] GRAUER, O. M., MOLLING, J. W., BENNING, E., TOONEN, L. W. J., SUTMULLER, R. P. M., NIERKENS, S. et ADEMA, G. J. (2008). Tlr ligands in the local treatment of established intracerebral murine gliomas. *J Immunol*, 181(10):6720–6729.

- [Guyot *et al.*, 2007a] GUYOT, C., COMBE, C., BALABAUD, C., BIOULAC-SAGE, P. et DESMOULIÈRE, A. (2007a). Fibrogenic cell fate during fibrotic tissue remodelling observed in rat and human cultured liver slices. *J Hepatol*, 46(1):142–150.
- [Guyot *et al.*, 2006] GUYOT, C., LEPREUX, S., COMBE, C., DOUDNIKOFF, E., BIOULAC-SAGE, P., BALABAUD, C. et DESMOULIÈRE, A. (2006). Hepatic fibrosis and cirrhosis : the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(2):135–151.
- [Guyot *et al.*, 2010] GUYOT, C., LEPREUX, S., COMBE, C., SARRAZY, V., BILLET, F., BALABAUD, C., BIOULAC-SAGE, P. et DESMOULIÈRE, A. (2010). Fibrogenic cell phenotype modifications during remodelling of normal and pathological human liver in cultured slices. *Liver Int*, 30(10):1529–1540.
- [Guyot *et al.*, 2007b] GUYOT, C., LEPREUX, S., DARBY, I. A. et DESMOULIÈRE, A. (2007b). The biology of tumor stroma. *The cancer handbook, 2nd edn*, 1:155–167.
- [Hagens *et al.*, 2006] HAGENS, W. I., OLINGA, P., MEIJER, D. K. F., GROOTHUIS, G. M. M., BELJAARS, L. et POELSTRA, K. (2006). Gliotoxin non-selectively induces apoptosis in fibrotic and normal livers. *Liver Int*, 26(2):232–239.
- [Hammel *et al.*, 2001] HAMMEL, P., COUVELARD, A., O'TOOLE, D., RATOUIS, A., SAUVANET, A., FLÉJOU, J. F., DEGOTT, C., BELGHITI, J., BERNADES, P., VALLA, D., RUSZNIEWSKI, P. et LÉVY, P. (2001). Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N Engl J Med*, 344(6):418–423.
- [Hidalgo et Eckhardt, 2001] HIDALGO, M. et ECKHARDT, S. G. (2001). Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*, 93(3):178–193.
- [Hinz, 2010] HINZ, B. (2010). The myofibroblast : paradigm for a mechanically active cell. *J biomech*, 43(1):146–155.
- [Hoane *et al.*, 2006] HOANE, M. R., KAPLAN, S. A. et ELLIS, A. L. (2006). The effects of nicotinamide on apoptosis and blood-brain barrier breakdown following traumatic brain injury. *Brain Res*, 1125(1):185–193.
- [Houston et O'Connell, 2004] HOUSTON, A. et O'CONNELL, J. (2004). The fas signalling pathway and its role in the pathogenesis of cancer. *Curr Opin Pharmacol*, 4(4):321–326.
- [Huang *et al.*, 2005] HUANG, B., ZHAO, J., LI, H., HE, K.-L., CHEN, Y., CHEN, S.-H., MAYER, L., UNKELESS, J. C. et XIONG, H. (2005). Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res*, 65(12):5009–5014.
- [Ioannou *et al.*, 2007] IOANNOU, G. N., WEISS, N. S. et KOWDLEY, K. V. (2007). Relationship between transferrin-iron saturation, alcohol consumption, and the incidence of cirrhosis and liver cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 5(5):624–629.
- [Jain, 2008] JAIN, K. (2008). Neuroprotection in traumatic brain injury. *Drug Discov Today*, 13(23-24):1082–1089.
- [Javelaud et Mauviel, 2004] JAVELAUD, D. et MAUVIEL, A. (2004). [transforming growth factor-betas : smad signaling and roles in physiopathology]. *Pathol Biol (Paris)*, 52(1): 50–54.
- [Kaewpitoon *et al.*, 2008] KAEWPITON, N., KAEWPITON, S.-J., PENGSA, P. et SRIPA, B. (2008). *Opisthorchis viverrini* : the carcinogenic human liver fluke. *World J Gastroenterol*, 14(5):666–674.
- [Kanno *et al.*, 2008] KANNO, A., SATOH, K., MASAMUNE, A., HIROTA, M., KIMURA, K., UMINO, J., HAMADA, S., SATOH, A., EGAWA, S., MOTOI, F., UNNO, M. et SHIMOSEGAWA, T. (2008). Periostin, secreted from stromal cells, has biphasic effect on

- cell migration and correlates with the epithelial to mesenchymal transition of human pancreatic cancer cells. *Int J Cancer*, 122(12):2707–2718.
- [Kataoka *et al.*, 2000] KATAOKA, T., BUDD, R. C., HOLLER, N., THOME, M., MARTINON, F., IRMLER, M., BURNS, K., HAHNE, M., KENNEDY, N., KOVACSOVICS, M. et TSCHOPP, J. (2000). The caspase-8 inhibitor flip promotes activation of nf-kappab and erk signaling pathways. *Curr Biol*, 10(11):640–648.
- [Khan *et al.*, 2009] KHAN, M., IM, Y.-B., SHUNMUGAVEL, A., GILG, A. G., DHINDSA, R. K., SINGH, A. K. et SINGH, I. (2009). Administration of s-nitrosoglutathione after traumatic brain injury protects the neurovascular unit and reduces secondary injury in a rat model of controlled cortical impact. *J Neuroinflammation*, 6:32.
- [Kim *et al.*, 2006] KIM, H., KANG, H. J., YOU, K. T., KIM, S. H., LEE, K. Y., KIM, T. I., KIM, C., SONG, S. Y., KIM, H.-J., LEE, C. et KIM, H. (2006). Suppression of human selenium-binding protein 1 is a late event in colorectal carcinogenesis and is associated with poor survival. *Proteomics*, 6(11):3466–3476.
- [Kline *et al.*, 2000] KLINE, A., YAN, H., BAO, J., MARION, D. et DIXON, C. (2000). Chronic methylphenidate treatment enhances water maze performance following traumatic brain injury in rats. *Neurosci Lett*, 280(3):163–166.
- [Komatsu *et al.*, 2004] KOMATSU, K., NAKANISHI, Y., NEMOTO, N., HORI, T., SAWADA, T. et KOBAYASHI, M. (2004). Expression and quantitative analysis of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas. *Brain Tumor Pathol*, 21(3):105–112.
- [Korenova *et al.*, 2009] KORENOVA, M., ZILKA, N., STOZICKA, Z., BUGOS, O., VANICKY, I. et NOVAK, M. (2009). Neuroscale, the battery of behavioral tests with novel scoring system for phenotyping of transgenic rat model of tauopathy. *J Neurosci Methods*, 177(1):108–114.
- [Krieglstein *et al.*, 2002] KRIEGLSTEIN, K., STRELAU, J., SCHOBER, A., SULLIVAN, A. et UNSICKER, K. (2002). Tgf-beta and the regulation of neuron survival and death. *J Physiol Paris*, 96(1-2):25–30.
- [Krumdieck *et al.*, 1980] KRUMDIECK, C. L., dos SANTOS, J. E. et HO, K. J. (1980). A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Anal Biochem*, 104(1):118–123.
- [Lee *et al.*, 2000] LEE, S. J., ZHOU, T., CHOI, C., WANG, Z. et BENVENISTE, E. N. (2000). Differential regulation and function of fas expression on glial cells. *J Immunol*, 164(3):1277–1285.
- [Lehnardt *et al.*, 2002] LEHNARDT, S., LACHANCE, C., PATRIZI, S., LEFEBVRE, S., FOLLETT, P. L., JENSEN, F. E., ROSENBERG, P. A., VOLPE, J. J. et VARTANIAN, T. (2002). The toll-like receptor tlr4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the cns. *J Neurosci*, 22(7):2478–2486.
- [LeSage *et al.*, 2001] LESAGE, G., GLASER, S. et ALPINI, G. (2001). Regulation of cholangiocyte proliferation. *Liver*, 21(2):73–80.
- [Lesné *et al.*, 2002] LESNÉ, S., BLANCHET, S., DOCAGNE, F., LIOT, G., PLAWINSKI, L., MACKENZIE, E., AUFRAY, C., BUISSON, A., PIÉTU, G. et VIVIEN, D. (2002). Transforming growth factor-beta1-modulated cerebral gene expression. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22(9):1114–1123.
- [Loilome *et al.*, 2006] LOILOME, W., YONGVANIT, P., WONGKHAM, C., TEPSIRI, N., SRIPA, B., SITHITHAWORN, P., HANAI, S. et MIWA, M. (2006). Altered gene expression in opisthorchis viverrini-associated cholangiocarcinoma in hamster model. *Mol Carcinog*, 45(5):279–187.
- [Makarova *et al.*, 2003] MAKAROVA, A., MIKHAILENKO, I., BUGGE, T. H., LIST, K., LAWRENCE, D. A. et STRICKLAND, D. K. (2003). The low density lipoprotein receptor-

- related protein modulates protease activity in the brain by mediating the cellular internalization of both neuroserpin and neuroserpin-tissue-type plasminogen activator complexes. *J Biol Chem*, 278(50):50250–50258.
- [Mannello et Gazzanelli, 2001] MANNELLO, F. et GAZZANELLI, G. (2001). Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death : conundrums, controverses and potential implications. *Apoptosis*, 6(6):479–482.
- [Mannello et al., 2005] MANNELLO, F., TONTI, G. et PAPA, S. (2005). Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets*, 5(4):285–298.
- [Maquart et al., 2005] MAQUART, F. X., BELLON, G., PASCO, S. et MONBOISSE, J. C. (2005). Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie*, 87(3-4):353–360.
- [Marchetti, 2005] MARCHETTI, P. (2005). [apoptosis : basic knowledge and applications]. *Gynecol Obstet Fertil*, 33(9):632–641.
- [Masters et al., 2001] MASTERS, S. C., YANG, H., DATTA, S. R., GREENBERG, M. E. et FU, H. (2001). 14-3-3 inhibits bad-induced cell death through interaction with serine-136. *Mol Pharmacol*, 60(6):1325–1331.
- [McGraw et al., 2001] MCGRAW, J., HIEBERT, G. et STEEVES, J. (2001). Modulating astrogliosis after neurotrauma. *J Neurosci Res*, 63(2):109–115.
- [Mitsiades et al., 2001] MITSIADES, N., YU, W. H., POULAKI, V., TSOKOS, M. et STAMENKOVIC, I. (2001). Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res*, 61(2):577–581.
- [Mizuno et al., 2003] MIZUNO, T., ZHONG, X. et ROTHSTEIN, T. L. (2003). Fas-induced apoptosis in b cells. *Apoptosis*, 8(5):451–460.
- [Moon et Fawcett, 2001] MOON, L. et FAWCETT, J. (2001). Reduction in cns scar formation without concomitant increase in axon regeneration following treatment of adult rat brain with a combination of antibodies to tgfbeta1 and beta2. *Eur J Neurosci*, 14(10):1667–1677.
- [Moreels et al., 2008] MOREELS, M., VANDENABEELE, F., DUMONT, D., ROBBEN, J. et LAMBRICHTS, I. (2008). Alpha-smooth muscle actin (alpha-sma) and nestin expression in reactive astrocytes in multiple sclerosis lesions : potential regulatory role of transforming growth factor-beta 1 (tgf-beta1). *Neuropath Appl Neuro*, 34(5):532–546.
- [Moreira et al., 2007] MOREIRA, T., CEBERS, G., PICKERING, C., OSTENSON, C.-G., EFENDIC, S. et LILJEQUIST, S. (2007). Diabetic goto-kakizaki rats display pronounced hyperglycemia and longer-lasting cognitive impairments following ischemia induced by cortical compression. *Neuroscience*, 144(4):1169–1185.
- [Mosmann, 1983] MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2):55–63.
- [Nagase et al., 2006] NAGASE, H., VISSÉ, R. et MURPHY, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and timp. *Cardiovasc Res*, 69(3):562–573.
- [Nishiyama et al., 1990] NISHIYAMA, M., OZTURK, M., FROHLICH, M., MAFUNE, K., STEELE, G. et WANDS, J. R. (1990). Expression of human alpha-actinin in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 50(19):6291–6294.
- [Ogier et al., 2005] OGIER, C., CREIDY, R., BOUCRAUT, J., SOLOWAY, P. D., KHRESTCHATISKY, M. et RIVERA, S. (2005). Astrocyte reactivity to fas activation is attenuated in timp-1 deficient mice, an in vitro study. *BMC neuroscience*, 6:68.
- [Okamura et al., 2005] OKAMURA, N., YOSHIDA, M., SHIBUYA, A., SUGIURA, H., OKAYASU, I. et OHBU, M. (2005). Cellular and stromal characteristics in the scirrhous

- hepatocellular carcinoma : comparison with hepatocellular carcinomas and intrahepatic cholangiocarcinomas. *Pathol Int*, 55(11):724–731.
- [Palanichamy et Chakravarti, 2009] PALANICHAMY, K. et CHAKRAVARTI, A. (2009). Combining drugs and radiotherapy : from the bench to the bedside. *Curr Opin Neurol*, pages 625–632.
- [Paxinos et Watson, 2007] PAXINOS, G. et WATSON, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier.
- [Pekny et Nilsson, 2005] PEKNY, M. et NILSSON, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, 50(4):427–434.
- [Pinzani et al., 1996] PINZANI, M., MILANI, S., HERBST, H., DEFRANCO, R., GRAPONNE, C., GENTILINI, A., CALIGIURI, A., PELLEGRINI, G., NGO, D. V., ROMANELLI, R. G. et GENTILINI, P. (1996). Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis. *Am J Pathol*, 148(3):785–800.
- [Piot-Grosjean et al., 2001] PIOT-GROSJEAN, O., WAHL, F., GOBBO, O. et STUTZMANN, J. M. (2001). Assessment of sensorimotor and cognitive deficits induced by a moderate traumatic injury in the right parietal cortex of the rat. *Neurobiol Dis*, 8(6):1082–1093.
- [Pol et al., 2004] POL, S., CARNOT, F., NALPAS, B., LAGNEAU, J.-L., FONTAINE, H., SERPAGGI, J., SERFATY, L., BEDOSSA, P. et BRÉCHOT, C. (2004). Reversibility of hepatitis c virus-related cirrhosis. *Hum Pathol*, 35(1):107–112.
- [Pop et Salvesen, 2009] POP, C. et SALVESEN, G. S. (2009). Human caspases : activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem*, 284(33):21777–21781.
- [Powell et al., 1999] POWELL, W. C., FINGLETON, B., WILSON, C. L., BOOTHBY, M. et MATRISIAN, L. M. (1999). The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol*, 9(24):1441–1447.
- [Riffkin et al., 2001] RIFFKIN, C. D., GRAY, A. Z., HAWKINS, C. J., CHOW, C. W. et ASHLEY, D. M. (2001). Ex vivo pediatric brain tumors express fas (cd95) and fasl (cd95l) and are resistant to apoptosis induction. *Neuro-oncology*, 3(4):229–240.
- [Rosell et Lo, 2008] ROSELL, A. et LO, E. (2008). Multiphasic roles for matrix metalloproteinases after stroke. *Curr Opin Pharmacol*, 8(1):82–89.
- [Rots et al., 2006] ROTS, M. G., ELFERINK, M. G. L., GOMMANS, W. M., OOSTERHUIS, D., SCHALK, J. A. C., CURIEL, D. T., OLINGA, P., HAISMA, H. J. et GROOTHUIS, G. M. M. (2006). An ex vivo human model system to evaluate specificity of replicating and non-replicating gene therapy agents. *J Gene Med*, 8(1):35–41.
- [Rousseau et al., 2007] ROUSSEAU, B., MÉNARD, L., HAURIE, V., TARAS, D., BLANC, J.-F., MOREAU-GAUDRY, F., METZLER, P., HUGUES, M., BOYAULT, S., LEMIERRE, S., CANRON, X., COSTET, P., COLE, M., BALABAUD, C., BIOULAC-SAGE, P., ZUCMAN-ROSSI, J. et ROSENBAUM, J. (2007). Overexpression and role of the atpase and putative dna helicase ruvb-like 2 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 46(4):1108–1118.
- [Saile et al., 2002] SAILE, B., MATTHES, N., NEUBAUER, K., EISENBACH, C., EL-ARMOUCHE, H., DUDAS, J. et RAMADORI, G. (2002). Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells differ in cd95-mediated apoptosis and response to tnf-alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283(2):435–444.
- [Sarrazy et Desmoulière, 2010] SARRAZY, V. et DESMOULIÈRE, A. (2010). Double immunohistochemistry with horseradish peroxidase and alkaline phosphatase detection systems. *Methods Mol Biol*, 611:59–71.

- [Sasaki *et al.*, 2003] SASAKI, H., YU, C.-Y., DAI, M., TAM, C., LODA, M., AUCLAIR, D., CHEN, L. B. et ELIAS, A. (2003). Elevated serum periostin levels in patients with bone metastases from breast but not lung cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 77(3):245–252.
- [Scaffidi *et al.*, 1999] SCAFFIDI, C., SCHMITZ, I., ZHA, J., KORSMEYER, S. J., KRAMMER, P. H. et PETER, M. E. (1999). Differential modulation of apoptosis sensitivity in cd95 type i and type ii cells. *J Biol Chem*, 274(32):22532–22538.
- [Schildberg *et al.*, 2005] SCHILDBERG, F. A., SCHULZ, S., DOMBROWSKI, F. et MINOR, T. (2005). Cyclic amp alleviates endoplasmic stress and programmed cell death induced by lipopolysaccharides in human endothelial cells. *Cell Tissue Res*, 320(1):91–98.
- [Schumacher *et al.*, 2010] SCHUMACHER, B., MONDRY, J., THIEL, P., WEYAND, M. et OTTMANN, C. (2010). Structure of the p53 c-terminus bound to 14-3-3 : implications for stabilization of the p53 tetramer. *FEBS Lett*, 584(8):1443–1448.
- [Sherwin et Fern, 2005] SHERWIN, C. et FERN, R. (2005). Acute lipopolysaccharide-mediated injury in neonatal white matter glia : role of tnf-alpha, il-1beta, and calcium. *J Immunol*, 175(1):155–161.
- [Shinohara *et al.*, 2000] SHINOHARA, H., YAGITA, H., IKAWA, Y. et OYAIZU, N. (2000). Fas drives cell cycle progression in glioma cells via extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Res*, 60(6):1766–1772.
- [Shuda *et al.*, 2000] SHUDA, M., KONDOH, N., TANAKA, K., RYO, A., WAKATSUKI, T., HADA, A., GOSEKI, N., IGARI, T., HATSUSE, K., AIHARA, T., HORIUCHI, S., SHICHITA, M., YAMAMOTO, N. et YAMAMOTO, M. (2000). Enhanced expression of translation factor mRNAs in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*, 20(4):2489–2494.
- [Sifringer *et al.*, 2007] SIFRINGER, M., STEFOVSKA, V., ZENTNER, I., HANSEN, B., STEPULAK, A., KNAUTE, C., MARZAHN, J. et IKONOMIDOU, C. (2007). The role of matrix metalloproteinases in infant traumatic brain injury. *Neurobiol Dis*, 25(3):526–535.
- [Skalli *et al.*, 1986] SKALLI, O., ROPRAZ, P., TRZECIAK, A., BENZONANA, G., GILLESSEN, D. et GABBIANI, G. (1986). A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin : a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol*, 103(6 Pt 2):2787–2796.
- [Sofroniew, 2009] SOFRONIEW, M. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, 32(12):638–647.
- [Sofroniew et Vinters, 2010] SOFRONIEW, M. et VINTERS, H. (2010). Astrocytes : biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119(1):7–35.
- [Song *et al.*, 2006] SONG, J. H., BELLAIL, A., TSE, M. C. L., YONG, V. W. et HAO, C. (2006). Human astrocytes are resistant to fas ligand and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *J Neurosci*, 26(12):3299–3308.
- [Strand *et al.*, 2004] STRAND, S., VOLLMER, P., van den ABEELLEN, L., GOTTFRIED, D., ALLA, V., HEID, H., KUBALL, J., THEOBALD, M., GALLE, P. R. et STRAND, D. (2004). Cleavage of cd95 by matrix metalloproteinase-7 induces apoptosis resistance in tumour cells. *Oncogene*, 23(20):3732–3736.
- [Stuart *et al.*, 2004] STUART, P., PAN, F., YIN, X., HASKOVA, Z., PLAMBECK, S. et FERGUSON, T. (2004). Effect of metalloprotease inhibitors on corneal allograft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(4):1169–1173.
- [Taylor *et al.*, 2007] TAYLOR, A. R., ROBINSON, M. B. et MILLIGAN, C. E. (2007). In vitro methods to prepare astrocyte and motoneuron cultures for the investigation of potential in vivo interactions. *Nat Protoc*, 2(6):1499–1507.
- [Terada *et al.*, 1996a] TERADA, T., MAKIMOTO, K., TERAYAMA, N., SUZUKI, Y. et NAKANUMA, Y. (1996a). Alpha-smooth muscle actin-positive stromal cells in cholangiocarcinomas, hepatocellular carcinomas and metastatic liver carcinomas. *J Hepatol*, 24(6):706–712.

- [Terada *et al.*, 1996b] TERADA, T., OKADA, Y. et NAKANUMA, Y. (1996b). Expression of immunoreactive matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human normal livers and primary liver tumors. *Hepatology*, 23(6):1341–1344.
- [Thornhill *et al.*, 2000] THORNHILL, S., TEASDALE, G., MURRAY, G., MCEWEN, J., ROY, C. et PENNY, K. (2000). Disability in young people and adults one year after head injury : prospective cohort study. *BMJ*, 320(7250):1631–1635.
- [Tilman *et al.*, 2007] TILMAN, G., MATTIUSI, M., BRASSEUR, F., van BAREN, N. et DECOTTIGNIES, A. (2007). Human periostin gene expression in normal tissues, tumors and melanoma : evidences for periostin production by both stromal and melanoma cells. *Mol Cancer*, 6:80.
- [Tran *et al.*, 2005] TRAN, K. T., LAMB, P. et DENG, J.-S. (2005). Matrikines and matricryptins : Implications for cutaneous cancers and skin repair. *J Dermatol Sci*, 40(1):11–20.
- [Tsuji no *et al.*, 2007] TSUJINO, T., SESHIMO, I., YAMAMOTO, H., NGAN, C. Y., EZUMI, K., TAKEMASA, I., IKEDA, M., SEKIMOTO, M., MATSUURA, N. et MONDEN, M. (2007). Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 13(7):2082–2090.
- [Tuchweber *et al.*, 1996] TUCHWEBER, B., DESMOULIÈRE, A., BOCHATON-PIALLAT, M. L., RUBBIA-BRANDT, L. et GABBIANI, G. (1996). Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest*, 74(1):265–278.
- [Utispan *et al.*, 2010] UTISPAN, K., THUWAJIT, P., ABIKO, Y., CHARNGKAEW, K., PAUPAIROJ, A., CHAU-IN, S. et THUWAJIT, C. (2010). Gene expression profiling of cholangiocarcinoma-derived fibroblast reveals alterations related to tumor progression and indicates periostin as a poor prognostic marker. *Mol Cancer*, 9:13.
- [Vaillant *et al.*, 1999] VAILLANT, C., DIDIER-BAZÈS, M., HUTTER, A., BELIN, M. et THOMASSET, N. (1999). Spatiotemporal expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in the postnatal developing rat cerebellum. *J Neurosci*, 19(12):4994–5004.
- [van de Bovenkamp *et al.*, 2005] van de BOVENKAMP, M., GROOTHUIS, G. M. M., DRAAISMA, A. L., MEREMA, M. T., BEZUIJEN, J. I., van GILS, M. J., MEIJER, D. K. F., FRIEDMAN, S. L. et OLINGA, P. (2005). Precision-cut liver slices as a new model to study toxicity-induced hepatic stellate cell activation in a physiologic milieu. *Toxicol Sci*, 85(1):632–638.
- [van de Bovenkamp *et al.*, 2006] van de BOVENKAMP, M., GROOTHUIS, G. M. M., MEIJER, D. K. F. et OLINGA, P. (2006). Precision-cut fibrotic rat liver slices as a new model to test the effects of anti-fibrotic drugs in vitro. *J Hepatol*, 45(5):696–703.
- [Varga, 2002] VARGA, J. (2002). Scleroderma and smads : dysfunctional smad family dynamics culminating in fibrosis. *Arthritis Rheum*, 46(7):1703–1713.
- [Verrecchia et Mauviel, 2002] VERRECCHIA, F. et MAUVIEL, A. (2002). Control of connective tissue gene expression by tgf beta : role of smad proteins in fibrosis. *Curr Rheumatol Rep*, 4(2):143–149.
- [Vickers *et al.*, 2004] VICKERS, A. E. M., SAULNIER, M., CRUZ, E., MEREMA, M. T., ROSE, K., BENTLEY, P. et OLINGA, P. (2004). Organ slice viability extended for pathway characterization : an in vitro model to investigate fibrosis. *Toxicol Sci*, 82(2): 534–544.
- [Vilalta *et al.*, 2008] VILALTA, A., SAHUQUILLO, J., ROSELL, A., POCA, M., RIVEIRO, M. et MONTANER, J. (2008). Moderate and severe traumatic brain injury induce early overexpression of systemic and brain gelatinases. *Intensive Care Med*, 34(8):1384–1392.

- [Vu *et al.*, 1998] VU, T. H., SHIPLEY, J. M., BERGERS, G., BERGER, J. E., HELMS, J. A., HANAHAH, D., SHAPIRO, S. D., SENIOR, R. M. et WERB, Z. (1998). Mmp-9/gelatinase b is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*, 93(3):411–422.
- [Wagner *et al.*, 2002] WAGNER, A., KLINE, A., SOKOLOSKI, J., ZAFONTE, R., CAPU-LONG, E. et DIXON, C. (2002). Intervention with environmental enrichment after experimental brain trauma enhances cognitive recovery in male but not female rats. *Neurosci Lett*, 334(3):165–168.
- [Wang *et al.*, 2003a] WANG, M., WANG, T., LIU, S., YOSHIDA, D. et TERAMOTO, A. (2003a). The expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas of different pathological grades. *Brain Tumor Pathol*, 20(2):65–72.
- [Wang *et al.*, 2006] WANG, W.-S., CHEN, P.-M., WANG, H.-S., LIANG, W.-Y. et SU, Y. (2006). Matrix metalloproteinase-7 increases resistance to fas-mediated apoptosis and is a poor prognostic factor of patients with colorectal carcinoma. *Carcinogenesis*, 27(5):1113–1120.
- [Wang *et al.*, 2003b] WANG, X., LEE, S.-R., ARAI, K., LEE, S.-R., TSUJI, K., REBECK, G. W. et LO, E. H. (2003b). Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med*, 9(10):1313–1317.
- [Wang *et al.*, 2002] WANG, X., MORI, T., JUNG, J.-C., FINI, M. et LO, E. (2002). Secretion of matrix metalloproteinase-2 and -9 after mechanical trauma injury in rat cortical cultures and involvement of map kinase. *J Neurotrauma*, 19(5):615–625.
- [Wanless *et al.*, 2000] WANLESS, I. R., NAKASHIMA, E. et SHERMAN, M. (2000). Regression of human cirrhosis. morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. *Arch Pathol Lab Med*, 124(11):1599–1607.
- [Weller *et al.*, 1994] WELLER, M., FREI, K., GROSCURTH, P., KRAMMER, P. H., YONEKAWA, Y. et FONTANA, A. (1994). Anti-fas/apo-1 antibody-mediated apoptosis of cultured human glioma cells. induction and modulation of sensitivity by cytokines. *J Clin Invest*, 94(3):954–964.
- [Wetzel *et al.*, 2004] WETZEL, M., TIBBITTS, J., ROSENBERG, G. A. et CUNNINGHAM, L. A. (2004). Vulnerability of mouse cortical neurons to doxorubicin-induced apoptosis is strain-dependent and is correlated with mrnas encoding fas, fas-ligand, and metalloproteinases. *Apoptosis*, 9(5):649–656.
- [Yu *et al.*, 2009] YU, W., LIU, J., XIONG, X., AI, Y. et WANG, H. (2009). Expression of mmp9 and cd147 in invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix and their implication. *Pathol Res Pract*, 205(10):709–715.
- [Zhang *et al.*, 2006] ZHANG, Y., HU, M.-Y., WU, W.-Z., WANG, Z.-J., ZHOU, K., ZHA, X.-L. et LIU, K.-D. (2006). The membrane-cytoskeleton organizer ezrin is necessary for hepatocellular carcinoma cell growth and invasiveness. *J Cancer Res Clin Oncol*, 132(11):685–697.
- [Zhao *et al.*, 2007] ZHAO, J. X., YANG, L. P., WANG, Y. F., QIN, L. P., LIU, D. Q., BAI, C. X., NAN, X., SHI, S. S. et PEI, X. J. (2007). Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in rat brain after implantation of 9l rat glioma cells. *Eur J Neurol*, 14(5):510–516.

Quatrième partie

Annexes

Annexe A

Technique de Fractionnement par Couplage Flux Force de Sédimentation (SdFFF)

A.1 Principes généraux de la technique de SdFFF : mode d'élution inertiel.

Le concept des méthodes de (SdFFF) a été inventé à la fin des années 1960 par J.C. Giddings. Elles représentent une famille de techniques apparentées à la chromatographie liquide où la colonne est remplacée par un canal en forme de ruban de très faible épaisseur (80-250 μm) devant la largeur (1-2 cm) et la longueur (50-90 cm) (Giddings, 1993) (Figure : A.1). La séparation des espèces microniques (cellules, amidon) dépend de leur



FIGURE A.1 – Schéma général d'un canal de séparation de FFF.

sensibilité à deux forces antagonistes :

1. une force associée à l'application d'un champ externe multigravitationnel (mise en rotation du canal) appliqué perpendiculairement à la grande surface du canal, conduisant les particules vers la paroi d'accumulation (vitesses d'élution faibles) ;
2. une force d'élévation d'origine hydrodynamique liée au déplacement des particules dans la phase mobile, les conduisant vers le centre du canal (vitesses d'élution élevées).

La balance de ces deux forces définit une position d'équilibre pour chaque population de particules séparées. Les particules sont alors focalisées dans de fines couches situées au dessus de la paroi d'accumulation. Ces monocouches seront éluées à la vitesse de la ligne de flux passant par leur centre de gravité (Figure : A.2).

Les forces hydrodynamiques sont décrites par les équations suivantes (Williams S, 1994) :

$$F_L = F_I + F_{asc} \approx C \frac{a^3 \eta S_o}{\delta} \text{ avec } F_I = C \frac{a^3 \eta 6 \langle V \rangle}{\delta w} \text{ et } F_{asc} = 13,5 \pi \frac{\langle V \rangle^2 a^4 \rho}{w^2} g \left(\frac{x}{w} \right)$$

FL : forces hydrodynamiques, *FI* : forces inertielles, *Fasc* : forces ascensionnelles, *C* : coefficient adimensionnel dépendant du flux de phase mobile ($\approx 7.10^{-3}$), *a* : rayon des particules, η : viscosité, ρ : densité de la phase mobile, *So* : coefficient de Soret, δ : distance entre le centre de gravité de la monocouche et la paroi d'accumulation, $\langle V \rangle$: vitesse moyenne de la phase mobile / *w* : épaisseur du canal, *x* : distance entre le centre de gravité de la particule et la paroi.

Les facteurs influençant ces forces, et sur lesquels il est possible d'agir pour améliorer la séparation sont essentiellement la vitesse de la phase mobile (débit) et l'épaisseur du canal. Concernant les particules, les deux principaux paramètres régissant la séparation et l'ordre d'élution sont la densité et la taille. A densité égale, les particules les plus grandes génèrent le plus de forces hydrodynamiques, situées plus haut dans le canal elles

seront éluées avant les particules de plus faible diamètre (Figure : A.1). En SdFFF, la force de gravité s'exerçant sur une particule est de la forme :

$$F = m(1 - \frac{\rho_{mob}}{\rho_{part}})\omega^2 r$$

m : masse de la particule, ρ : densité de phase mobile et de la particule, ω : fréquence de rotation angulaire, r : rayon du rotor.

A taille égale, les particules les plus denses sont plus sensibles au champ de gravité et sont éluées en dernier. Dans une population de forte polydispersité en taille et densité comme les cellules, les particules les plus grandes et les moins denses seront éluées en premier, alors que les plus petites et les plus denses le seront en dernier. L'intérêt du mode d'éluion inertiel est évident pour l'éluion des cellules dont on connaît la fragilité et la capacité d'interaction ou d'adhésion aux surfaces. Ces interactions conduisent à des effets néfastes en termes d'intégrité fonctionnelle. Dans une stratégie de séparation cellulaire ou de particules microniques, du fait de l'importante sélectivité de ce mode en fonction de la taille et du faible risque d'interaction particules / paroi qu'il offre, le mode inertiel est un modèle de choix, dont on doit assurer la mise en œuvre (Battu et al., 2002). La SdFFF est une méthode préparative, douce et passive en comparaison de méthodes utilisant un pré-marquage fluorescent ou magnétique. La SdFFF, dont l'efficacité est simplement basée sur les propriétés biophysiques intrinsèques des cellules, est particulièrement intéressante dans les applications pour lesquelles le marquage peut interférer avec l'utilisation des cellules (culture, transplantation), ou pour lesquelles aucun marqueur n'est disponible, ou dans le cas où celui-ci induit une différenciation cellulaire (cellules souches) (Battu et al., 2002).

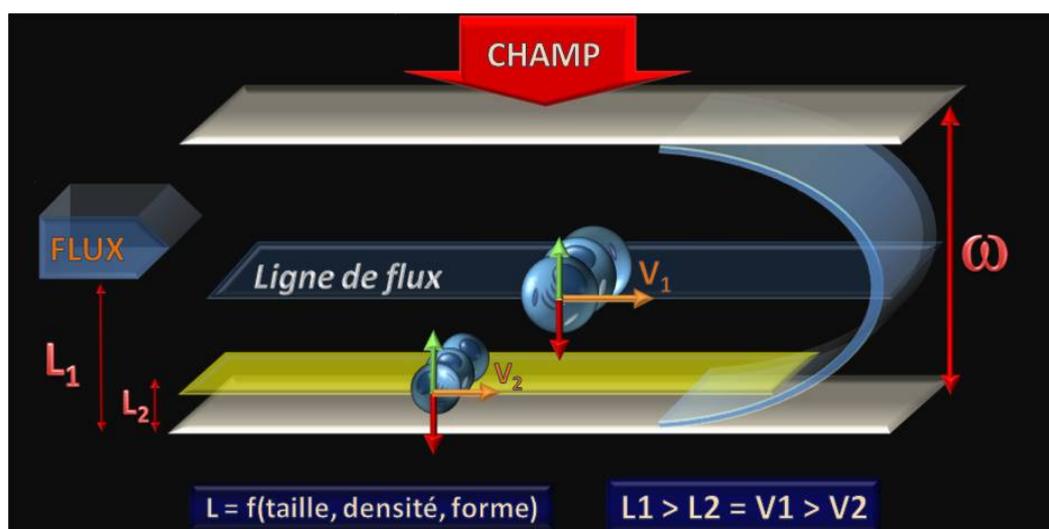


FIGURE A.2 – Principe général de séparation cellulaire par SdFFF en mode inertiel.

Le profil d'éluion (fractogramme) de SdFFF est un signal de type absorbance = f (temps) (Figure : A.3). Dans le cadre de la séparation d'espèces biologiques, afin de déterminer quelle fraction correspond à la sous-population d'intérêt, selon un critère biologique donné, il est nécessaire de réaliser un couplage avec les techniques de caractérisation biologiques : cytométrie en flux, immunofluorescence, biologie moléculaire... Ceci permet un calibrage multidimensionnel des fractogrammes obtenus en fonction de la taille, de la densité et des propriétés biologiques : état de différenciation (cellules souches), expression de marqueurs biologiques, sensibilité à l'apoptose, etc., ceci pouvant être défini sous le vocable général de "cellulomique" (Figure : A.3) (Battu et al., 2002).

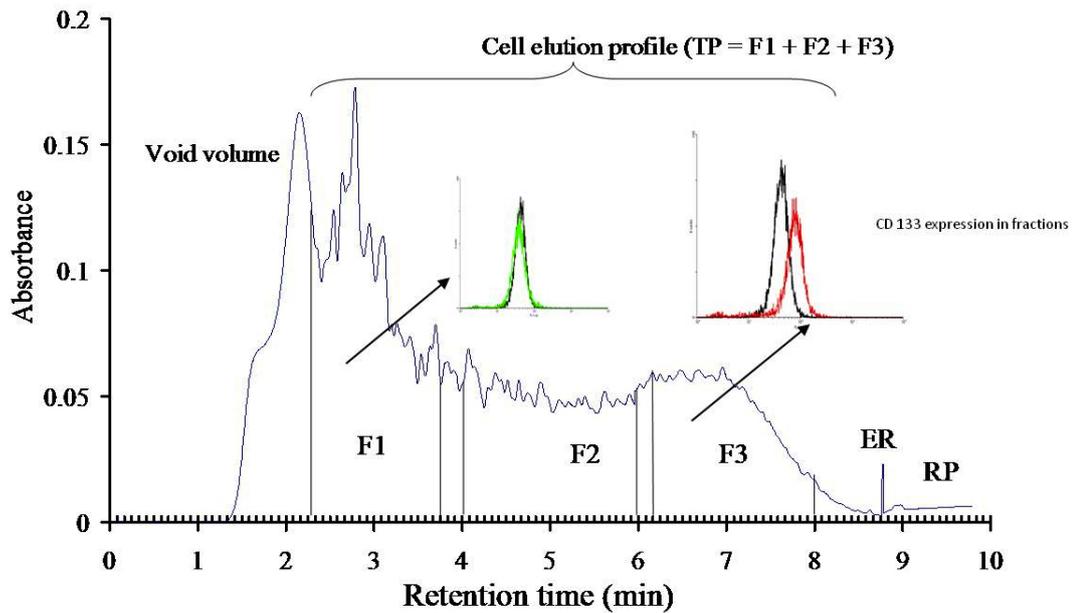


FIGURE A.3 – Profil d'éluion des cellules U87-MG (fractogramme) et répartition de l'expression du marqueur de cellules souches CD-133.

A.2 Développent instrumental

La SdFFF est reconnue comme l'une des méthodes de FFF des plus efficaces et polyvalentes (Giddings, 1993). Cependant, sa diffusion a été jusqu'à présent limitée par le manque récurrent de matériels fiables disponibles à la commercialisation. Ainsi, de nombreuses équipes, bien que désireuses de l'utiliser, y ont renoncé par manque de matériels adéquats ou de savoir faire pour le développer. De ce fait, en produisant nos prototypes, nous avons acquis au cours de cette dernière décennie une expérience et une place unique aux niveaux européen et mondial. Le développement de prototypes de phase-1 à -3 (Figure : A.4) a porté sur l'ensemble des pièces maîtresses de l'appareillage : statif, bol de centrifugation, contrôle et pilotage du moteur, joints tournants, afin de les fiabiliser, et de permettre leur adaptation au tri cellulaire aseptique. Une étape fondamentale de ce travail a été la mise en place du système de contre-canal (Cardot et al., 2006a). Ce travail a été reconnu et récompensé par un Concours Allègre 2002, et par le transfert de technologie et de valorisation au sein de l'Université de Limoges (Cardot et al., 2006 a et b). Ainsi, sommes-nous à même de proposer un outil analytique fiable et performant, mais aussi de proposer des applications associées, démontrant la polyvalence de la technique et d'en assurer la diffusion. Le développement instrumental de prototypes s'est accompagné d'une adaptation méthodologique pour l'analyse biologique dont l'efficacité est démontrée par le respect des exigences minimales en terme de séparation cellulaire telles que le maintien

1. de l'intégrité fonctionnelle;
2. d'un haut pourcentage de viabilité à court et long terme (culture et transplantation);
3. de l'état de maturation et de différenciation (Battu et al., 1993).

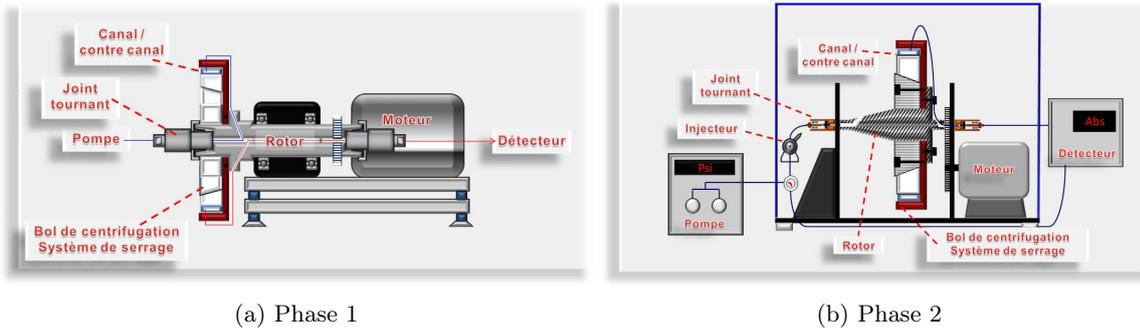


FIGURE A.4 – Prototypes de phase 1 (gauche) et de phase 2 (droite).

A.3 Tri cellulaire par SdFFF

Depuis 20 ans, la SdFFF et les techniques associées ont démontré leur capacité de tri cellulaire dans de nombreux domaines. L'activité de tri cellulaire que nous réalisons s'organise autour de trois axes complémentaires et interdépendants : Cancérologie / Neurologie / Cellules souches (Bégaud-Grimaud et al., 2007 ; Bertrand et al., 2009 ; Cailleteau et al., 2010 ; Micallef et al., 2010).

A.4 Bibliographie :

- Battu S**, Cook-Moreau J, Cardot PJP (2002) Sedimentation field-flow fractionation : methodological basis and applications for cell sorting. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 25 :2193-2210.
- Battu S**, Elyaman W, Hugon J, Cardot PJP (2001) Cortical cell elution by sedimentation field-flow fractionation. *Biochim Biophys Acta* 1528 :89-96.
- Begaud-Grimaud G**, Battu S, Lazcoz P, Castresana JS, Jauberteau MO, Cardot PJ (2007) Study of the phenotypic relationship in the IMR-32 human neuroblastoma cell line by sedimentation field flow fractionation. *Int J Oncol* 31 :883-892.
- Bertrand J**, Liagre B, Begaud-Grimaud G, Jauberteau MO, Beneytout JL, Cardot PJ, Battu S (2009a) Analysis of relationship between cell cycle stage and apoptosis induction in K562 cells by sedimentation field-flow fractionation. *J Chromatogr B* 877 :1155-1161.
- Cailleteau C**, Micallef L, Lepage C, Cardot PJP, Beneytout JL, Liagre B, Battu S (2010) Investigating the relationship between cell cycle stage and diosgenin-induced megakaryocytic differentiation of HEL cells using sedimentation field-flow fractionation. *Anal Bioanal Chem* 1-11.
- Cardot P**, Battu S, Sarrazin R (2006a) Field flow fractionation separation device with a separation channel and a counter channel, Eur Pat Appl, (Universite de Limoges, Fr.). pp. 20.
- Cardot P**, Battu S, Sarrazin R (2006b) Swivel joint for conduits used in analytical chemistry, Fr. Demande, (Universite De Limoges, Fr.). pp. 25.
- Giddings JC** (1993) Field-flow fractionation : analysis of macromolecular, colloidal, and particulate materials. *Science* 260 :1456-1465.
- Micallef L**, Battu S, Pinon A, Cook-Moreau J, Cardot PJ, Delage C, Simon A (2010) Sedimentation field-flow fractionation separation of proliferative and differentiated subpopulations during Ca²⁺-induced differentiation in HaCaT cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1 ;878(15-16) :1051-1058.
- Williams PS**, Lee S, Giddings JC (1994) Characterization of hydrodynamic lift forces by field-flow fractionation. Inertial and near-wall lift forces. *Chem Eng Commun* 130 :143-166.

Annexe B

De la cicatrisation à la fibrose dermique

Biologie cutanée, CoBiP 2009, Editions Matrix, ISBN : 978-2-9535434-0-7

Annexe C

Double Immunohistochemistry with Horseradish Peroxidase and Alkaline Phosphatase Detection Systems

Sarrazy, V. et Desmoulière, A. (2010). Double immunohistochemistry with horseradish peroxidase and alkaline phosphatase detection systems. *Methods Mol Biol*, 611 :59–71.

Résumé

Cellules fibrogéniques impliquées dans la réparation tissulaire (comparaison foie / système nerveux central), rôles des MMPs.

Le développement d'une fibrose est caractérisé par une accumulation de matrice extracellulaire (MEC). Dans la plupart des organes, les cellules fibrogéniques impliquées dans ce dépôt de MEC sont les fibroblastes et les myofibroblastes alors que, dans le système nerveux central (SNC), ce sont les astrocytes. Au cours de ce travail, nous avons réalisé une comparaison entre les cellules fibrogéniques impliquées dans la fibrose hépatique et celles impliquées dans la « fibrose » du SNC appelée cicatrice gliale. Dans la fibrose hépatique, en utilisant un modèle élégant de culture de tranches de foie, nous avons confirmé que les cellules fibrogéniques impliquées dérivent des cellules étoilées du foie et / ou des fibroblastes portaux. Parallèlement, nous avons réalisé une étude protéomique pour caractériser la réaction stromale des cholangiocarcinomes qui implique principalement les fibroblastes portaux. Afin de pouvoir comparer les phénomènes de fibroses hépatiques et la formation de la cicatrice gliale, nous avons développé des cultures d'astrocytes à partir de cortex de rats nouveau-nés que nous avons traités avec du LPS pour mimer l'activation observée *in vivo*. Nous avons étudié les interactions entre la voie pro-apoptique Fas et le système des MMPs. De plus, nous avons séparé différentes populations astrocytaires grâce à une technique originale de fractionnement par couplage flux/force. Parallèlement, nous avons développé un modèle *in vivo* de lésion corticale chez le rat pour corrélérer nos observations *in vitro* et *in vivo*, et pour étudier également l'effet de différents facteurs neuroprotecteurs. En fin, nous avons étudié les interactions entre les voies Fas et TLR4 ainsi que le système des MMPs dans les glioblastomes.

Mots clés : Cellule fibrogénique, fibroblaste, fibrose hépatique, cicatrice gliale, astrocyte, stroma tumoral, cholangiocarcinome, glioblastome.

Abstract

Fibrogenic cells involved in tissue repair (comparison between liver and central nervous system) : roles of MMPs

Fibrosis development is characterized by a deposition of extracellular matrix (ECM). In most organs, fibrogenic cells involved in ECM deposition are fibroblasts and myofibroblasts. In the case of the central nervous system (CNS), the secretion of ECM is mostly performed by astrocytes. In this thesis, we conducted a comparison between the cells involved in liver fibrosis and those involved in the CNS "fibrosis" called glial scar. In hepatic fibrosis, using an elegant model of cultured hepatic slices, we confirmed that fibrogenic cells involved derived from hepatic stellate cells and / or portal fibroblasts. In parallel, we performed a proteomic study to characterize the stromal reaction of cholangiocarcinomas which mainly involves portal fibroblasts. To compare the phenomena of liver fibrosis and the formation of the glial scar, we have developed a culture model of astrocytes derived from cortex of newborn rats that we have treated with LPS to mimic *in vivo* activation. We have studied the interactions between the pro-apoptotic Fas pathway and the MMPs system. In addition, we separated different populations of astrocytes using an original technique of sedimentation field flow fractionation. In parallel, we developed an *in vivo* model of cortical lesion in the rat to correlate our observations *in vitro* and *in vivo* and to study the neuroprotective effects of different factors. Finally, we studied the interactions between Fas and TLR4 pathways and the MMP system in glioblastoma cell lines.

Key words : Fibrogenic cell, fibroblast, liver fibrosis, glial scar, astrocyte, tumor stroma, cholangiocarcinoma, glioblastoma.