

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

INSERM U930 "Imagerie et cerveau"

Equipe "Imagerie Moléculaire du Cerveau"

THÈSE présentée par :

Claire TRONEL

soutenue le : 5 décembre 2013

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

**Evaluation des effets de molécules à visée
neuroprotectrice dans un modèle *in vivo* de
neuroinflammation chez le rat ; étude mécanistique et
caractérisation du modèle au cours du temps.**

THÈSE dirigée par :

M. ANTIER Daniel

Professeur des Universités, Université de Tours

Co-encadrée par :

M. ARLICOT Nicolas

Maître de conférences, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Mme BERNAUDIN Myriam

Directeur de recherche CNRS, Caen

M. MELIK PARSADANIAN TZ Stéphane

Directeur de recherche INSERM, Paris

JURY :

M. ANTIER Daniel

Professeur des Universités, Université de Tours

M. ARLICOT Nicolas

Maître de conférences, Université de Tours

Mme BERNAUDIN Myriam

Directeur de recherche CNRS, Caen

M. MELIK PARSADANIAN TZ Stéphane

Directeur de recherche INSERM, Paris

Mme PAGE Guylène

Professeur des Universités, Université de Poitiers

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les Docteurs Myriam Bernaudin et Stéphane Melik Parsadaniantz d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse.

Je remercie également le Professeur Guylène Page de participer à mon jury de thèse, mais également pour tous les conseils qu'elle a pu me donner, aussi bien concernant le travail de recherche que pour mon avenir professionnel. La collaboration que nous avons eue pendant ces trois années m'a réellement beaucoup apporté et je suis très fière de l'article que nous avons écrit ensemble.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Denis Guilloteau pour m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de l'INSERM U930 « Imagerie et cerveau ».

Je remercie le Docteur Sylvie Chalon de m'avoir accueillie pour réaliser mon stage de Master puis ma thèse dans son équipe 3, « Imagerie moléculaire du cerveau ». Je tiens également à la remercier sincèrement pour ses conseils, son écoute mais également pour le soutien qu'elle m'a apporté au cours de cette thèse et ainsi que ses encouragements et son aide quant à mon avenir post-thèse. Elle fait partie des gens grâce auxquels je souhaite continuer dans cette voie.

Je remercie également le Professeur Daniel Antier qui a accepté de m'encadrer lors de ces années de travail. Merci pour la confiance que tu m'as accordée, mais également pour m'avoir toujours poussée à faire de mon mieux. Je tiens également à te remercier pour m'avoir soutenue dans mes démarches concernant mon avenir. Tu as toujours été de bon conseil et su te montrer présent quand il le fallait.

Mes remerciements s'adressent également au Docteur Nicolas Arlicot, qui a été mon co-encadrant pendant cette thèse. Merci pour ton soutien et ton humour tout au long de cette thèse (que j'ai réussi à écrire entre deux épisodes de L'amour est dans le pré). Et droit au but !

Je tiens également à remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai travaillé, de près ou de loin, au cours de cette thèse, qui sont pour beaucoup devenues bien plus que des collègues et grâce à qui les matins au labo n'ont jamais été un calvaire.

Sylvie "Bobo" Bodard, déjà tu m'as tout appris. Grâce à toi je perfuse les yeux fermés et des fois j'arrive même à placer des rats du premier coup ! Mais surtout merci pour ta présence, ta disponibilité, ta gentillesse, ta générosité, ton humour et ton écoute (bureau des pleurs bonjour !). Et bien sûr pour les débriefs du mardi matin, les conseils vestimentaires (ce pull il te va bien mais il a un trou tu devrais le jeter !) les midis au resto (et les soirs au resto aussi), les échanges de bouquins, les vidéos de bébés chats trop trop trop mignons et surtout, surtout, merci pour la piscine quand il faisait 35°C à l'ombre !

Zuhal "Zuzu" Gulhan, merci pour tout, les fous rires (le bureau des pleurs, c'est aussi un peu le bureau des langues de vipères), l'écoute, les conseils, ta disponibilité, ton aide, le café "à peine" fort du temps où on en faisait encore couler...merci pour tout en fait !

Sophie Serrière, merci pour tous ces échanges qu'on a pu avoir, toutes les fois où nos discussions m'ont permis d'avancer mais aussi pour toutes les fois où tu m'as fait rire, tous les bouquins que tu m'as prêtés (fais-moi penser à tout te rendre avant de partir !) et tout le reste !

Merci aussi à ceux avec qui je n'ai pas vraiment travaillé mais avec lesquels l'échange a toujours été agréable, léger et drôle !

Laurent, tu m'as souvent bien fait rire (tu crois que Chuck Norris vient pour Noël cette année ?) mais tu as aussi été de très bon conseil et disponible malgré ton emploi du temps surchargé.

Emilie V., toujours sympathique et souriante, nos discussions du midi ont souvent été très enrichissantes.

Jackie, toujours disponible et à l'écoute, et qui m'a presque convaincue de tester le camembert avec le Nutella (presque).

Géraldine, tu as toujours été intéressée et à l'écoute quand nous nous sommes croisées (et tu m'as donné un protocole inratable de PFA !)

Pierre, on ne s'est pas souvent croisé mais tu as toujours eu un petit mot et je t'en remercie.

Clovis, merci pour ta gentillesse et ta sympathie.

Merci à Lucette pour toutes nos discussions et pour m'avoir imprimer tous les documents du monde sur l'iode 131 (et désolée d'avoir allumé tous les dosimètres !).

Merci à Francine, toujours agréable, efficace et disponible.

Un grand merci aussi "aux Maries" ! A Marie-Paule, pour sa constante bonne humeur, sa disponibilité et la petite musique qui l'accompagne toujours ! Et à Mary-Christine pour son efficacité et ses petites blagues.

Merci à tous ceux du CERRP, Johnny, Céline, Christelle et Gabrielle. Ca a toujours été un plaisir de vous retrouver aux réunions et de pouvoir échanger avec vous. Et aussi bien sûr quand Gabrielle venait se recharger en glace au labo !

Et puis, je voudrais aussi remercier tous ceux avec lesquels j'ai partagé notre beau bureau (avant de m'isoler dans la cabine). J'en profite pour remercier tous ceux qui ont contribué à ce que ce bureau soit toujours bien achalandé en sucreries, gâteaux et chocolat, surtout pendant ma dernière phase de rédaction. Il ne faut jamais négliger l'impact du chocolat dans la vie d'un thésard.

Merci à Aurélie D., pour ta douceur, ton écoute, ton humour, ton soutien pendant ces dernières semaines et toutes les discussions que nous avons pu avoir (un jour, on sera les deux pros de l'immuno !). Ca a vraiment été un plaisir de travailler avec toi.

Merci à Julie "oh nan", pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ton humour (même si tu ne fais pas toujours exprès de nous faire rire !). Dis-moi, est ce que ça bouche à Monnaie ? Tu es un peu comme un petit rayon de soleil dans le bureau !

Merci à Rudy (le tombeur de ces dames), même si on n'aura pas vraiment eu le temps de se connaître, tu nous auras bien fait rire et je te souhaite bon courage pour continuer dans cet univers Ô combien féminin !

Bien entendu, il y a aussi ~~mes compagnons de galère~~ les autres thésards de l'équipe !

FX bien sûr, on a passé presque 4 ans ensemble ici avant que tu n'émigres pour l'Angleterre. Ça n'a pas toujours été facile entre nous, heureusement notre amour commun de la télé réalité nous a rapprochés ! Bon et l'ADOCT aussi il faut bien le dire. Au final maintenant nous voilà amis, même si tu n'as jamais réussi à me traîner au Pym's !

Hiba, on n'a pas vraiment eu l'occasion de se connaître, mais merci pour ta gentillesse et tes pâtisseries.

Merci à Paolo, qui malgré la barrière de la langue a su s'intégrer et participer à notre vie de doctorants ! Je parie que tu vas enflammer le dance-floor au gala !

Vincent, déjà merci pour avoir sauvé ma thèse en me "prêtant" end note. Mais aussi pour ton humour et pour la découverte des sandwiches chawarma (ah non en fait, c'était pas terrible). Je ne veux pas te mettre la pression petit Padawan, mais l'avenir de l'ADOCT est (un peu) entre tes mains.

Emilie, petit bébé thésard qui sera bientôt un thésard tout court, merci pour les fous rires, tes petites attentions et ton soutien. Et merci aussi de toujours penser à remplir le cahier de labo (je crois que je vais en emporter des photocopies) ! Fais attention à ne pas te faire de claquage à tes sessions de sport!

Mine, thank you for all the good time we spend together and to help me to improve my English. I think I still have a lot of work to do to be fluent! I hope that everything will be all right for you and I hope that you'll be back in the lab before I end my PhD.

Courage à vous tous, vous allez voir le meilleur moment c'est la troisième année, quand on écrit ses remerciements !

Merci à également l'armée des stagiaires qui sont passés par ici. A ceux venant de Belgique bien sûr : Dieter et Liesbeth que j'ai peu côtoyés mais ont amené beaucoup de bonne humeur dans notre bureau, Inge si drôle et sympathique (mais capable d'être "vraiment

furieuse"), Jonathan mon petit chien si sensible qui gniacke ce fut un plaisir de te connaître petit belge (où est Laurent ?), Michiel le fan de cinéma et Charlotte qui sait faire la vague !

Mais aussi aux pharmaciens qui sont passés par là : Lucas, qui m'a formé à mon arrivée et qui s'est toujours montré attentionné depuis, Brice le rugbyman avec qui on s'est bien marré (courage, tu vas être un vrai docteur bientôt !), Katel, ma stagiaire maître de conf qui a été de bon conseil et le sergent-chef Dorian, j'espère qu'on ne t'a pas trop traumatisé (et dis-nous quand tu auras un nouveau clip)!

Et il y a aussi eu des médecins ! Aude qui a découvert qu'un laboratoire de recherche c'est pas comme un hôpital, Aurélie T., la petite Aurélie, qui m'a fait découvrir les chips de patate douce et à qui je dois donc une reconnaissance éternelle, et bien sûr Laurence, best stagiaire ever ! Ah Lolo, on en a de la vidéo collector, je ne sais pas laquelle je préfère "Je fais le sol aujourd'hui et demain les bureaux" ou bien "il m'a envoyé un testo ! UN TESTO ! " ? Bonne continuation là-bas dans ta Bretagne natale, Madame le Neuropédiatre !

Et puis à tous les autres stagiaires : Fanny, déjà parce que tu es du Mans (7-2 !) et puis parce que ceux de l'IUT sont les meilleurs, Dimitri qui nous a bien fait rire, Jérôme qui doit un pressing au petit belge, Benjamin B. qui a compris pourquoi les femmes se maquillent, Morgane, qu'est-ce qu'on a pu se marrer toutes les deux, Valérian qui a réussi à me faire comprendre son sujet (et c'était pas gagné !), Yun et ses cours de chinois et Yang qui partage mon amour du shopping (merci pour les baguettes !).

Et un grand merci à tous les stagiaires de 3^{ème} dont j'ai oublié le nom mais que je n'ai pas oublié d'exploiter quand il a fallu monter des coupes de cerveaux au pinceau...vous m'avez bien aidée !

Et puis, je voudrais remercier tous les autres qui m'ont aidée lors de cette thèse. Grégory et Vincent Courdavault, les végétalistes qui m'ont appris à faire de la fluorescence. Mais aussi Frédéric Minier, qui a pris le relais de l'immunofluorescence. Et Gaël Rochefort, avec qui j'ai fait mes premiers western blot hors séance de TP.

Mais cette thèse, ça a aussi été la joie de découvrir l'enseignement en fac et je tiens à remercier les personnes avec lesquelles j'ai travaillé à cette occasion et qui ont fait en sorte que tout se passe dans les meilleures conditions : Sylvaine Renault, Thibault Josse, Corinne Auge, Laura et Olivia (félicitations pour ta fille !).

Et puis il n'y a pas que la thèse dans la vie, il y a l'ADOCT aussi ! Merci à tous ceux qui ont été dans le bureau en même temps que moi : Marmotte (ex-président), FX (Docteur Lepelletier !), Lucie (Docteur Clarysse !), Aurore (Madame l'enseignante !), Mimsy (Docteur Julienne qui a fait renaître l'ADOCT de ses cendres), Daphné (la prochaine fois je vous suis au café chaud !), Camille (chouquette), Vincent P. (Borat), Vincent J., Rimoric (président !), Aline, Fillot (tu viens plus aux soirées ?), Max (tu me fais bien marrer avec tes "mimes"). Je ne sais pas comment les suivants vont s'en sortir sans une super secrétaire comme moi !

Et tous ceux que l'ADOCT m'a permis de rencontrer : Steph, peste comme j'adore ; Laure et son petit accent ; Octavio le champion du bad ... et tous les autres avec lesquels nous

avons passé bien des soirées à ~~nous plaindre de notre thèse~~ débattre passionnément sur nos sujet de thèse.

Aussi étonnant que cela puisse paraître, j'ai aussi des amis d'avant la thèse et que je tiens à remercier.

Un grand merci à Marion, même si on ne se voit pas aussi souvent que l'on voudrait, ce sont toujours des moments précieux et réussis.

Merci à Lucie (Docteur Clarysse, je la refais), qui me suis depuis le master. Je crois qu'on s'est pas mal épaulées et soutenues mutuellement pendant ces trois ans de thèse, tu vas être une super prof qui vivra avec son super Tonio dans une super maison !

Merci à Camille, tu te rends compte qu'on se connaît depuis que tu as 17 ans ? Tu n'es bientôt plus si petite petite Bou ! Merci à Beb, ma TC forever, dès que j'ai fini on part faire les fofolles à Dublin !!! Merci à Memen (Docteur Villeret !), qui n'a pas hésité à venir me faire des crêpes un dimanche sans chauffage au risque d'attraper mon énorme rhume. Merci à vous trois, vous êtes vraiment des vraies copines ! C'est un petit peu grâce à vous que j'en suis là !

Juliane, on a bien grandi depuis la 6^{ème} et cette année 2013 est un peu un tournant pour nous deux, j'ai fait une thèse, tu as fait un bébé (et qu'il est beau ce petit Milo ! tu vois, à peine un mois et il a déjà son nom dans une thèse, je suis vraiment la tata intello !)...le temps passe ! Merci d'être là depuis si longtemps, d'être toujours de bon conseil et de me faire goûter un peu à la nourriture végétarienne.

Et puis, je ne vais bien sûr, pas oublier ma famille sans qui je ne serais (littéralement) pas là aujourd'hui.

Merci à mes parents, de m'avoir toujours aidée et soutenue pendant toutes mes études. Corriger DEUX FOIS cette thèse en 1 semaine, ça c'est du dévouement familial ! Merci tout particulièrement pour votre soutien ces dernières semaines (et maman, ton poulet basquaise, tu m'en refais quand tu veux !). Vous êtes vraiment top !

Merci François mon frère, et merci à Mada, pour tout. Il y a au moins 1/56^{ème} de cette thèse qui a été écrit à Bucarest face au jardin dont j'ai oublié le nom en face de chez vous. Si c'est pas ça la classe, je sais pas ce que c'est ! Merci mon frère qui pense toujours à prendre de mes nouvelles et à me donner des conseils sur mon Avenir.

Et puis bien sûr last mais certainement pas least, Merci Romain. Tu as été mon soutien indéfectible pendant ces 18 mois. Sans toi, il n'y aurait pas de post-doc. Où que ce soit tu seras avec moi alors ça ne me fait (presque) pas peur. A nous l'aventure !

Résumé

Les maladies neurodégénératives ont une physiopathologie complexe dans laquelle la neuroinflammation joue un rôle central. Cette inflammation des tissus cérébraux est notamment associée à l'action des cellules microgliales, macrophages résidents du cerveau dont l'activation chronique contribue à l'évolution défavorable de la maladie. En effet, les cytokines pro-inflammatoires ainsi que les radicaux libres dérivés de l'oxygène sécrétés par la microglie exercent des effets neurotoxiques. Ainsi, la neuroinflammation représente une cible intéressante et très étudiée depuis quelques années dans le traitement des maladies neurodégénératives. Les recherches actuelles tentent de mettre au point de nouvelles molécules anti-inflammatoires et neuroprotectrices dans le but d'en ralentir la progression. Dans ce travail de thèse, nous avons évalué les effets induits par des molécules potentiellement anti-inflammatoires et, à ce titre, neuroprotectrices dans un modèle de neuroinflammation *in vivo* par injection intrastriatale d'acide quinolinique (AQ), un agoniste des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate). L'hyper activation des récepteurs NMDA entraîne une excitotoxicité et une mort neuronale associées à une forte composante inflammatoire. Deux molécules ont été étudiées sur ce modèle : l'hémine, un inducteur de l'hème oxygénase 1 (HO-1), et le C16, un antagoniste de la protéine kinase RNA activée par l'ARN (PKR). Le traitement par l'hémine a entraîné une aggravation des lésions induites par l'AQ. Les investigations menées ont démontré le rôle déterminant du fer libéré lors du catabolisme de l'hème par la HO-1 et de l'augmentation de la production des radicaux libres directement liée à l'induction de cette enzyme. En revanche, le traitement chronique par le C16 dans ce même modèle a induit des effets neuroprotecteurs et anti-apoptotiques associés à une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires et caractérisés notamment par une préservation des neurones striataux exposés à l'injection d'AQ. Parallèlement à ces études, la survie neuronale et le degré d'activations microgliale et astrocytaire ont été mesurés au cours du temps sur une période totale de 90 jours post-injection d'AQ. En synthèse, les résultats obtenus ont permis de caractériser : i) la cinétique du phénomène inflammatoire dans ce modèle ; ii) la capacité du tissu cérébral à se reconstruire en partie après la lésion et avec une régénération neuronale ; iii) l'intérêt de ce modèle dans l'étude des effets d'agents neuroprotecteurs au long cours, et notamment lors de ce travail de thèse les effets protecteurs associés à un traitement par le C16.

Mots clés : Neuroinflammation, AQ, HO-1, PKR, TSPO.

Résumé en anglais

Neuroinflammation plays a central role in the physiopathology of neurodegenerative diseases. Microglia cells, which are the brain macrophages, are the key effectors of this inflammation of cerebral tissues. Most of the time, chronic activation of microglial cells is associated with a deleterious evolution of these diseases. Indeed, pro-inflammatory cytokines and reactive oxygen species (ROS) released by the microglia have neurotoxic effects. So, neuroinflammation is an interesting target in the treatment of neurodegenerative diseases and new anti-inflammatory and neuroprotective molecules are developed. During this work, we evaluated the effects of molecules potentially anti-inflammatory and neuroprotective in an *in vivo* rat neuroinflammatory model by intrastriatal injection of quinolinic acid (QA), an agonist of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. QA induces hyperactivity of NMDA receptor leading to an excitotoxicity and neuronal death, associated with strong microglia activation. Two molecules have been used here: first, the hemin an inducer of the heme oxygenase 1 (HO-1) and secondly the C16, an antagonist of the protein kinase RNA activated (PKR). Hemin treatment worsed injury induced by QA injection and we showed the implication of free iron and ROS in this deleterious effect. C16 treatment in the same model exerts neuroprotective and anti-apoptotic effects associated with a decrease of pro-inflammatory cytokines and a significant protection of neurons in the striatum. Concurrently, we evaluated neuronal survival and microglia activation in our model until 90 days post-lesion. Results showed: i) the kinetic of the inflammatory phenomena; ii) the ability of cerebral tissue to recover a part of its integrity and; iii) the possibility to use this model in a long-time study of neuroprotective and anti-inflammatory drugs and specially, during this PhD work, the protective effects associated with the C16 treatment.

Keywords: Neuroinflammation, QA, HO-1, PKR, TSPO.

Liste des publications

Tronel C., Rochefort G.Y., Arlicot, N., Bodard S., Chalon S. and Antier D. (2013) Oxidative stress is related to the deleterious effects of heme oxygenase-1 in an in vivo neuroinflammatory rat model.

Oxidative Medicine and Cellular Longevity. *Volume 2013, Article ID 264935.*

Tronel C., Page G., Bodard S., Chalon S. and Antier D. (2013) The specific PKR inhibitor C16 prevents apoptosis and IL-1 β production in an acute rat brain inflammation model.

En révision mineure dans **Neurochemistry International** (10/13).

Arlicot N., **Tronel C.**, Bodard S., Garreau L., de la Crompe B., Vandeveld I., Guilloteau D., Antier D., Chalon S. Translocator Protein (18 kDa) mapping with [125I]-CLINDE in the quinolinic acid rat model for excitotoxicity: a longitudinal comparison to microglial activation, astrogliosis and neuronal death.

Soumis dans **Molecular Imaging** (10/13).

Abréviations

A β : Peptide A-beta

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

AP-1 : Protéine activatrice 1

APP : Amyloid protein precursor

AQ : Acide quinolinique

ARNdb : ARN double brin

aSyn : Alpha synucléine

ATP : Adénosine tri-phosphate

AVC : Accident vasculaire cérébral

BHE : Barrière hémato-encéphalique

CLINDE : 6-chloro-2-(4'iodophenyl)-3-(N, N-diethyl)-imidazo[1,2-a]pyridine-3-acetamide

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CO : Monoxyde de carbone

COX : Cyclo-oxygénase

DA : Dopamine

DFX : Déféroxamine

DHE : Dihydroéthidium

DNF : Dégénérescence neuro-fibrillaire

Fe²⁺ : Ions ferreux

H&E : Hématoxyline/Eosine

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HO : Hème oxygénase

IFN : Interféron

IL : Interleukine

i.p. : Intrapéritonéale

i.v. : Intraveineux

LPS : Lipopolysaccharide

MA : Maladie d'Alzheimer

MH : Maladie de Huntington

MMAP : Motifs moléculaires associés aux pathogènes

MMP : Métalloprotéases matricielles

MP : Maladie de Parkinson

NF-kB : Nuclear factor-kappa B

NMDA : N-méthyl-D-aspartique

NO : Monoxyde d'azote

NOS : Oxyde nitrique synthase

O₂⁻ : Ion superoxide

PKR : Protéine kinase activée par l'ARN

ROS : Espèces réactives dérivées de l'oxygène

SEP : Sclérose en plaques

SLA : Sclérose latérale amyotrophique

SNC : Substance noire compacta

SNC : Système nerveux central

TEMP : Tomographie d'émission monophotonique

TEP : Tomographie à émission de positons

TGF : Tumor growth factor

TLR : Récepteur Toll-like

TNF : Tumor necrosis factor

TSPO : Protéine translocatrice de 18 KDa

ZnPP : Zinc protoporphyrine

ZSV : Zone sous-ventriculaire

Table des matières

Remerciements	1
Résumé.....	6
Résumé en anglais	7
Liste des publications	8
Abréviations	9
Liste des figures.....	14
Liste des tableaux.....	15
Introduction.....	16
I. La Neuroinflammation	17
<i>I.1. Définition de la neuroinflammation.....</i>	<i>17</i>
<i>I.2. Les acteurs de la neuroinflammation.....</i>	<i>19</i>
<i>I.2.1. Les cellules microgliales</i>	<i>19</i>
I.2.1.a. Origine et distribution.....	19
I.2.1.b. Les fonctions de la microglie.....	21
I.2.1.c. L'activation des cellules microgliales	22
I.2.1.d. Les différents stades d'activation des cellules microgliales.....	25
I.2.1.e. Autres différences phénotypiques de la microglie	27
<i>I.2.2. Rôle des astrocytes dans la neuroinflammation</i>	<i>29</i>
<i>I.2.3. Rôle des neurones dans la neuroinflammation.....</i>	<i>32</i>
<i>I.3. La neuroinflammation : processus délétère ou bénéfique ?</i>	<i>32</i>
II. Neuroinflammation et maladies neurodégénératives.....	35
<i>II.1. La neuroinflammation dans la maladie d'Alzheimer</i>	<i>35</i>
II.1.1. Principaux éléments sur la maladie d'Alzheimer.....	35
II.1.2. Rôle de la neuroinflammation dans la maladie d'Alzheimer.....	36

II.2. La neuroinflammation dans la maladie de Parkinson.....	40
II.2.1. Principaux éléments sur la maladie de Parkinson.....	40
II.2.2. Rôle de la neuroinflammation dans la maladie de Parkinson	41
II.3. La neuroinflammation dans la maladie de Huntington.....	44
II.3.1. Principaux éléments sur la maladie de Huntington	44
II.3.2. Rôle de la neuroinflammation dans la maladie de Huntington	45
III. Stratégies thérapeutiques expérimentales ciblant la neuroinflammation ayant fait l'objet d'investigations.....	48
III.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens	48
III.2. Les inhibiteurs du TNF- α	50
III.3. La minocycline.....	52
III.4. La curcumine.....	54
III.5. Autres molécules étudiées	54
Objectifs de la thèse	57
I. Le modèle de neuroinflammation <i>in vivo</i>	58
II. Evaluation des effets de molécules potentiellement neuroprotectrices et anti-inflammatoires dans le modèle de lésion intrastriale à l'AQ.....	61
II.1. L'hémine, un inducteur de l'hème oxygénase 1	61
II.2. Le C16, un antagoniste de la PKR.....	64
III. Caractérisation cinétique du modèle de lésion intrastriale à l'AQ.....	67
Travaux de thèse	68
Présentation du modèle : Lésion intrastriale par injection d'acide quinolinique	69
Article 1	71
Introduction.....	72
Méthodes	73
Principaux résultats.....	74
Article 2	86

<i>Introduction.....</i>	<i>87</i>
<i>Matériels et méthodes</i>	<i>88</i>
<i>Principaux résultats.....</i>	<i>89</i>
Article 3	129
<i>Introduction.....</i>	<i>130</i>
<i>Matériels et méthodes</i>	<i>131</i>
<i>Principaux résultats.....</i>	<i>132</i>
Discussions	165
I. Induction de l'hème oxygénase 1 dans le modèle de neuroinflammation.....	166
II. Inhibition de la protéine kinase activée par l'ARN dans le modèle de neuroinflammation	171
III. Caractérisation cinétique du modèle de lésion intrastriatale.....	175
Conclusions sur le travail de thèse	180
Références bibliographiques.....	183

Liste des figures

Figure 1 : Origine différentielle des cellules microgliales et des macrophages et représentation des facteurs de croissance mis en jeu dans leur différenciation.

Figure 2 : Activation d'une cellule microgliale, du stade quiescent (faiblement ramifié) au stade amyboïde.

Figure 3 : Voies d'activation M1, M2a et M2c probables de la microglie en fonction des signaux d'activation reçus par les cellules et représentation des marqueurs phénotypiques exprimés par ces deux types cellulaires.

Figure 4 : Morphologie de cellules microgliales quiescentes chez des souris jeunes (2 mois) ou âgées (18 mois) et de cellules microgliales activées hyper-ramifiées.

Figure 5 : Morphologie de cellules microgliales quiescentes et sénescences.

Figure 6 : Représentation schématique de l'astrogliose en fonction de la sévérité de l'atteinte neuronale.

Figure 7 : Effets des facteurs sécrétés par la microglie activée sur la mort neuronale.

Figure 8 : Evénements conduisant à la mort neuronale dans la maladie d'Alzheimer.

Figure 9 : Impact de la neuroinflammation dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.

Figure 10 : Relations entre les différents événements physiopathologiques menant à la mort neuronale dans la maladie de Parkinson.

Figure 11 : Impact de la neuroinflammation dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson.

Figure 12 : Implication de la protéine htt mutée dans les événements menant à la mort neuronale dans la maladie de Huntington.

Figure 13 : Structure de l'etanercept.

Figure 14 : Mécanismes menant à la mort neuronale dans l'excitotoxicité.

Figure 15 : Catabolisme de l'hème par l'hème oxygénase.

Figure 16 : Structure de l'hémine.

Figure 17 : Voies d'activation de PKR via la fixation d'ARNdb ou le clivage et la libération du site catalytique par les caspases.

Figure 18 : Structure du composé oxindole/imidazole C16.

Figure 19 : Emplacement de la lésion stéréotaxique.

Liste des tableaux

Tableau I : Principales cytokines pro-inflammatoires (en bleu) et anti-inflammatoires (en vert) retrouvées au niveau central.

Tableau II : Exemple de composés induisant l'activation des cellules microgliales.

Tableau III : Essais cliniques utilisant des AINS menés sur des patients MA et utilisant des AINS spécifiques (noir) ou non (bleu) de la COX-2.

Introduction

I. La Neuroinflammation

Dans les années 20, Shirai (1921) puis Murphy (1926) furent les premiers à observer que des greffes allogéniques dans le cerveau de souris survivaient longtemps et sans déclencher de réponse immunitaire de rejet, contrairement aux tissus greffés en périphérie. Ces expériences ont conduit à considérer le système nerveux central (SNC) comme un organe immunologiquement privilégié. En effet, le cerveau est protégé des interactions avec le système immunitaire périphérique par la barrière hémato-encéphalique (BHE). Il possède son propre système immunitaire impliquant principalement les cellules microgliales résidentes du cerveau (Perry and Gordon, 1988). Cependant, les cellules immunitaires périphériques et centrales possèdent des récepteurs et des ligands en commun leur permettant de communiquer entre elles (Blalock et al., 1985).

I.1. Définition de la neuroinflammation

La neuroinflammation est une réaction du SNC en réponse à une infection, une blessure ou un traumatisme. L'inflammation est une composante physiologique de l'immunité innée, opposée à l'immunité adaptative. Si l'immunité adaptative implique une réponse spécifique à un agent pathogène via les lymphocytes et plasmocytes sécrétant d'anticorps, l'immunité innée est un phénomène précoce qui implique une réaction identique à différents stimuli et va notamment provoquer une inflammation. Au niveau périphérique, les macrophages sont les principaux effecteurs de ce système immunitaire.

L'inflammation a pour but de neutraliser les pathogènes et de réparer les lésions afin de restaurer une homéostasie tissulaire. Les cellules effectrices vont notamment nettoyer les débris cellulaires et sécréter des cytokines dans le but de recruter de nouvelles cellules effectrices. Ce recrutement ainsi que la vasodilatation des vaisseaux le favorisant se traduisent en périphérie par une tuméfaction des tissus, caractéristique de l'inflammation.

Le cerveau possède son propre système immunitaire, mettant en jeu uniquement des effecteurs de l'immunité innée, qui seront détaillés ci-après. La boîte crânienne délimite un volume fixe, ce qui rend le SNC vulnérable à la tuméfaction induite par les phénomènes inflammatoires. La réponse inflammatoire non contrôlée peut donc s'avérer neurotoxique, ce

qui montre l'importance d'une régulation extrêmement efficace de ce phénomène (Quan and Banks, 2007).

Cytokines	Propriétés
IL-1α et β	Active des facteurs de transcription impliqués dans la réponse immunitaire (NF- κ B, AP-1), stimule la synthèse d'IL-6, de TNF- α et de NO
IL-2	Active la synthèse de NO, stimule la prolifération des cellules immunitaires
IL-6	Favorise la prolifération cellulaire et la production d'IFN, peut être neuroprotecteur ou neurotoxique en fonction du contexte
TNF-α	Stimule la production de cytokines pro-inflammatoires et l'expression du CMH, neuroprotecteur à faible concentration et neurotoxique à concentration élevée
IFN-γ	Favorise la phagocytose, l'expression de molécules de surface (CMH I et II...), la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs du complément
IL-4	Neuroprotecteur, immunosuppresseur, limite l'action de l'IL-1
IL-10	Neuroprotecteur, inhibe l'expression des CMH I et II et des cytokines et chémokines pro-inflammatoires
TGF-β	Neuroprotecteur, diminue la production de cytokines pro-inflammatoires et l'expresssion du CMH et des molécules de costimulation

Tableau I : Principales cytokines pro-inflammatoires (en bleu) et anti-inflammatoires (en vert) retrouvées au niveau central, d'après Baker et al., 2009 ; Hanisch, 2002 ; Smith et al., 2012.

NF- κ B : nuclear factor-kappa B ; *AP-1* : protéine activatrice 1 ; *NO* : monoxide d'azote ; *CMH* : Complexe Majeur d'Histocompatibilité ; *IFN* : Interféron ; *IL* : Interleukine ; *TGF* :Tumor Growth Factor ; *TNF* : Tumor Necrosis Factor.

La neuroinflammation se traduit par la sécrétion de différents facteurs dont la nature dépend du signal activateur. Ces facteurs comprennent diverses cytokines pro- ou anti-inflammatoires (interleukines (IL), chémokines...) mais également des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des facteurs du complément. Les cytokines les plus abondamment retrouvées au niveau du SNC, ainsi que leurs principales propriétés, sont résumées dans le tableau I.

Les ROS (superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)...) ainsi que le monoxyde d'azote (NO) sont sécrétée lors d'un épisode neuroinflammatoire en réponse à la présence de pathogènes. Cependant, ces éléments peuvent induire un stress oxydatif/nitrosatif s'avérant délétère. La cascade du complément peut être activée par différentes voies et peut aussi bien mener à la mort neuronale qu'à une neurogenèse en fonction du stimulus activateur et de l'environnement (Lettiero et al., 2012).

La neuroinflammation est donc la réponse immunitaire innée mise en jeu au niveau cérébral. Bien que des cellules du système périphérique infiltrant le SNC puissent participer à cette neuroinflammation, celle-ci est principalement due aux cellules immunitaires effectrices du cerveau.

I.2. Les acteurs de la neuroinflammation

I.2.1. Les cellules microgliales

Les cellules microgliales ont tout d'abord été identifiées par Nissl (1899), qui les a baptisées « cellules en bâton » et suggérait qu'elles puissent être capables de migration et de phagocytose. Mais c'est Pio del Rio-Hortega (1932) qui leur donna leur nom et qui permit une avancée dans la compréhension du rôle de ces cellules. En effet, ce dernier les définit déjà comme des cellules infiltrant le cerveau au cours du développement, possédant une morphologie ramifiée, qui évoluent après un événement pathologique, acquérant une morphologie amiboïde et la capacité de migrer, de proliférer et de phagocyter. Ces caractéristiques ont permis de les qualifier de macrophages du SNC. Ces éléments sont encore valides à l'heure actuelle, bien que la connaissance des cellules microgliales se soit bien entendu étoffée.

I.2.1.a. Origine et distribution

L'origine des cellules microgliales a longtemps fait débat. Aujourd'hui, il est admis que ces cellules dérivent de progéniteurs périphériques d'origine mésodermique-mésenchymateuse formés dans le sac vitellin. Ces progéniteurs migrent dans le SNC dans les temps précoces du développement fœtal (Chan et al., 2007) (figure 1). Bien que les cellules microgliales soient considérées comme les macrophages du cerveau, leur origine est différente puisque les macrophages apparaissent plus tardivement et dérivent de la moelle

osseuse. Cependant, ces deux types cellulaires nécessitent les mêmes facteurs pour proliférer et se différencier (CSF-1 (colony stimulating factor 1) notamment) et ont des récepteurs (CD11b, CD14...) et des fonctions communes.

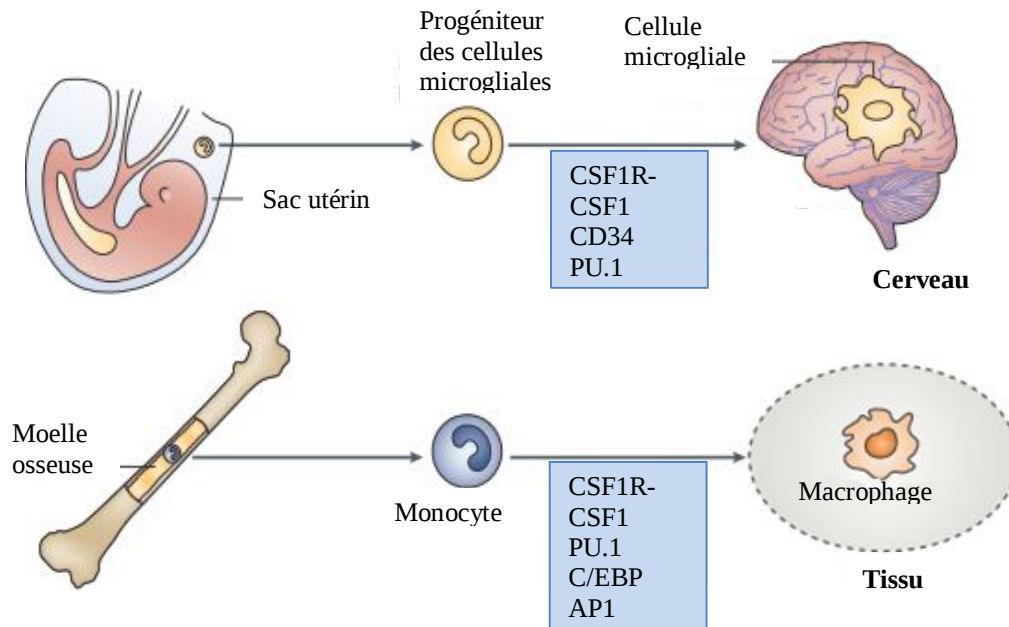


Figure 1 : Origine différentielle des cellules microgliales et des macrophages et représentation des facteurs de croissance mis en jeu dans leur différenciation, d'après Saijo and Glass, 2011.

Les cellules microgliales représentent 5 à 10% de la population cellulaire d'un cerveau adulte. Bien que ces cellules se retrouvent dans toutes les régions cérébrales, leur densité en conditions physiologiques peut varier très fortement, jusqu'à 5 fois plus dans certaines zones chez la souris, et 10 fois plus chez l'homme (Olah et al., 2011). Il y a également une différence de répartition entre les substances blanches et grises mais aussi en fonction de la présence de gaine de myéline axonale. Ainsi, les cellules microgliales sont plus nombreuses dans la substance blanche que dans la grise et les zones myélinisées du cerveau ont une densité de cellules microgliales plus élevée que les zones non myélinisées de la même région (Lawson et al., 1990; Mittelbronn et al., 2001). Ces différences de répartition s'accompagnent de différences fonctionnelles. Par exemple la neurodégénérescence induite par injection de lipopolysaccharide (LPS) est associée avec une hausse de la densité de cellules microgliales qui diffère selon les régions cérébrales concernées (Pintado et al., 2011).

I.2.1.b. Les fonctions de la microglie

Les cellules microgliales ont principalement une fonction de défense du SNC qui nécessite leur activation (voir ci-après I.2.1.c.). Lors du développement embryonnaire, la microglie va également induire une synaptogenèse précoce via la sécrétion de facteurs de croissance (Hanisch and Kettenmann, 2007). Durant le développement prénatal plus tardif et en post-natal, la microglie participe à l'élagage synaptique. Ce phénomène en trois temps (adhésion, ingestion, phagocytose) permet de réguler le nombre de synapses cérébrales. Des défauts de cet élagage ont pour conséquence des modifications synaptiques (Paolicelli et al., 2011). Il est d'ailleurs envisagé que des dysfonctionnements des cellules microgliales soient responsables de désordres développementaux pouvant avoir des conséquences pathologiques telles que l'autisme ou la schizophrénie (Kettenmann et al., 2013).

La microglie, chez le rongeur adulte, semble également participer à la neurogenèse. Dans le cerveau de ces animaux, deux niches localisées dans la zone subventriculaire (ZSV) et dans le gyrus denté de l'hippocampe produisent de nouveaux neurones. L'implication de la microglie dans cette neurogenèse est cependant controversée. En effet, l'inflammation diminue la capacité des cellules souches de l'hippocampe de générer de nouveaux neurones, capacité qui peut être restaurée par des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (Monje et al., 2003). A l'inverse, les données *in vitro* indiquent que les cellules microgliales favorisent la neurogenèse. Le surnageant de culture de cellules microgliales sur des cellules souches favorise en effet la formation de neurosphères pluripotentes (Walton et al., 2006). De plus, l'induction de la neurogenèse dans l'hippocampe par un environnement enrichi est associée avec l'activation de la microglie ce qui conforte l'hypothèse de la contribution de la microglie à ce développement neuronal. Il a été montré chez la souris que la microglie participe également à l'intégration des nouveaux neurones dans les circuits existants dans l'hippocampe adulte, tout en éliminant les neurones apoptotiques par phagocytose (Sierra et al., 2010).

Des études ont montré que les cellules microgliales participaient également à la modulation de la plasticité synaptique. Ainsi le $\text{TNF-}\alpha$, cytokine pro-inflammatoire notamment sécrétée par la microglie contribue en conditions physiologiques à la régulation de l'homéostasie et de l'activité synaptique (Stellwagen and Malenka, 2006). La microglie va également sécréter des facteurs possédant des propriétés neurotrophiques ou neuroprotectives. Ces agents agissant sur les neurones ont été très étudiés en culture cellulaire. Parmi eux sont

retrouvés des facteurs trophiques (Brain derived neurotrophic factor) ou des neurotransmetteurs capables de moduler les fonctions synaptiques en influençant leur excitabilité, tel que le glutamate (Kettenmann et al., 2011; Kettenmann et al., 2013).

I.2.1.c. L'activation des cellules microgliales

La microglie dans le SNC mature et sain possède une morphologie ramifiée avec un petit soma et de fins prolongements cellulaires. Cet état correspond au stade de quiescence ou de surveillance de la microglie. La microglie quiescente a longtemps été considérée comme fonctionnellement dormante, étant donné qu'à ce stade elle exprime peu de molécules de surface (Kreutzberg, 1996). Cependant, des études *in vivo* sur des souris dont les cellules microgliales expriment la GFP ont montré que ces ramifications sont constamment en mouvement, permettant à la microglie d'interagir avec son environnement sans pour autant perturber les circuits neuronaux, ce qui lui permet d'acquérir rapidement un phénotype activé en cas d'atteinte cérébrale (Nimmerjahn et al., 2005). Les cellules microgliales explorent donc activement et en permanence leur environnement extracellulaire ainsi que les cellules voisines.

Toute perturbation ou perte de l'homéostasie cérébrale va conduire à l'activation de la microglie. Cette activation met en jeu des modifications de la morphologie, des gènes exprimés et des fonctions des cellules microgliales (Block et al., 2007; Hanisch and Kettenmann, 2007). De nombreux signaux sont capables d'induire l'activation de la microglie (cf. tableau II). Par exemple, les neurones endommagés vont relarguer de l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) et la chémokine motif ligand 10, qui vont respectivement attirer la microglie via des récepteurs purinergiques et le récepteur 3 des chémokines (Haynes et al., 2006; Rappert et al., 2004). Les cellules microgliales expriment également des récepteurs aux neurotransmetteurs, ce qui les rend sensibles à l'activité neuronale. Les conséquences de l'activation de ces récepteurs sur les cellules microgliales ne sont pas toutes décrites (Czeh et al., 2011). Cependant, il est notamment connu que la microglie exprime des récepteurs du glutamate et peut donc être activée par les phénomènes d'excitotoxicité (Pocock and Kettenmann, 2007).

Types de composés	Exemples
Protéines, ADN, ARN d'origine virale ou bactérienne	Agonistes des récepteurs de reconnaissance des pathogènes (LPS, flagelline, ARN double brin...)
Protéines endogènes anormales	Agrégats beta-amyloïdes, protéines prions
Complément	Facteurs du complément C1q, C5a
Anticorps	Différentes classes d'anticorps (IgA, IgM, IgG) présents dans les complexes immuns
Cytokines	Facteurs de stimulation (M-CSF, GM-CSF), IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ , TGF- β , TNF- α ...
Facteurs neurotrophiques	Neurotrophine 3, nerve growth factor (NGF)...
Composants plasmatiques	Albumine, thrombine ...
Autres protéines et peptides	Apolipoprotéine E, heat shock proteins (hsp60, hsp70), CD40L...
Ions	K ⁺ , Mn ²⁺
Autres composants	Canabinoïdes, céramide, hormones stéroïdiennes, vitamine D3, prostaglandine E2, mélatonine

Tableau II : Exemple de composés induisant l'activation des cellules microgliales, d'après Hanish and Kettenmann, 2007.

En tant que cellules du système immunitaire inné, les cellules microgliales expriment de très nombreux récepteurs de surface, entraînant leur activation par une grande diversité de stimuli. Les récepteurs de reconnaissance des pathogènes vont notamment reconnaître les motifs moléculaires associés aux pathogènes (MAMP). Ces derniers sont des molécules spécifiques à un groupe de pathogènes, et non à un seul pathogène en particulier. C'est le cas du LPS qui est caractéristique des bactéries gram négatif (Maeshima and Fernandez, 2013). Les cellules microgliales possèdent aussi de nombreux Toll Like Receptor (TLR), des récepteurs aux cytokines, chémokines et facteurs du complément, des récepteurs aux glucocorticoïdes, à la thrombine... (Kettenmann et al., 2011). Les TLR sont également

retrouvés chez les cellules du système immunitaire périphérique et vont notamment reconnaître les MMAP. Cependant, comme nous l'avons déjà évoqué, les cellules microgliales ne sont pas uniquement activées par des agents pathogènes, certains TLR pouvant reconnaître aussi bien des signaux endogènes qu'exogènes. Ainsi, le TLR4 répond au LPS mais également au fibrinogène ou aux fragments d'acide hyaluronique.

Au cours de son activation, la cellule microgliale subit des modifications phénotypiques. Ses ramifications vont dans un premier temps augmenter et épaissir, conduisant à une « hyper-ramification » puis les cellules vont acquérir un phénotype amyboïde (Czeh et al., 2011). La microglie en fin d'activation est phénotypiquement indifférenciable d'un macrophage périphérique (figure 2). Les cellules microgliales sont alors hautement mobiles et peuvent se déplacer sur les sites de lésion ou d'infection. Les cellules activées peuvent également proliférer, favorisant la restauration de l'homéostasie tissulaire.

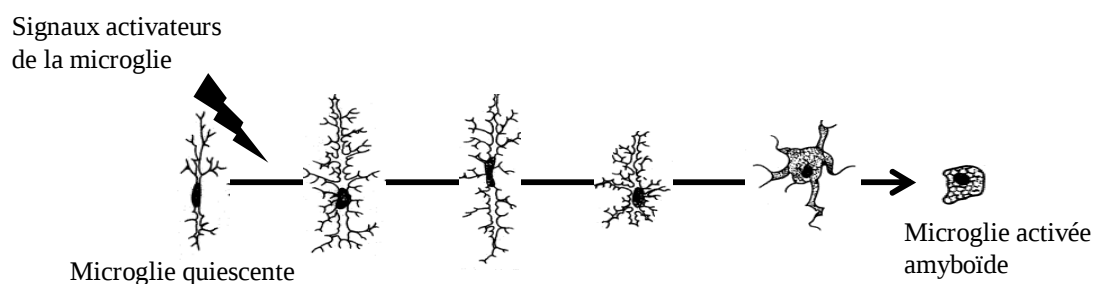


Figure 2 : Activation d'une cellule microgliale, du stade quiescent (faiblement ramifié) au stade amyboïde, d'après Kreutzberg, 1996.

Les fonctions des enzymes intracellulaires des cellules microgliales se modifient lors de l'activation, permettant à la microglie de sécréter des facteurs pro-inflammatoires et immunorégulateurs. Au stade amyboïde, les cellules microgliales ont également une activité de phagocytose et peuvent ainsi nettoyer les débris cellulaires ou lutter contre les bactéries en cas d'infection. La microglie activée produit également des facteurs neurotrophiques et chemoattractants permettant de recruter des cellules immunitaires périphériques. Elles pourront alors activer les lymphocytes T infiltrants via leur fonction de cellules présentatrices d'antigènes. Ce recrutement du système immunitaire périphérique se fait typiquement dans les cas d'infections cérébrales, d'origine virale ou bactérienne (Colton and Wilcock, 2010; Hanisch and Kettenmann, 2007).

Cependant l'activation des cellules microgliales n'est pas un phénomène de type « tout ou rien ». Ces cellules activées peuvent en effet avoir différents stades fonctionnels, décrits ci-après (Carson et al., 2007; Hanisch and Kettenmann, 2007; Perry et al., 2007).

I.2.1.d. Les différents stades d'activation des cellules microgliales

Il est établi depuis plusieurs années que la réponse microgliale varie en fonction des stimuli menant à son activation (Ransohoff and Perry, 2009; Sanchez-Guajardo et al., 2010). En cas d'infection bactérienne, la microglie sécrète des facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α mais également des chémokines (CCL2, CXCL1...) qui vont recruter les cellules immunitaires périphériques (Hausler et al., 2002). En revanche, lorsque la microglie phagocyte des cellules apoptotiques ou des débris de myéline elle produit des facteurs anti-inflammatoires (IL-4, IL-10...) (Magnus et al., 2001).

La classification des différents types d'activation microgliale a été établie en se basant sur ce qui est observé chez les macrophages périphériques, autres cellules du système immunitaire inné. En effet, ceux-ci ont plusieurs phénotypes d'activation. Les macrophages M1 (voie classique), activés par exemple par le LPS ou l'IFN γ , vont avoir un profil pro-inflammatoire et libérer des facteurs cytotoxiques. Les M2 (voie alternative) retrouvés en réponse aux IL-4 et IL-13 vont limiter l'inflammation et favoriser la régénération tissulaire (Aguzzi et al., 2013). La voie M2 comporte plusieurs subdivisions : M2a, M2b et M2c. Les macrophages M2a participant à la résolution de l'inflammation sont induits par l'IL-13 et par l'IL-4 (Lyons et al., 2007). Les M2b sont activés par des agonistes des TLR, ils débarrassent le milieu extracellulaire des ROS et des dérivés du NO et sécrètent de l'IL-10. Les macrophages M2c induits par l'IL-10 sont en charge de la réparation tissulaire (Mantovani et al., 2004).

En culture, les cellules microgliales peuvent acquérir un phénotype d'activation classique (M1) lorsqu'elles sont en présence de LPS ou d'IFN- γ (Colton, 2009). Cependant, peu d'éléments sont connus concernant un phénotype d'activation alternatif M2, en comparaison avec les descriptions qui ont pu être faites des macrophages de ce type. Les sous-types M2a, M2b et M2c ne sont pas systématiquement retrouvés ou décrits dans la littérature en ce qui concerne les cellules microgliales. Il y a de grandes variations de réponse de la microglie à l'exposition aux IL-4 et IL-13. Par exemple, il a été montré que la

stimulation de microglie en culture par l'IL-4 va entraîner une surexpression des molécules CMH de classe II et l'expression du CD11c, conférant un phénotype « dendritique » et neuroprotecteur à la microglie (Butovsky et al., 2007). A l'inverse, l'injection d'IL-4 dans le cerveau de souris n'a produit aucun de ces deux effets (Gottfried-Blackmore et al., 2009).

La figure 3 montre les trois types d'activation de la microglie M1, M2a et M2c, les différents signaux menant à ces phénotypes d'activation ainsi que les caractéristiques phénotypiques permettant de les distinguer. Cependant, tous les auteurs ne s'accordent pas sur les marqueurs de ces cellules.

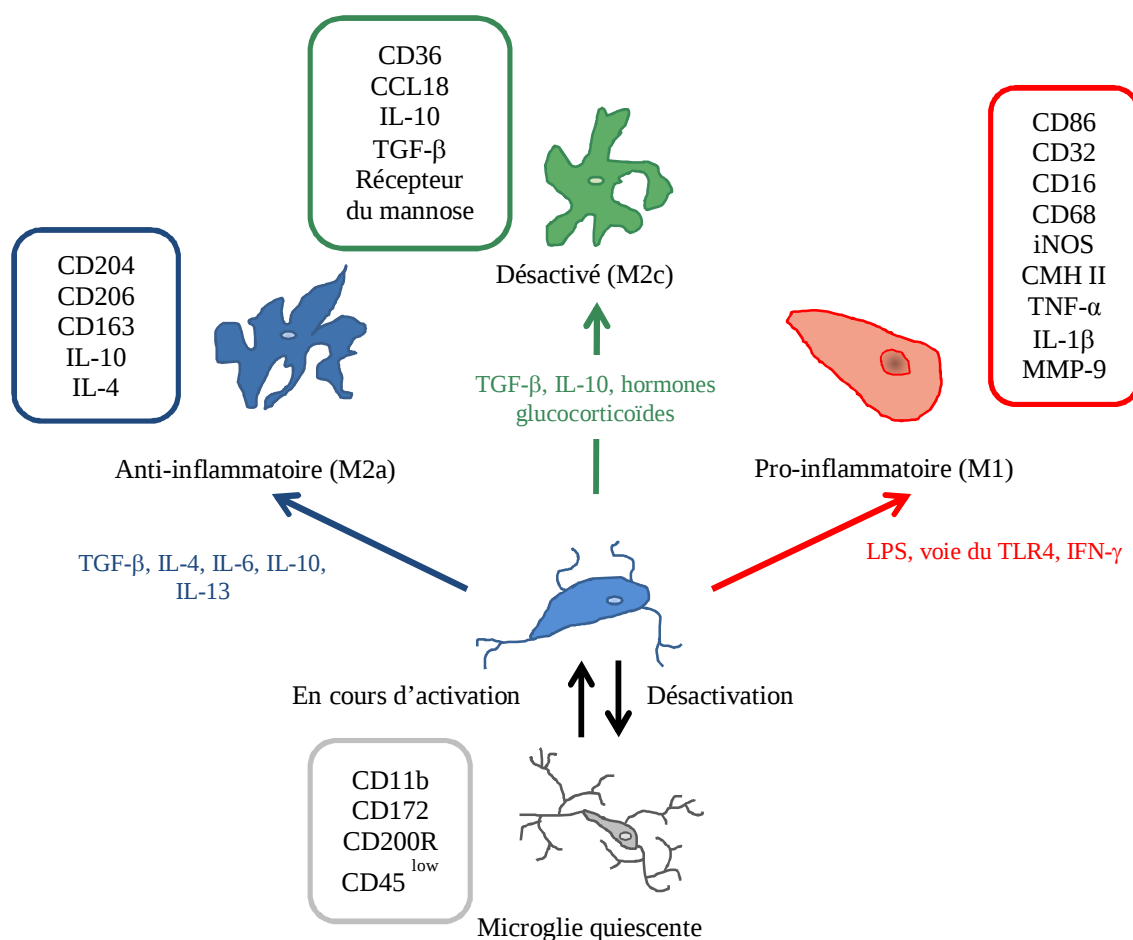


Figure 3 : Voies d'activation M1, M2a et M2c probables de la microglie en fonction des signaux d'activation et représentation des marqueurs phénotypiques exprimés par ces types cellulaires, d'après Chew et al., 2013; Varnum and Ikezu, 2012.

I.2.1.e. Autres différences phénotypiques de la microglie

Une hétérogénéité fonctionnelle des cellules microgliales en fonction des régions cérébrales est observée sur les plans morphologique, transcriptionnel, protéique et prolifératif (Ford et al., 1995; Ren et al., 1999). La microglie exprime différemment, par exemple, le récepteur immunorégulateur Tim-3 impliqué dans les interactions cellule-cellule, selon que l'on considère les matières grise ou blanche (Anderson et al., 2007). Les différences entre zones myélinisées ou non sont retrouvées pour d'autres protéines exprimées par la microglie (de Haas et al., 2008). Une étude de cytométrie en flux réalisée *ex-vivo* sur des cellules microgliales extraites de différentes zones cérébrales de souris a montré la grande variabilité des récepteurs de surface exprimés par la microglie. Ces différences peuvent influencer le développement, la fonctionnalité mais surtout la sensibilité à l'inflammation de ces régions (Hristova et al., 2010).

En plus des différences phénotypiques de la microglie observées selon les zones cérébrales considérées, ces cellules évoluent également durant le vieillissement, y compris le vieillissement non pathologique. De nombreuses études ont montré qu'avec l'âge la microglie acquiert une morphologie de type « activée », aussi bien chez les rongeurs que chez le singe ou l'homme. Les ramifications cellulaires de la microglie âgée sont plus courtes et plus épaisses que pour des cellules quiescentes classiques, leur conférant un phénotype de microglie réactive (figure 4) (Peters, 2002; Sierra et al., 2007).

Ces modifications morphologiques de la microglie dans le cerveau âgé s'accompagnent d'une augmentation de la production de médiateurs pro-inflammatoires. En culture, les cellules microgliales issues de souris âgées ont non seulement un niveau basal de TNF- α , IL1- β et IL-6 augmenté mais également une réaction plus rapide à la présence de LPS que les cellules microgliales issues de souris jeunes. Ceci suppose un pré-conditionnement de la microglie qui, pendant le vieillissement, montre une accélération de la réponse à un stimulus pro-inflammatoire (Sierra et al., 2007). Ces données suggèrent que lors du vieillissement la microglie atteint un stade pré-activé très réactif aux signaux inflammatoires. Le lien entre ce phénotype et la réponse plus rapide et plus forte de la microglie n'est toujours pas connu mais implique probablement une augmentation de l'expression des TLR et du CMH II (Harry, 2013; Letiembre et al., 2007).

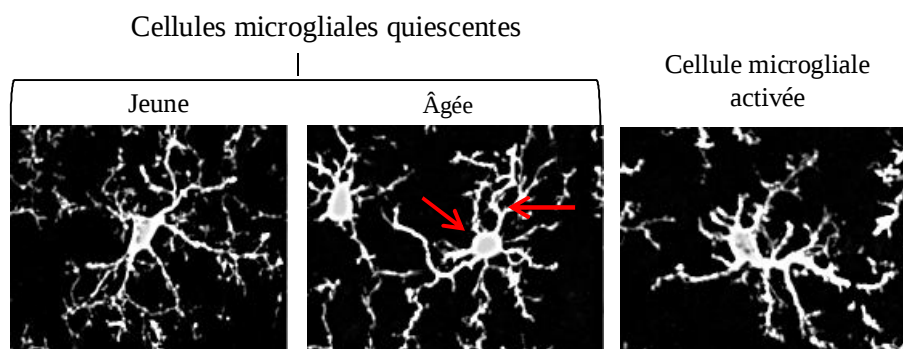


Figure 4 : Morphologie de cellules microgliales quiescentes chez des souris jeunes (2 mois) ou âgées (18 mois) et de cellules microgliales activées hyper-ramifiées. Les cellules quiescentes âgées sont morphologiquement à mi-chemin entre un état inactif et un état activé, avec des ramifications épaissies et un soma hypertrophié (flèches rouges) correspondant à un phénotype dit « réactif » ou « pré-activé ». Extrait de Sierra et al., 2007.

D'un autre côté, la microglie du SNC âgé a également été décrite chez l'animal avec des modifications morphologiques telles que la perte, le raccourcissement ou la fragmentation de ses processus cellulaires (figure 5). Ces changements sont différents des modifications observées pendant l'activation de la microglie, suggérant que ces cellules deviennent dystrophiques pendant le vieillissement. Cette microglie, en plus d'un phénotype anormal, a également une forte affinité pour la ferritine et un cytoplasme hypertrophié possédant de nombreuses vacuoles autophagiques (Lopes et al., 2008; Streit et al., 2004). Cela a conduit à formuler l'hypothèse que la microglie puisse devenir sénescence au cours du vieillissement. L'existence d'un tel phénotype sénescence impliquerait que la microglie âgée soit moins efficace pour participer à la protection cellulaire et au maintien de l'homéostasie du cerveau. Par conséquent, le SNC pourrait être plus susceptible de développer des pathologies et notamment des maladies neurodégénératives. Il a également été montré que la microglie âgée sécrète des niveaux réduits de facteurs neurotrophiques et a une activité phagocytaire diminuée, ce qui supporte cette hypothèse. Comme cela est décrit dans les maladies neurodégénératives, l'agrégation de protéines cytotoxiques et la mort neuronale rendent les fonctions de phagocytose et d'autophagie de la microglie nécessaires pour protéger le SNC. Dans ce contexte, la microglie sénescence aurait donc un impact particulièrement délétère puisque la perte d'efficacité de clairance des protéines déficientes, combinée avec la diminution de facteurs neurotrophiques pourrait participer à la mort neuronale (Streit et al., 2008).

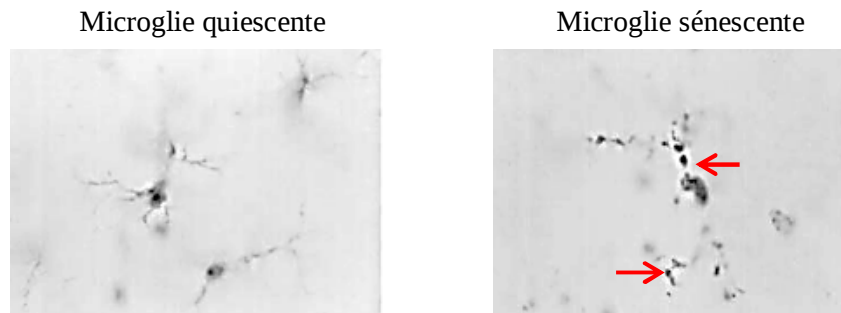


Figure 5 : Morphologie de cellules microgliales quiescentes et sénescents. Les cellules présentent des fragmentations de leurs ramifications (flèches rouges), extrait de Streit et al., 2009.

Ces deux phénotypes, hyperactif et sénescence, semblent être induits dans différentes circonstances au cours du vieillissement. Cependant, les mécanismes impliqués dans l'évolution des cellules microgliales lors du vieillissement demeurent largement méconnus. Une des hypothèses évoquées dans la sénescence des cellules microgliales est la dégradation de leur ADN due à leurs expositions aux ROS au cours du temps (Streit et al., 2008). Il est également possible que la sénescence soit une conséquence de la diminution des propriétés répliquatives de la microglie. En effet, une cellule microgliale peut être amenée à s'activer plusieurs fois, engageant donc plusieurs cycles de réplication et de mitose lors de son activation (Olah et al., 2011). Ce processus d'activation-réplication répété peut induire une sénescence répliquative, due à l'altération des télomères, l'atteinte de l'ADN et la perturbation de la chromatine. Il n'y a toutefois pas d'explication concernant le phénotype réactif de la microglie âgée.

Si les cellules microgliales sont les principaux acteurs de la neuroinflammation, elles ne sont cependant pas les seules à intervenir dans ce phénomène. Les astrocytes et, dans une plus faible mesure, les neurones, sont également impliqués.

1.2.2. Rôle des astrocytes dans la neuroinflammation

Les astrocytes sont les cellules les plus nombreuses dans le cerveau des mammifères et forment, avec les oligodendrocytes et la microglie, la glie du SNC qui permet de soutenir et de nourrir les neurones. Les astrocytes sont impliqués dans de nombreux processus dont notamment le développement et la maintenance de la BHE, le couplage neurovasculaire,

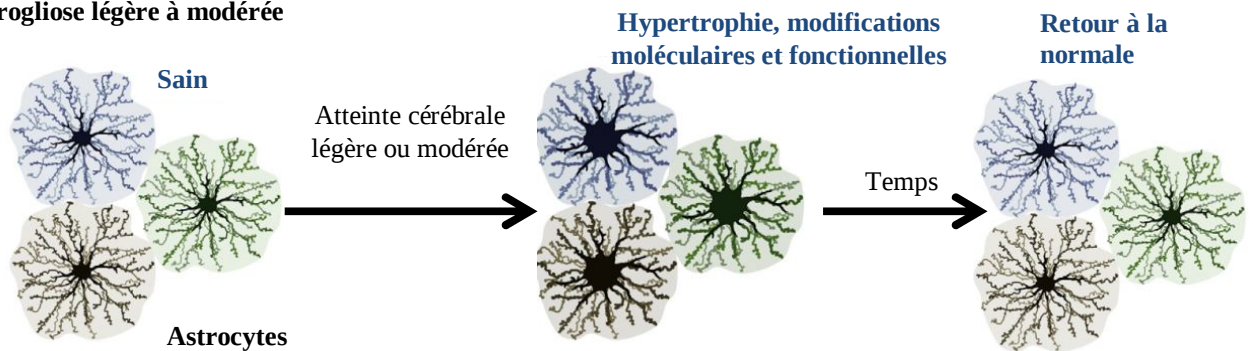
l'attraction de cellules périphériques via le relargage de chemokines, le maintien de l'équilibre potassique et du métabolisme général du SNC, le contrôle du pH cérébral, la recapture du glutamate et la sécrétion d'antioxydants (Kimelberg and Nedergaard, 2010; Parpura et al., 2011).

Lors d'atteintes cérébrales (stress oxydatif, neuroinflammation...), les fonctions astrocytaires peuvent être déficientes de façon transitoire ou prolongée, ce qui influe sur le fonctionnement neuronal et peut notamment participer à la physiopathologie des maladies neurodégénératives (Hamby and Sofroniew, 2010). En effet, les neurones ont des capacités antioxydantes limitées, ce qui les rend particulièrement sensibles au stress oxydatif et fait intervenir le couplage métabolique avec les astrocytes dans leur défense face à ce stress (Hamby and Sofroniew, 2010).

Les astrocytes vont répondre à différents stimuli (infection, ischémie, stress oxydatif...) par un processus nommé astrogliose qui implique des modifications moléculaires et morphologiques des astrocytes dont une augmentation de l'expression de la GFAP (protéine acide fibrillaire gliale), une hypertrophie du soma ainsi que des modifications des organites intracellulaires (dilatation du réticulum endoplasmique et des mitochondries) (Sun et al., 2010). Les astrocytes activés ont plusieurs fonctions : protection vis-à-vis du stress oxydatif par la production de glutathion, neuroprotection en relargant de l'adénosine et parfois sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α) et de ROS (Hamby and Sofroniew, 2010).

L'astrogliose est un phénomène complexe avec des modifications de l'expression des gènes qui vont dépendre du type de lésion et de la durée de celle-ci. Dans les premiers stades d'astrogliose, il y a une légère augmentation de l'expression de la GFAP associée à une hypertrophie astrocytaire sans prolifération. En cas de stimulation plus forte, tel un traumatisme, les astrocytes vont proliférer, ce qui s'accompagne d'une forte augmentation de l'expression de la GFAP, d'une sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et finalement de la formation d'une « barrière » mécanique autour de la lésion (Karimi-Abdolrezaee and Billakanti, 2012) (figure 6). Cette barrière perdure au cours du temps et permet de circonscrire la zone lésée et d'éviter ainsi la diffusion des facteurs inflammatoires qui y sont sécrétés mais a aussi comme conséquence de limiter la régénération axonale (Sofroniew, 2009).

a) Astroglie légère à modérée



b) Forte astroglie avec formation d'une barrière physique

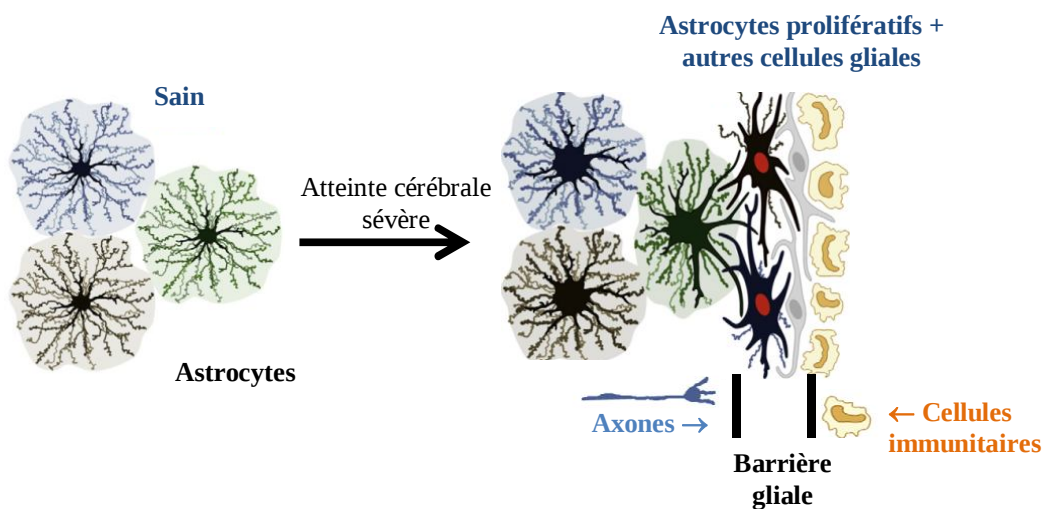


Figure 6 : Représentation schématique de l'astroglie en fonction de la sévérité de l'atteinte neuronale.

a) Astroglie légère à modérée avec un retour à la normale au cours du temps.

b) Astroglie sévère avec formation d'une barrière gliale qui contient des astrocytes réactifs mais également de nouveaux astrocytes prolifératifs recrutés sur le site de la lésion (noyau rouge).

D'après Sofroniew, 2009.

L'astroglie peut être aussi bien délétère que bénéfique pendant la récupération du SNC après une lésion. En effet, cette activation astrocytaire va permettre la reconstruction de la BHE, la régulation du débit sanguin via la sécrétion de vasoconstricteurs ainsi qu'une neuroprotection (Jarlestedt et al., 2010). Cependant dans des modèles d'ischémie cérébrale chez le rongeur, une diminution de l'astroglie s'accompagne d'une diminution du volume lésionnel, montrant que cette astroglie peut également s'avérer délétère (Barreto et al., 2011).

Il est intéressant de noter que, tout comme la microglie, les astrocytes subissent des modifications lors du vieillissement. Ils montrent notamment une augmentation du niveau d'expression de la GFAP (Salminen et al., 2011) qui leur confère un phénotype activé. Peu d'études ont décrit l'effet du vieillissement sur les astrocytes mais des inclusions intracytoplasmiques ont été retrouvées dans ces cellules âgées chez la souris (Sturrock, 1987) et, plus récemment, chez la souris, il a été montré que le vieillissement s'accompagnait dans les astrocytes d'une augmentation de la formation de superoxyde, de la peroxydation lipidique et de l'oxydation protéique (Garcia-Matas et al., 2008).

I.2.3. Rôle des neurones dans la neuroinflammation

Les neurones ont longtemps été considérés comme passifs lors des phénomènes de neuroinflammation. Cependant, des études ont montré que ces cellules sont elles aussi capables de produire des médiateurs inflammatoires (Heneka et al., 2010). En effet, les neurones, dans différents modèles animaux, peuvent sécréter des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α mais également des facteurs du complément (Gong et al., 1998; Hoozemans et al., 2004; Murphy et al., 1999). Il est donc probable que les neurones participent néanmoins à l'inflammation dans les maladies neurodégénératives. Les neurones semblent également capables de sécréter des dérivés du NO, étant donné que l'enzyme iNOS (inducible nitric oxide synthase) est exprimée par les neurones dégénératifs dans des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer (Heneka and Feinstein, 2001). Les neurones sont donc capables de sécréter du NO et des peroxy-nitrites, pouvant entraîner *in vitro* aussi bien qu'*in vivo* une dysfonction neuronale ainsi que la mort cellulaire (Boje and Arora, 1992; Heneka et al., 1998).

I.3. La neuroinflammation : processus délétère ou bénéfique ?

La neuroinflammation est un processus à double tranchant, pouvant s'avérer aussi bien protectrice et nécessaire que nocive. Les effets de la neuroinflammation dépendent du phénotype des cellules microgliales (M1 ou M2) mais également du maintien de la neuroinflammation dans le temps. La neuroinflammation aiguë est un mécanisme bénéfique et physiologique du système immunitaire cérébral qui intervient en réponse à la présence de

toxines ou de cellules nécrotiques. Dans ce cas, les cellules microgliales ont principalement une fonction de phagocytose tout en sécrétant des cytokines et chémokines pro-inflammatoires. Ce type d'inflammation est de courte durée. Ainsi, bien que dans ce cas la microglie puisse sécréter des ROS neurotoxiques, la régulation extrêmement fine de ce système permet un retour à la normale rapide et sans conséquences néfastes (Graeber and Streit, 2010).

Cependant, des stimuli prolongés de la microglie vont conduire à une neuroinflammation chronique associée avec des dégâts neuronaux. Dans cette situation les cellules microgliales vont non seulement être activées et proliférer mais aussi sécréter des cytokines pro-inflammatoires ainsi que des ROS et des dérivés du NO de façon non régulée. Or, la présence de ces facteurs sur le long terme dans le milieu extracellulaire va conduire à une mort neuronale, d'autant plus que les neurones sont particulièrement sensibles au stress oxydatif. Ces événements mènent à un « cercle vicieux » où la mort neuronale et la neuroinflammation s'entretiennent mutuellement (figure 7).

La neuroinflammation est donc un élément incontournable de la physiopathologie des maladies neurodégénératives où une mort neuronale chronique est observée (maladies d'Alzheimer, de Parkinson, d'Huntington qui seront détaillées dans la partie 2, mais aussi la sclérose en plaques, la sclérose latérale amyotrophique ou la maladie de Creutzfeldt-Jacob). De plus, la plupart de ces maladies sont caractérisées par l'expression de protéines malformées et/ou s'agrégeant, qui vont également pouvoir induire l'activation des cellules microgliales sur le long terme. Mais la neuroinflammation est également impliquée dans les atteintes plus aiguës du SNC, telles que les AVC ou les traumatismes crâniens. Enfin, les cellules microgliales vont également pouvoir recruter les cellules immunitaires du système périphérique, qui contribueront à la mort neuronale.

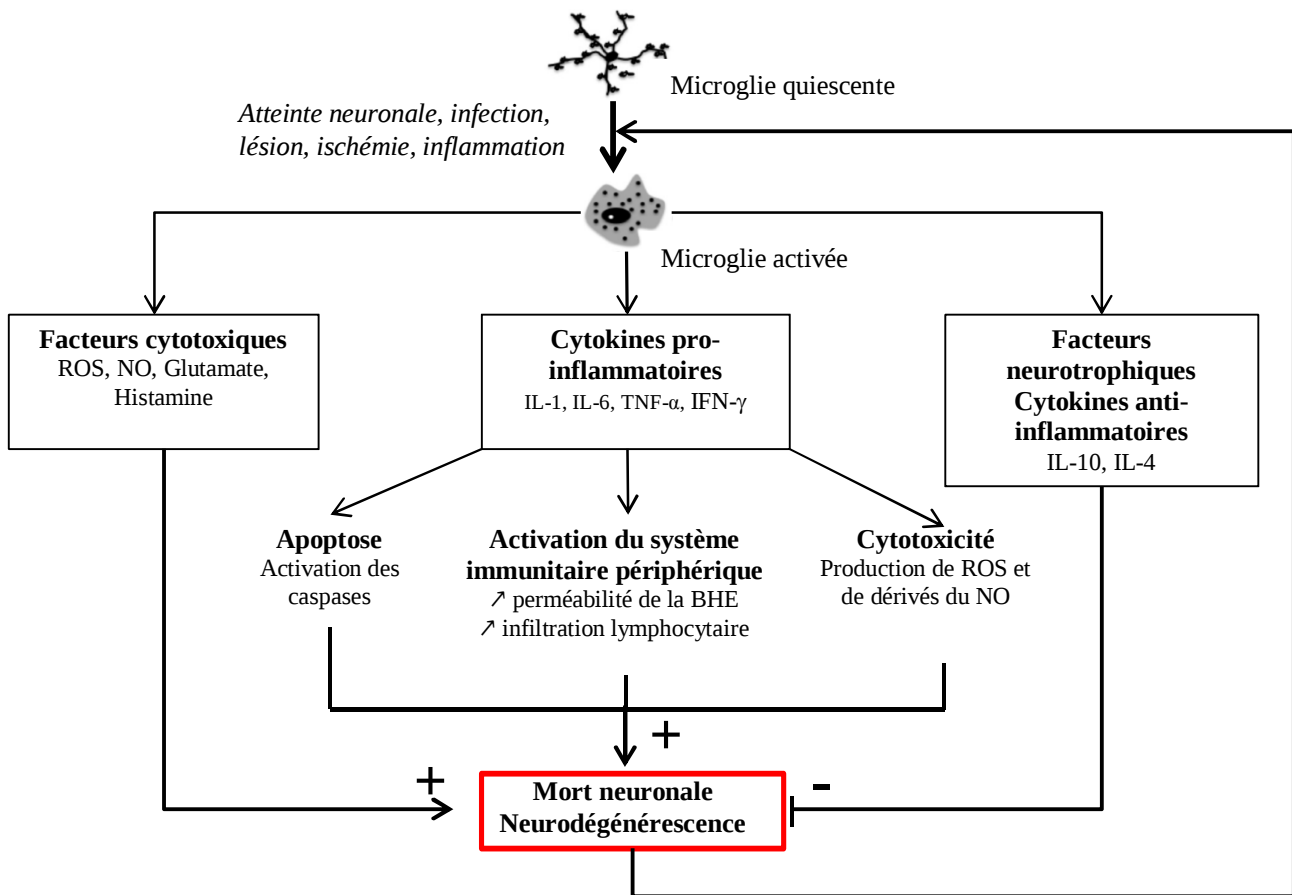


Figure 7 : Effets des facteurs sécrétés par la microglie activée sur la mort neuronale. La mort neuronale stimule l’activation microgliale et entraîne la formation d’un cercle vicieux où neuroinflammation et neurodégénérescence s’entretiennent mutuellement, d’après Smith et al., 2012.

Il existe des traitements pour ces maladies dégénératives, comme la L-DOPA, précurseur de la dopamine, qui va chez le sujet Parkinsonien permettre de compenser partiellement le déficit de transmission dopaminergique lié à la perte des neurones sécrétant ce neurotransmetteur. Cependant, il n’existe pas de traitement curatif pour ces maladies. Agir sur la neuroinflammation pourrait donc participer activement à la prise en charge thérapeutique des malades. Réguler l’inflammation cérébrale pourrait limiter l’atteinte neuronale provoquée par l’activation microgliale et ralentirait la progression de ces maladies. Cependant, une inhibition trop forte de ce système entraînerait la perte des effets bénéfiques de la réponse immunitaire cérébrale dont notamment la dégradation des cellules mortes et des protéines agrégées.

II. Neuroinflammation et maladies neurodégénératives

Dans les pays occidentaux, le vieillissement de la population est le corolaire de l'augmentation de l'incidence des maladies neurodégénératives pour lesquelles il n'existe pas de traitement curatif, les stratégies thérapeutiques actuelles visant à contenir les symptômes cliniques. Dans cette partie, nous nous intéresserons au rôle joué par la composante « neuroinflammation » intervenant dans plusieurs maladies neurodégénératives.

II.1. La neuroinflammation dans la maladie d'Alzheimer

II.1.1. Principaux éléments sur la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) a été identifiée en 1907 par le médecin Allemand Alois Alzheimer, chez une patiente avec démence et dont le cerveau analysé post-mortem, présentait des inclusions macroscopiques autour des neurones (Alzheimer et al., 1995). Aujourd'hui, la maladie d'Alzheimer est la démence la plus fréquente au monde, puisqu'elle représente plus de 75% des cas. D'après les estimations, 115 millions de personnes devraient souffrir de cette maladie d'ici 2050, ce qui en fait un enjeu majeur de santé publique (Reitz et al., 2011). Cette maladie est généralement diagnostiquée chez les sujets âgés de plus de 65 ans, bien qu'elle puisse se déclarer à un âge plus précoce. La MA est multifactorielle et l'étude de jumeaux ou de cas familiaux indiquent que les facteurs génétiques semblent impliqués dans environ 80% des cas (Tanzi, 2013).

La MA est une maladie chronique qui provoque une dégénérescence progressive des neurones corticaux conduisant à une perte des fonctions cognitives. Cliniquement, la maladie se définit par un déficit cognitif, une perte du langage et des aptitudes physiques, des changements comportementaux et une évolution vers la démence (Huang and Jiang, 2009). La maladie se caractérise par l'apparition de dépôts extracellulaires (plaques séniles ou amyloïdes) principalement composés de peptide beta amyloïde ($A\beta$) ainsi qu'une accumulation intracellulaire de dégénérescences neurofibrillaires (DNF) contenant notamment

la protéine tau hyper phosphorylée. Ces deux éléments conduisent progressivement à des dysfonctions synaptiques et une mort neuronale (Zhang et al., 2009) (figure 8).

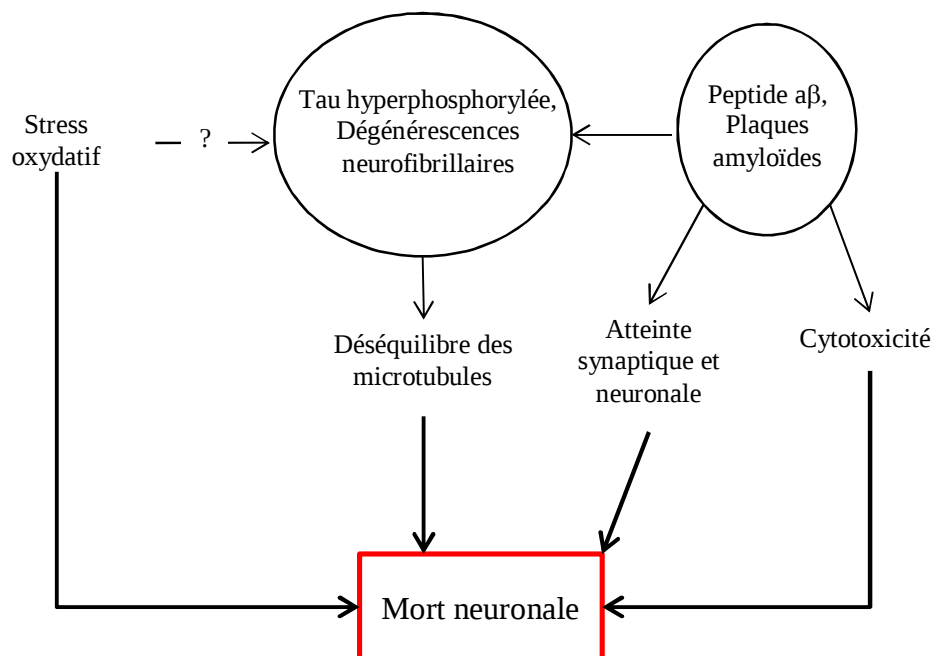


Figure 8 : Evènements conduisant à la mort neuronale dans la maladie d'Alzheimer, d'après Gimenez-Llort et al., 2007 ; Penke et al., 2012 et Reddy et al., 2012.

II.1.2. Rôle de la neuroinflammation dans la maladie d'Alzheimer

La MA est la première maladie neurodégénérative pour laquelle un lien avec l'inflammation du tissu cérébral a été établi (Block and Hong, 2005). De nombreux éléments montrent l'implication de la neuroinflammation dans la MA, notamment l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans le sérum et le tissu cérébral de patients MA par rapport à des témoins du même âge (Fillit et al., 1991; Varnum and Ikezu, 2012) ; l'augmentation du nombre de cellules microgliales activées au niveau des plaques séniles dans le cortex cérébral (Haga et al., 1989) ; la présence de peptide Aβ dans la microglie activée et les astrocytes (Ishii and Haga, 1992) mais également le fait que les consommateurs chroniques d'anti-inflammatoires pour des pathologies de type rhumatoïdes auraient un risque plus faible de déclarer la MA (Tang et al., 2011). Ces éléments ont conduit à considérer que la mort neuronale dans la MA n'est pas seulement due aux dépôts du peptide Aβ ou à l'accumulation de la protéine tau, mais aussi à la dérégulation de la réponse inflammatoire et de la réponse du cerveau au stress oxydatif (McGeer et al., 1994).

Plusieurs éléments intervenant dans la physiopathologie de la MA participent à la mise en place et au maintien de cette neuroinflammation. Le peptide A β est capable d'activer les voies apoptotiques et inflammatoires. Plusieurs types de peptides A β existent, différenciés et nommés en fonction du nombre d'acides aminés qui les composent (A β -40, A β -42 et A β -43). En culture de cellules microgliales, il a été montré que la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires diffère en fonction de la forme sous laquelle se trouve le peptide A β . Les plaques amyloïdes et le peptide A β -42 non dimérisé vont surtout entraîner la production d'IFN- γ , tandis que le peptide A β -40 stimule principalement la sécrétion d'IL-1 β (Lindberg et al., 2005). Les TLR2 et 4 semblent être les récepteurs impliqués dans la réponse des cellules microgliales au peptide A β (Broussard et al., 2012).

Cependant, il est également possible que ce ne soit pas seulement la nature même des peptides A β qui induisent une neuroinflammation. Plusieurs études émettent l'hypothèse que les oligomères A β sont capables de former des pseudo-canaux ioniques ne présentant qu'une faible spécificité au sein des membranes cellulaires (Kawahara et al., 2012; Wirths et al., 2004). De plus, les peptides A β peuvent également interagir avec des récepteur membranaires au calcium et induire des ruptures de la membrane cellulaire (Demuro et al., 2010). Ces événements, en perturbant le flux calcique des neurones et des cellules gliales induiraient une acidification transitoire du milieu extracellulaire, associée à une production de ROS (Abramov et al., 2004). De plus, l'acidose étant associée avec une augmentation du clivage de la protéine APP et de l'immunoréactivité d'A β , la formation de ces canaux pourrait participer à la mise en place de la neuroinflammation dans la MA (Kawahara et al., 2012).

Par ailleurs, les médiateurs de l'inflammation ainsi que le stress cellulaire vont en retour stimuler la production d'APP ainsi que son clivage et la sécrétion d'A β -42 tout en inhibant la formation de la forme soluble d'A β connue pour ses effets neuroprotecteurs (Misonou et al., 2000). Ainsi, le peptide A β stimule l'activation des cellules microgliales tandis que les facteurs pro-inflammatoires sécrétés par ces cellules contribuent à la libération de ce peptide. Ces événements conduisent donc à une neuroinflammation chronique qui s'auto-entretient (Lindberg et al., 2005) et contribuent aux dysfonctions neuronales et à la mort cellulaire (Rubio-Perez and Morillas-Ruiz, 2012).

De plus, la neuroinflammation est retrouvée de façon précoce dans des modèles animaux de taupathies (Yoshiyama et al., 2007). En effet, chez des souris surexprimant la

protéine tau humaine, la neuroinflammation précède la formation des DNF et le traitement par immunosuppresseur permet de diminuer la toxicité de la protéine tau et d'augmenter la durée de vie de ces souris. Ainsi, la protéine tau participe à l'activation de l'inflammation cérébrale qui pourrait jouer un rôle dans la formation des DNF.

Cependant, ce ne sont pas les seules conséquences de la neuroinflammation dans la MA. Il a en effet été montré chez les patients MA, ainsi que dans des modèles animaux de la maladie, que la neuroinflammation est associée à une diminution de la neurogénèse dans l'hippocampe, zone cérébrale impliquée dans l'apprentissage et la mémoire (Deng et al., 2009). De plus, la neuroinflammation participerait à l'hyperphosphorylation de la protéine tau, ce qui entraîne son agrégation et la formation des DNF (figure 9).

Ainsi, les fibrilles amyloïdes et les médiateurs pro-inflammatoires sécrétés par la microglie et les astrocytes contribuent à la dystrophie neuronale (Findeis, 2007). La microglie activée de façon chronique par les peptides A β va sécréter des facteurs neurotoxiques tels que des espèces réactives de l'oxygène (ROS), des oxydes nitriques (NO), des enzymes protéolytiques ou des facteurs du complément induisant une mort neuronale (Halliday et al., 2000). Cependant, la neuroinflammation dans la MA est représentative de la dualité de l'activation des cellules microgliales. En effet, les modèles animaux de la MA ainsi que la culture de cellules microgliales et macrophagiques extraites de patients montrent que le phénotype d'activation des cellules microgliales joue un rôle extrêmement important dans les conséquences de la neuroinflammation dans cette maladie. Les cellules activées de façon classique (M1) induisent une neuroinflammation et une diminution de la dégradation du peptide A β , tandis que les phénotypes de type M2 vont au contraire entraîner la dégradation de ce peptide (Varnum and Ikezu, 2012). Cependant, les événements conduisant à l'activation des cellules microgliales selon un phénotype M1 ou M2 dans la MA ne sont pas actuellement connus.

Etant donné la relation existant entre mort neuronale et neuroinflammation dans la MA, et donc l'implication de la neuroinflammation dans son évolution, cette dernière constitue un sujet d'étude important dans la recherche de nouveaux traitements. Même si des études de population ont rapporté un effet protecteur lié à la prise régulière d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les essais cliniques menés sur des patients MA avec ce type de molécules n'ont pas mis en évidence d'effet curatif. Par ailleurs, les traitements existants de la maladie vont ralentir sa progression sans pour autant permettre de restaurer ou même d'améliorer les fonctions cognitives (Broussard et al., 2012). De nombreux traitements visant à diminuer la neuroinflammation ont été étudiés sur des modèles animaux de la MA. Parmi ceux ayant montré de potentiels effets protecteurs, certains ont atteint le stade de l'étude clinique mais n'ont pas produit de résultat patent, notamment aux stades avancés de la maladie. Ces éléments seront développés dans la partie III

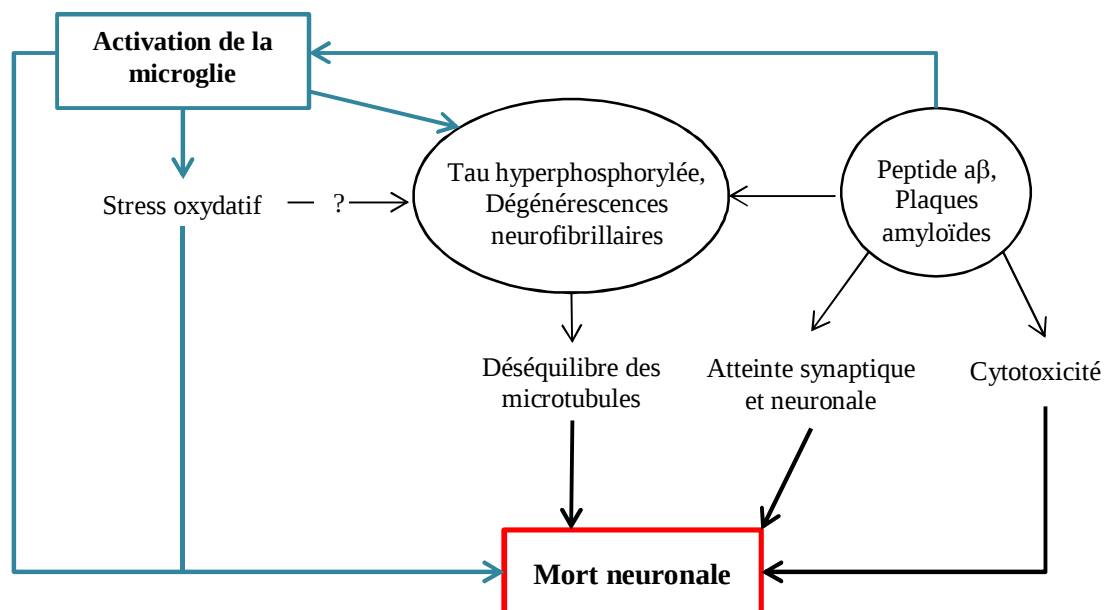


Figure 9 : Impact de la neuroinflammation dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, d'après Gimenez-Llort et al., 2007 et Reddy et al., 2012.

II.2. La neuroinflammation dans la maladie de Parkinson

II.2.1. Principaux éléments sur la maladie de Parkinson

En 1817, James Parkinson décrit un désordre neurologique se traduisant par un tremblement de repos et une perte progressive des fonctions motrices (Parkinson, 2002). Cette maladie fut ensuite rebaptisée maladie de Parkinson (MP) par Jean Martin Charcot en 1861. Aujourd'hui, dans les pays développés, la maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative chez les plus de 65 ans, après la MA. Les symptômes caractéristiques de cette maladie sont un tremblement de repos des extrémités, une bradykinésie, c'est-à-dire un ralentissement et une perte de finesse des mouvements, une instabilité posturale et des difficultés de déplacement, conduisant à une démarche mal assurée (Saiki et al., 2012). Comme la MA, la MP est multifactorielle bien qu'il existe des formes familiales et précoces de cette maladie.

La MP se définit par une mort des neurones dopaminergiques (DA) de la voie nigro-striée, c'est-à-dire des neurones de la substance noire pars compacta (SNc) dont les projections se trouvent dans le striatum. Cela entraîne une importante diminution de la concentration en dopamine dans le striatum, zone cérébrale impliquée dans le mouvement volontaire. Il a été montré que, lorsque les signes cliniques de la maladie apparaissent, 50 à 70% des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée sont déjà morts (Barzilai and Melamed, 2003). Cette mort cellulaire est induite par différents éléments : déficit d'activité et de dégradation des mitochondries (mitophagie), stress oxydatif et perte de fonction des systèmes de dégradation des protéines (protéasome et autophagie) participant à l'accumulation d' α -synucléine (aSyn) au sein des corps de Lewy (figure 10).

Etonnamment, des études récentes montrent que l'aSyn semble diffuser de neurone à neurone, suivant un mécanisme de propagation « prion-like ». En effet, des corps de Lewy contenant de l'aSyn ont été retrouvés dans des cellules embryonnaires dopaminergiques transplantées à des patients MP. Ce phénomène pourrait notamment expliquer la propagation de la maladie à différentes zones cérébrales au cours de son évolution, bien que les mécanismes mis en jeu ne soient pas encore connus (Angot et al., 2010).

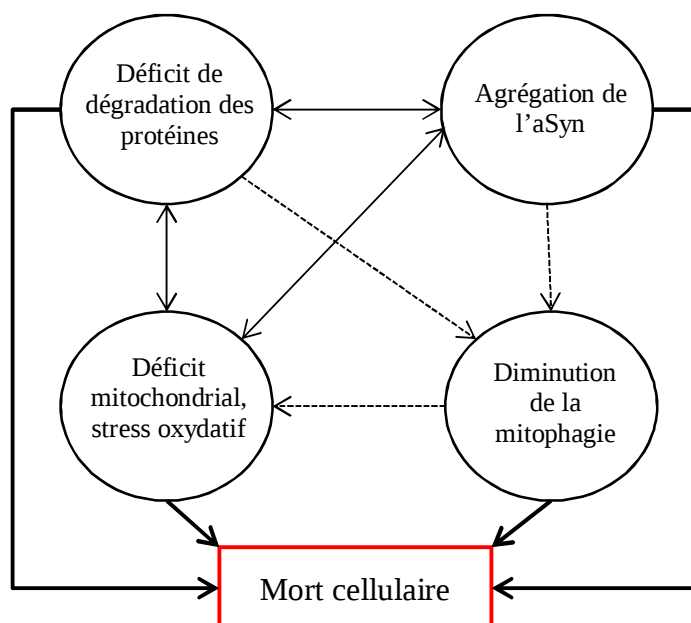


Figure 10 : Relations entre les différents événements physiopathologiques menant à la mort neuronale dans la maladie de Parkinson, d'après Valente et al., 2012.

II.2.2. Rôle de la neuroinflammation dans la maladie de Parkinson

Comme dans le cas de la MA, la neuroinflammation joue également un rôle important dans la physiopathologie de la MP. La neuroinflammation a d'abord été reliée à la MP car des cellules microgliales de phénotype activé ont été identifiées post-mortem dans des cerveaux de patients. Des études immunohistochimiques ont également mis en évidence la présence de microglie activée dans la substance noire de modèles animaux de la maladie (Qian et al., 2010). De plus, les niveaux de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6) et de ROS sont plus élevés dans les cerveaux et les lymphocytes périphériques de patients MP (Nagatsu et al., 2000). Des études d'imagerie *in vivo* chez des patients MP ont montré une augmentation de la neuroinflammation dans plusieurs zones cérébrales (striatum, cortex frontal...) par rapport aux individus témoins, et ce dès le début de la maladie (Gerhard et al., 2006). Chez les animaux modèles de la MP, la neuroinflammation apparaît avant même la mort des neurones DA (Halliday and Stevens, 2011). Au niveau épidémiologique, la consommation régulière d'AINS a été associée avec une diminution du risque d'apparition de la maladie (Hirsch et al., 2012). Tous ces éléments confirment l'importance du rôle de la neuroinflammation dans la MP.

La neuroinflammation pourrait d'ailleurs jouer un rôle plus important dans la MP que dans les autres maladies neurodégénératives. En effet, les neurones DA de la SNc atteints dans cette maladie sont particulièrement sensibles au stress oxydatif (Block et al., 2007). Etant donné que la densité de cellules microgliales dans la SNc est environ 4,5 fois plus importante que dans les autres régions cérébrales (Kim et al., 2000) et que ces cellules libèrent des ions superoxydes, leur activation peut donc s'avérer particulièrement délétère pour ces neurones. De plus, les neurones DA mourants libèrent dans le milieu extracellulaire de la neuromélanine qui active les cellules microgliales (Tansey and Goldberg, 2010). Le processus de neuroinflammation impliqué dans la mort neuronale peut ainsi s'auto-entretenir.

La protéine aSyn qui s'agrège dans la MP est également capable de stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires et de ROS par les cellules microgliales et ainsi de participer à la mort des neurones DA (Fujita et al., 2013). L'IL-1 β sécrétée par les cellules microgliales activées peut également participer à la stimulation de l'expression de l'aSyn (Phani et al., 2012). Ainsi, dans la MP le lien entre neuroinflammation et physiopathologie est très étroit. Cependant, dans cette maladie les mécanismes inflammatoires n'impliquent pas seulement la microglie, mais aussi le système inflammatoire périphérique. En effet, des études menées ces dernières années ont montré l'importance de l'immunité innée mais aussi adaptative dans la physiopathologie de la MP (Benner et al., 2008; Olson and Miller, 2004). Chez les patients MP, la perméabilité de la BHE est altérée et la neuroinflammation observée est probablement due en partie à une infiltration des cellules immunitaires périphériques (Kortekaas et al., 2005). Ainsi, des lymphocytes T infiltrants ont été retrouvés dans la SNc de patients MP et de souris modèles de la maladie (Miklossy et al., 2006). De plus, l'aSyn pourrait participer au recrutement des lymphocytes périphériques, induisant une réponse immunitaire adaptative qui va potentialiser l'activation de la microglie et exacerber la mort neuronale (Benner et al., 2008). Il semble cependant, dans un modèle de souris, que la microglie soit prédominante par rapport aux lymphocytes infiltrants (Depboylu et al., 2012). De plus, l'implication de l'inflammation périphérique dans la mort neuronale n'est pas claire, bien qu'elle semble pouvoir participer activement à la neurodégénérescence dans ce modèle animal (Benner et al., 2008).

La neuroinflammation contribue donc activement à la progression de la MP (figure 11). L'activation chronique de la microglie, comme dans la MA, va conduire à une neuroinflammation participant à la neurodégénérescence. Des thérapies anti-inflammatoires ont été développées dans des modèles animaux de la MP. Ces thérapies, ciblant la production

de ROS, l'activation de la NADPH oxydase ou la voie NFκB, ont montré l'importance du stress oxydatif provoqué par la microglie dans la maladie. Le NFκB est un facteur de transcription qui participe à l'expression de nombreuses cytokines inflammatoires, et notamment l'IL-6. Cependant, une meilleure compréhension de l'étiologie inflammatoire dans la MP ainsi qu'une analyse poussée de la signalisation moléculaire impliquée dans la réponse inflammatoire sont nécessaires pour identifier de nouvelles cibles afin de mettre au point des thérapies anti-inflammatoires utilisables en clinique dans le traitement de la MP.

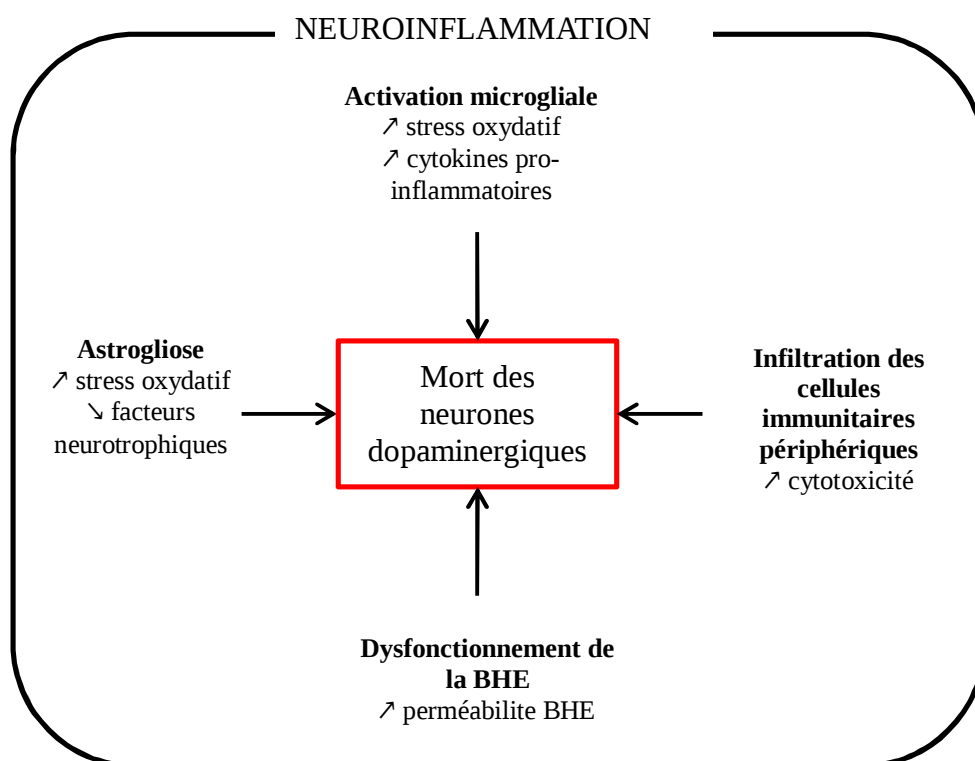


Figure 11 : Impact de la neuroinflammation dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson, d'après Chung et al., 2010.

II.3. La neuroinflammation dans la maladie de Huntington

II.3.1. Principaux éléments sur la maladie de Huntington

La maladie de Huntington (MH), autrefois appelée chorée de Huntington, a été mise en évidence pour la première fois en 1872 par George Huntington qui lui donna son nom (Huntington, 2003). Cette maladie neurodégénérative est caractérisée par une chorée, soit des mouvements irréguliers et incontrôlés, ainsi que des manifestations comportementales et psychiatriques conduisant à une démence (Pringsheim et al., 2012). La perte neuronale concerne principalement les régions corticales et striatales. La MH est une maladie génétique à transmission autosomale dominante avec une pénétrance âge-dépendante, présentant cependant de grandes variabilités dans l'âge d'apparition de la maladie et la manifestation des symptômes. Le gène muté est le gène Huntingtin (HTT), codant pour la protéine huntingtine (htt), dans le lequel un triplet de nucléotides CAG est répété, entraînant lors de la traduction protéique la formation d'une chaîne poly-glutamique (polyQ) responsable de la toxicité de htt mutée. Bien que la fonction précise de htt soit inconnue, cette protéine est impliquée dans le maintien du cytosquelette, le transport des mitochondries et également dans l'embryogénèse (Orr et al., 2008; Reiner et al., 2003).

La chaîne polyQ rend la htt mutée cytotoxique et induit non seulement son agrégation mais également celle d'autres protéines cellulaires, notamment des facteurs de transcription, ce qui induit l'inhibition de la transcription et de la traduction protéique et a par conséquent des effets délétères sur les fonctions et la viabilité cellulaires. De plus, la protéine htt mutée exerce une excitotoxicité et va également interagir avec les protéines axonales, entraîner leur agrégation et conduire à terme à un déficit du transport axonal. La MH est également associée avec des dysfonctions mitochondriales, une activation des récepteurs NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate) et une rupture de l'homéostasie calcique. Cependant l'implication de la protéine htt mutée n'est pas claire dans tous ces événements. Les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la MH sont résumés dans la figure 12.

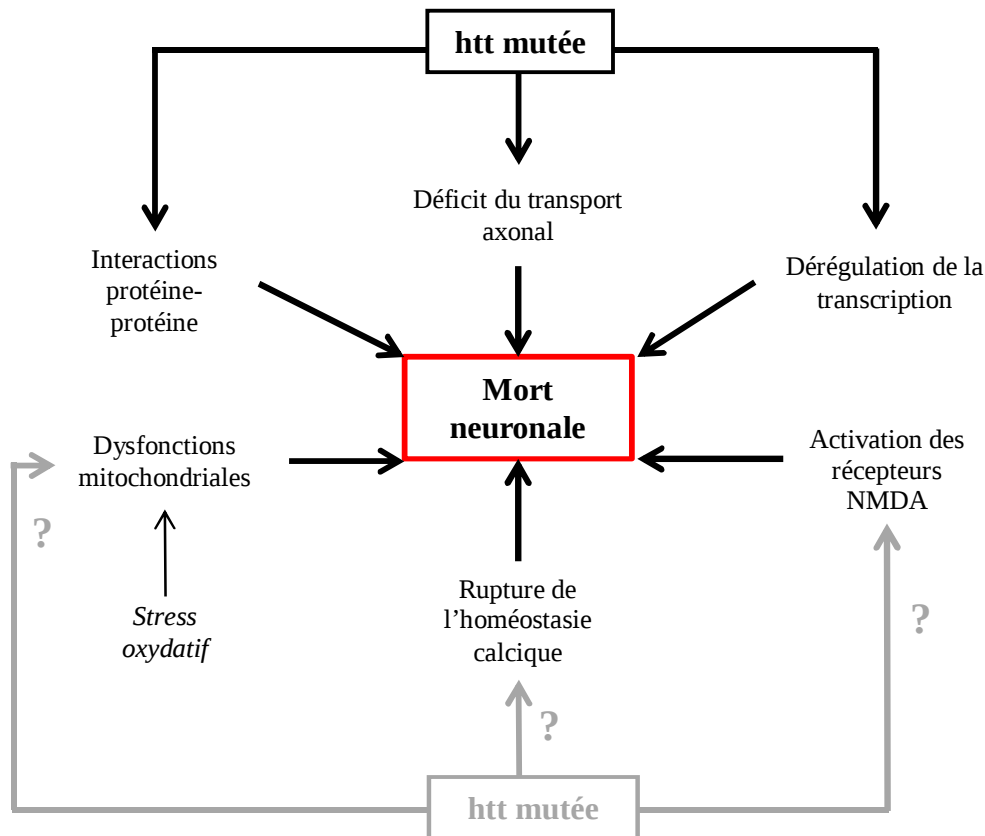


Figure 12.: Implication de la protéine htt mutée dans les événements menant à la mort neuronale dans la maladie de Huntington, d'après Reddy and Shirendeb, 2012.

II.3.2. Rôle de la neuroinflammation dans la maladie de Huntington

Bien que la neuroinflammation soit reconnue comme une composante physiopathologique des maladies neurodégénératives, son rôle dans la maladie de Huntington n'est exploré que depuis quelques années. Singhrao et al. (1999) furent les premiers à montrer des anomalies de la microglie dans la MH, dans une étude portant sur l'activation du complément. Peu de temps après, des études morphologiques de la microglie ont montré une activation de ces cellules dans le striatum, le cortex et la matière blanche de patients MH (Sapp et al., 2001). De plus, des études d'imagerie *in vivo* ont mis en évidence une activation microgliale proportionnelle au stade de gravité de la maladie et au degré de mort neuronale dans le striatum chez des patients MH (Pavese et al., 2006). L'immunohistochimie a également montré, dans des modèles animaux ou post-mortem chez les patients MH, des cellules microgliales exprimant la protéine htt mutée, qui forme également des agrégats dans

ces cellules (Simmons et al., 2007). La présence de ces agrégats suppose que la transcription pourrait être altérée dans la microglie, comme c'est le cas pour les neurones (Kuhn et al., 2007).

La microglie est également active dès le stade pré-symptomatique de la MH, des différences pouvant être détectées par rapport aux individus témoins dès 15 ans avant l'âge prédictif de début de la maladie (Tai et al., 2007). L'activation de la microglie a été également associée avec une forte probabilité de déclarer la maladie dans les 5 ans, ce qui suppose que la neuroinflammation est un événement précoce dans la physiopathologie de la MH (Moller, 2010).

Des médiateurs de la neuroinflammation sont également augmentés, certains uniquement dans le striatum des patients MH, tels que l'IL-1 β et le TNF α , tandis que d'autres (IL-6, IL-9 et métalloprotéase matricielle (MMP) 9) sont retrouvés également dans le cortex et le cervelet, régions pourtant épargnées par la maladie (Moller, 2010). Les cytokines pro-inflammatoires retrouvées dans le striatum pourraient être un signe de la maladie et de sa progression tandis que dans les autres structures leur sécrétion pourrait plus simplement être liée à la présence de htt mutée.

L'activation de la microglie peut être induite directement par les agrégats formés par la protéine htt mutée. En effet, en culture cellulaire de monocytes, macrophages ou microglie, la présence d'htt mutée est associée avec une sécrétion d'IL-6 (Bjorkqvist et al., 2008). Mais la libération des composants intracellulaires des neurones en apoptose mène également à une activation des cellules microgliales. Une implication de la réponse immunitaire adaptative via la migration de cellules présentatrices d'antigènes exprimant la protéine htt mutée dans les organes lymphoïdes secondaire et activant des lymphocytes T dirigés contre cette protéine est également envisageable (Nayak et al., 2011).

Par ailleurs, dans la MH, le système du complément est également impliqué dans la neuroinflammation. En effet, plusieurs facteurs de la cascade du complément sont exprimés dans le striatum de patients MH, au niveau des neurones, des astrocytes et de la myéline (Singhrao et al., 1999). Cependant, les éléments menant à l'activation du système du complément dans la MH ne sont pas clairement décrits. La protéine htt mutée pourrait activer ce complexe, conduisant notamment à la production de cytokines mais facilitant aussi l'infiltration des lymphocytes périphériques dans le SNC (Janssen et al., 2005).

La neuroinflammation fait l'objet de peu d'études en tant que cible potentielle dans le traitement de la MH, contrairement aux autres maladies neurodégénératives que nous avons citées précédemment. Cependant, des molécules montrant une efficacité dans des modèles de la MH telles que des inhibiteurs de l'histone déacétylase, ont montré des effets anti-inflammatoires et une influence sur la microglie (Giorgini et al., 2008; Suh et al., 2010; Thomas et al., 2008). Une étude récente a également mis en évidence que la régulation de la microglie via les récepteurs cannabinoïdes 2 joue sur la sensibilité cérébrale de souris modèles de la MH (Palazuelos et al., 2009).

Bien que dans cette partie n'ait détaillé que sur 3 maladies neurodégénératives, la neuroinflammation est également retrouvée dans les autres pathologies de ce type, notamment dans la sclérose en plaques (SEP) et la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Dans ces deux pathologies, les cellules microgliales interagissent avec des lymphocytes infiltrants et jouent leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes. Ainsi, les cellules microgliales peuvent également participer à l'activation des lymphocytes infiltrants tandis que ceux-ci vont orienter la réponse inflammatoire (M1 ou M2) de ces cellules cérébrales (Evans et al., 2013; Prinz-Hadad et al., 2013).

III. Stratégies thérapeutiques expérimentales ciblant la neuroinflammation ayant fait l'objet d'investigations

Comme nous l'avons vu dans la deuxième partie, la neuroinflammation est le point commun à toutes les maladies dégénératives et participe activement à leur progression. De plus, la neuroinflammation est également impliquée dans des atteintes aiguës du SNC, telles que les traumatismes crâniens ou les accidents vasculaires cérébraux (AVC). Ces éléments nous incitent à tester, en pré-clinique et en clinique, différentes molécules dans le but de diminuer la neuroinflammation et de pouvoir, à terme, améliorer la prise en charge thérapeutique des patients concernés.

III.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les individus ayant consommé des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sur de longues durées ont un risque diminué de développer les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Hirsch et al., 2012; Tang et al., 2011). Il est donc logique que des médicaments de cette classe aient été évalués dans le traitement de la neuroinflammation dans ces maladies, d'abord dans des modèles animaux puis lors d'essais cliniques. Les AINS sont des inhibiteurs des cyclo-oxygénases (COX) 1 et 2, enzymes assurant la production de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. La COX-1, enzyme constitutive, régule la cytoprotection gastrique et l'homéostasie vasculaire (Trepanier and Milgram, 2010). La COX-2 est impliquée dans l'inflammation et est induite par diverses cytokines, endotoxines, facteurs de croissance, mitogènes et hormones. La COX-2 est la cible des AINS de 2^{ème} génération ou coxibs, spécifiques de cette isoforme qui est rapidement exprimée en réponse à différents stimuli inflammatoires dans la majorité des tissus (O'Banion, 1999).

Dans le cerveau, les deux isoformes des COX sont exprimées de façon constitutive. En conditions physiologiques, la COX-1 est principalement retrouvée dans la microglie (Hoozemans et al., 2002) et la COX-2 au niveau des dendrites neuronales post-synaptiques

(Garcia-Bueno et al., 2009). Ces deux isoformes de la COX sont impliquées dans la neuroinflammation. Dans ce contexte, la COX-1 est particulièrement importante dans la première phase, tandis que la COX-2 participerait à la régulation et à l'arrêt de cette inflammation (Aid et al., 2010). En effet, l'inhibition de la COX-2 va aggraver la réponse neuroinflammatoire induite par le LPS chez le rongeur (Aid et al., 2010). Par ailleurs, la COX-2 est fortement exprimée dans le cerveau des patients MA et est associée à la présence des plaques amyloïdes, ce qui a confirmé l'intérêt de tester les AINS chez ces patients.

Concernant la MA, la plupart des études utilisant des AINS non sélectifs (Ibuprofène) sur des modèles animaux transgéniques ont montré des effets intéressants : diminution de l'agrégation du peptide A β et de la neuroinflammation (Lim et al., 2000; Lim et al., 2001). Cependant, ces effets n'ont pas été retrouvés avec les AINS sélectifs de la COX-2 (celecoxib) (Jantzen et al., 2002). Ces études ont précédé la réalisation d'essais cliniques étudiant les effets des AINS sur des patients MA. Des effets bénéfiques ont été rapportés dans les premières études menées sur un faible nombre de patients, ce qui a conduit à la réalisation d'essais cliniques de plus grande envergure. Cependant, aucun de ces essais utilisant des AINS sur de grands effectifs de patients MA n'a permis de conclure à un effet bénéfique significatif (Tableau III).

Comme pour la MA, la diminution de l'incidence de la MP chez les personnes traitées sur le long terme par des AINS a conduit à considérer ces médicaments comme un traitement potentiel de la neuroinflammation dans cette maladie (Esposito et al., 2007). Les études sur des cultures cellulaires ou des modèles animaux de la MP ont montré que les AINS ont un effet protecteur via l'inhibition des COX (Teismann and Ferger, 2001), une diminution de la neuroinflammation ainsi qu'une protection vis-à-vis des ROS et du NO (Maharaj et al., 2006). Cependant, bien que de nombreuses études aient été menées sur la prévention de la MP via l'utilisation d'AINS et que l'utilisation de ces médicaments ait montré des effets bénéfiques dans des modèles animaux, peu d'informations sont disponibles sur les effets des AINS en clinique, après le diagnostic de la maladie. Une étude de suivi *in vivo* de la neuroinflammation sur 14 patients MP traités avec le celecoxib, inhibiteur sélectif de la COX-2, rapporte cependant une augmentation de la neuroinflammation chez ces patients (Bartels and Leenders, 2010). Suite à l'échec de l'utilisation des AINS en clinique, d'autres molécules visant à diminuer la neuroinflammation ont été testées dans des modèles animaux de maladies neurodégénératives et certains ont atteint le stade des essais cliniques.

Molécules	Durée	Patients	Résultats	Références
Indométhacine	6 mois	44	Amélioration des fonctions cognitives	Rogers et al., 1993
Indométhacine	1 an	51	Ralentissement non significatif de la progression de la maladie	de Jong et al., 2008
Diclofénac	6 mois	41	Amélioration non significative des fonctions cognitives	Scharf et al., 1999
Nimésulfide	3 mois	40	Pas d'effet	Aisen et al., 2003
Acide acétylsalicylique	2 ans	310	Pas d'effet, effets indésirables notables (risque d'hémorragie)	Group et al., 2008
Célécoxib	1 an	425	Pas d'effet	Soininen et al., 2007
Rofécoxib	1 an	351	Pas d'effet	Aisen et al., 2003
Rofécoxib	1 an	692	Pas d'effet	Reines et al., 2004
Naproxène	1 an	351	Pas d'effet	Aisen et al., 2003
Ibuprofène	1 an	132	Pas d'effet	Pasqualetti et al., 2009

Tableau III : Essais cliniques utilisant des AINS menés sur des patients MA et utilisant des AINS spécifiques (coxibs, en noir) ou non (en bleu) de la COX-2, d'après Imbimbo, 2009.

III.2. Les inhibiteurs du TNF- α

Le TNF- α est une cytokine jouant un rôle important dans la régulation de l'homéostasie du SNC mais également dans diverses pathologies et est impliqué dans la réponse inflammatoire aiguë et chronique. Le TNF- α participe de façon prépondérante à l'inflammation cérébrale et est retrouvé dans la plupart des maladies neurodégénératives comme expliqué ci-après. Ainsi dans la MP, le TNF- α est exprimé par de nombreuses cellules gliales et par les neurones dopaminergiques de la SNc. La concentration de cette cytokine est également plus élevée dans le striatum et le liquide céphalo-rachidien des patients MP par rapport aux témoins (Boka et al., 1994; Mogi et al., 2000). Chez des patients MA, le TNF- α a été associé aux plaques amyloïdes en post-mortem et sa concentration dans le LCR et le

sérum de ces patients est augmentée (Paganelli et al., 2002). Ces données ainsi que d'autres similaires retrouvées dans la sclérose en plaques (SEP) ou la sclérose latérale amyotrophique (SLA) font de l'inhibition de cette cytokine pro-inflammatoire une cible de choix pour agir sur la neuroinflammation dans les maladies neurodégénératives.

Dans les années 90, l'utilisation de molécules bloquant le TNF- α , notamment via l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le TNF- α , a montré des effets protecteurs intéressants dans de nombreuses études sur des modèles animaux de la SEP, ce qui a conduit à la réalisation de deux essais cliniques. Cependant les résultats obtenus n'ont pas confirmé les données observées chez l'animal et l'utilisation de ces anti- TNF- α s'est soldée par une aggravation de la maladie chez les patients SEP (The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group, 1999 ; van Oosten et al., 1996).

Récemment, deux molécules ont été utilisées lors d'essais cliniques sur des patients atteints de maladies neurodégénératives dans le but de réduire la neuroinflammation : la thalidomide et l'étanercept. La thalidomide a été très utilisée dans les années 50 en tant qu'antiémétique prescrit aux femmes enceintes. Rapidement, une relation a été faite entre l'utilisation de ce médicament et des malformations congénitales graves, ce qui a conduit au retrait de la thalidomide du marché en 1961 (Klausner et al., 1996). Depuis, cette molécule a montré divers effets et notamment une inhibition de la synthèse du TNF- α , bien que le mode d'action de la thalidomide sur cette cytokine ne soit pas connu. La thalidomide ou ses dérivés (3,6'-dithiothalidomide, par exemple) ont depuis été utilisés dans plusieurs types de pathologies et notamment en tant qu'anticancéreux (Kumar and Chhibber, 2011).

La thalidomide et ses dérivés présentent l'avantage d'être de petites molécules capables de franchir la BHE. Après avoir montré un effet protecteur dans des modèles animaux de la MP (Boireau et al., 1997), la SLA (Kiaei et al., 2006) et la MA (Gabbita et al., 2012; Tweedie et al., 2012), la thalidomide a été utilisée dans un essai clinique de phase II chez des patients SLA. Cette étude n'a pas montré d'effets sur la production de cytokines des patients, ni d'amélioration de leurs symptômes. En revanche, de nombreux effets secondaires ont été déplorés, notamment au niveau cardiaque (Stommel et al., 2009).

La thalidomide n'a pour l'instant pas été utilisée dans d'autres essais cliniques concernant des maladies neurodégénératives. Cependant, il est intéressant de noter qu'une

étude de cas rapporte une forte aggravation des symptômes d'un patient MP ayant reçu de la thalidomide pour le traitement d'une myélofibrose (Crystal et al., 2009).

L'etanercept est une protéine de fusion recombinante composée de la partie extracellulaire de deux récepteurs humains du TNF- α , reliée à un fragment Fc d'anticorps IgG1 (figure 13). L'etanercept fixe le TNF- α , empêche ses interactions avec les récepteurs de surface et inhibe donc son effet biologique (Pugsley, 2001). Cependant l'etanercept est une grosse molécule de 150 kDa qui n'est pas apte au franchissement de la BHE. Son utilisation lors d'essais cliniques a été réalisée sur de petits groupes de patients MA et a nécessité une injection intra-spinale hebdomadaire pendant 6 mois. Ces essais ont montré une nette amélioration des fonctions cognitives des patients (Tobinick et al., 2006; Tobinick and Gross, 2008). L'etanercept n'a pas encore été testé dans d'autres maladies neurodégénératives, probablement car son mode d'administration intra-spinal complique fortement la mise en place d'un tel traitement.

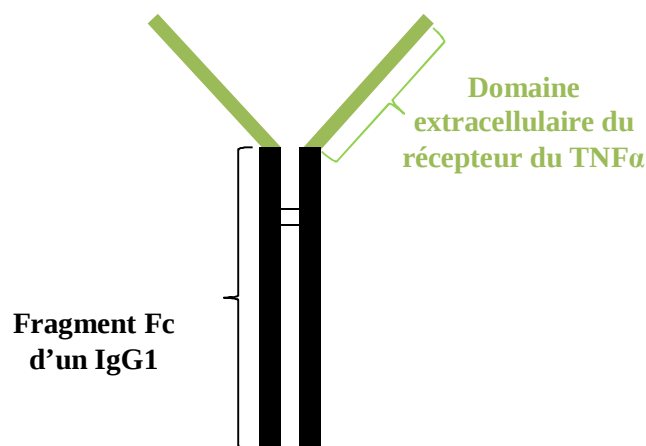


Figure 13 : Structure de l'etanercept, d'après Horiuchi et al., 2010.

III.3. La minocycline

La minocycline est un dérivé de seconde génération de l'antibiotique bactériostatique tétracycline et est principalement utilisée dans le traitement d'infections de la peau et des voies respiratoires. La minocycline a également montré des propriétés neuroprotectrices dans des modèles pré-cliniques de plusieurs maladies neurodégénératives. En effet, la minocycline a permis de diminuer la mort neuronale et de ralentir l'évolution de la maladie dans des modèles animaux de la MP, la MH, la MA et la SEP (Ferretti et al., 2012; Niimi et al., 2013;

Noble et al., 2009; Stirling et al., 2005). La minocycline induit différents effets et permet notamment de diminuer l'apoptose, le stress oxydatif et la neuroinflammation (Chen et al., 2000; Ryu and McLarnon, 2006). La minocycline favorise la différenciation en phase M2 des cellules microgliales en inhibant leur polarisation vers le stade M1 pro-inflammatoire, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Ce rôle sur la polarisation des cellules microgliales activées se ferait via l'inhibition du facteur de transcription NFκB (Kobayashi et al., 2013). Cependant, les autres mécanismes par lesquels la minocycline exerce ses effets anti-inflammatoires sont méconnus. Il semble qu'ils soient reliés à son action d'inhibition sur les matrix metalloproteases (MMP) 2 et 9 (Niimi et al., 2013). En effet, bien que leur rôle dans l'inflammation ne soit pas décrit, l'inhibition des MMP entraîne une diminution de l'inflammation (Hu et al., 2007).

Suite aux nombreux résultats bénéfiques obtenus en pré-clinique, la minocycline a donc été utilisée dans des essais cliniques concernant plusieurs maladies neurodégénératives. Chez des patients atteints d'atrophie multisystématisée, une maladie neurodégénérative dans laquelle une agrégation d'aSyn est retrouvée, un essai clinique de 48 semaines avec la minocycline n'a pas montré d'amélioration des patients. Cependant, la neuroinflammation a été suivie par Tomographie à Emission de Positons (TEP) chez quelques participants de l'essai et une diminution a été observée chez ceux ayant reçu la minocycline (Dodel et al., 2010).

Un essai clinique sur 400 patients SLA pendant 9 mois a conclu à un effet délétère de la minocycline, mais il est possible que cet effet soit dû à des interactions avec les autres médicaments pris par ces patients (Gordon et al., 2007a). La minocycline a également été testée chez 200 patients MP et cet essai clinique de phase II ouvre la perspective de l'utilisation de cet antibiotique dans un essai clinique de phase III (Investigators, 2006). Dans la MH, plusieurs essais cliniques utilisant la minocycline ont été menés. L'un, pilote et concernant 11 patients, a conclu à des effets bénéfiques et neuroprotecteurs de cet antibiotique (Bonelli et al., 2004). Un autre essai sur le long terme (5 ans) et mené sur une trentaine de patients a dû être interrompu en raison des effets secondaires observés. Un essai clinique de phase II réalisé sur 187 patients a conclu à une absence d'effet de la minocycline et préconise de ne pas poursuivre cet essai en phase III dans cette maladie (Huntington Study Group, 2010). Enfin, la minocycline a montré une amélioration des symptômes lors d'un essai clinique pilote mené chez 15 patients SEP (Zhang et al., 2008).

III.4. La curcumine

La curcumine possède des propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes et a également un rôle inhibiteur sur l'agrégation des protéines (Karlstetter et al., 2011). Les auteurs ont également montré que la curcumine module l'expression génique de cellules microgliales en culture et leur confère un phénotype anti-inflammatoire de type M2. Des études épidémiologiques sur des populations asiatiques ont par ailleurs montré que les sujets consommant régulièrement du curry, riche en curcumine, avaient de meilleurs scores lors de tests évaluant leurs fonctions cognitives que ceux en consommant rarement (Ng et al., 2006).

De nombreux essais pré-cliniques utilisant la curcumine ont été menés et ont montré des résultats prometteurs dans différents modèles de la MA, la MP et la MH (Frautschy et al., 2001; Hickey et al., 2012; Pan et al., 2008; Pandey et al., 2008). En effet, des améliorations des fonctions cognitives ainsi qu'une protection neuronale et une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires ont pu être observées. Ces résultats ont entraîné la mise en place d'un essai clinique de phase II de 6 mois chez une quarantaine de patients MA. Cest essai n'a pas conclu à un effet significatif de la curcumine sur les fonctions cognitives ou sur la concentration sérique de protéines A β . Cependant, l'absence de déclin des fonctions cognitives des patients du groupe placebo a pu masquer de potentiels effets bénéfiques de la curcumine et les auteurs recommandent un essai clinique de plus grande ampleur (Baum et al., 2008). A l'heure actuelle, deux autres essais cliniques seraient en cours sur des patients MA : l'un de phase II en Inde et le second aux USA, combinant la curcumine à la biopérine, un composé naturel dérivé du poivre noir (Monroy et al., 2013).

III.5. Autres molécules étudiées

Etant donné l'absence de résultats significatifs positifs obtenus lors des essais cliniques, de nombreuses études pré-cliniques sont menées dans le but d'améliorer les fonctions cognitives et de ralentir la progression de la maladie dans des modèles animaux de maladies neurodégénératives. Certaines d'entre elles utilisent des composés ayant des effets intéressants et prometteurs dans ces modèles animaux.

Chez des rats modèles de la MA, l'action du sulfure d'hydrogène a fortement diminué la production des cytokines pro-inflammatoires. Les auteurs ont par ailleurs montré que cet effet

anti-inflammatoire se faisait via une inhibition de la COX-2 et du NFκB. Ce facteur de transcription est d'ailleurs ciblé dans certaines études. Ainsi, l'inhibition du NFκB chez des souris modèles de la MP se traduit par une diminution de l'activation microgliale et une protection neuronale ainsi qu'une amélioration des fonctions motrices par rapport aux animaux ayant reçu le véhicule (Ghosh et al., 2007).

Récemment, le MW151, un composé hydrosoluble comportant un cycle pyridazine et un cycle pyrimidine, qui cible la production des cytokines pro-inflammatoires, a entraîné chez des souris transgéniques modèle de la MA une diminution des activations microgliales et astrocytaires ainsi qu'une amélioration des fonctions neurologiques, notamment via la conservation de la plasticité synaptique par rapport aux animaux non traités (Bachstetter et al., 2012).

La recherche se penche aussi sur des molécules naturelles présentes dans l'alimentation, comme la curcumine développée précédemment. Ainsi, le resvératrol, un polyphenol présent dans le raisin et la mûre, a montré des effets anti-inflammatoires dans un modèle de traumatisme cérébral chez la souris (Gatson et al., 2013). Les acides gras polyinsaturés ont également été associés à une diminution de la neuroinflammation et notamment des cytokines pro-inflammatoires dans de nombreux modèles animaux (Orr et al., 2013).

De nombreuses molécules possèdent donc des propriétés intéressantes sur la neuroinflammation en pré-clinique ou lors d'essais cliniques pilotes. Cependant, aucune n'a pu bénéficier pour l'instant d'une autorisation de mise sur le marché dans la prise en charge des maladies neurodégénératives. Mais la mise en place de tels traitements est particulièrement complexe. Les molécules utilisées doivent être capables de franchir la BHE pour agir au niveau cérébral. Etant donné les similitudes de régulation et d'activation entre les macrophages périphériques et les cellules microgliales, il est difficile de cibler la neuroinflammation sans induire d'effets sur le système immunitaire périphérique. De plus, dans les premiers stades des maladies neurodégénératives, l'activation microgliale permet d'éliminer les protéines agrégées qui sont fréquemment retrouvées (peptide Aβ dans la MA, αSyn dans la MP, htt dans la MH...) et est donc bénéfique. Ainsi, il faut non seulement développer des molécules ciblant spécifiquement la neuroinflammation, capables de passer la BHE, efficaces en pré-clinique, utilisables chez l'homme mais également réfléchir à la période la plus judicieuse à laquelle les administrer à des patients.

Par ailleurs, comme cela a été évoqué dans la première partie, la neuroinflammation est un phénomène à double tranchant, pouvant s'avérer aussi bien neuroprotecteur que neurotoxique. Il est d'ailleurs envisageable que l'absence d'effets bénéfiques des AINS lors d'essais cliniques soit due au fait qu'ils agissent sur les cellules immunitaires, quel que soit leur type d'activation (M1 ou M2). L'avenir du traitement de la neuroinflammation pourrait donc résider dans la mise au point de thérapeutiques ciblant la microglie activée de type pro-inflammatoire (M1) uniquement ou bien favorisant l'activation des cellules microgliales de type M2.

Objectifs de la thèse

La neuroinflammation est une composante commune aux maladies neurodégénératives et à ce titre elle est considérée depuis plusieurs années comme une cible thérapeutique intéressante pour la prise en charge de ces pathologies. Cependant, aucune molécule efficace en pré-clinique sur des modèles animaux de maladies neurodégénératives n'a montré d'effets bénéfiques significatifs au cours des essais cliniques. Ce constat nous incite à continuer la recherche de nouvelles thérapeutiques ciblant la neuroinflammation, ce qui constitue le sujet de cette thèse. Nous avons donc évalué les effets de deux molécules potentiellement neuroprotectrices et anti-inflammatoires dans un modèle de neuroinflammation *in vivo* chez le rat. Ce modèle expérimental validé au sein du laboratoire a lui-même fait l'objet d'explorations visant à accroître nos connaissances sur son évolution au long cours et notamment l'évolution de la neuroinflammation.

I. Le modèle de neuroinflammation *in vivo*

Les méthodes d'étude de la neuroinflammation *in vitro* ont montré leurs limites. En effet, bien que les cellules microgliales soient les principaux acteurs de ce phénomène, l'étude de ces cellules ne permet pas de recréer un véritable « environnement neuroinflammatoire ». Cette approche expérimentale nécessite la réalisation de co-cultures de cellules microgliales, d'astrocytes et de neurones mais elle ne permet pas de reproduire la complexité de l'environnement cérébral. Travailler *in vivo* présente donc l'avantage de pouvoir suivre les effets de la neuroinflammation directement sur le cerveau tout en prenant en compte le franchissement de la BHE qui est un des facteurs pouvant limiter l'action d'agents pharmacologiques sur la neuroinflammation.

Cependant, peu de modèles *in vivo* de neuroinflammation exploitables sont validés. La plupart des modèles animaux de maladies neurodégénératives développent une part de neuroinflammation mais celle-ci n'est cependant pas prépondérante. Le but de cette étude étant d'agir sur la neuroinflammation mais également de pouvoir suivre les effets d'une molécule potentiellement anti-inflammatoire et ses conséquences sur la neuroprotection, le modèle choisi devait donc comporter une forte composante neuroinflammatoire mais également une mort neuronale afin de pouvoir faire le lien entre inhibition de la neuroinflammation et neuroprotection.

Les modèles de neuroinflammation les plus utilisés sont l'induction d'une ischémie intracérébrale ou l'injection de lipopolysaccharide (LPS). Le modèle d'ischémie est principalement utilisé dans l'étude de la neuroinflammation dans le contexte des AVC. L'injection systémique de LPS va induire une neuroinflammation, bien que le franchissement de la BHE par cette molécule soit controversé (Banks and Robinson, 2010; Singh and Jiang, 2004). L'induction de la neuroinflammation dans ce cas impliquerait principalement un échange entre le système immunitaire périphérique et le SNC via le relargage d'éléments pro-inflammatoires traversant la BHE. Cette approche diverge cependant par rapport aux mécanismes décrits dans les maladies neurodégénératives (Qin et al., 2007). L'injection intracérébrale de LPS est également utilisée pour modéliser la neuroinflammation, cependant cette injection n'est pas toujours associée à une mort neuronale ce qui n'offre pas la possibilité d'étudier les effets anti-inflammatoires et neuroprotecteurs de molécules (Tanaka et al., 2006).

Le modèle de neuroinflammation *in vivo* choisi pour ce projet repose sur l'injection intrastriatiale d'acide quinolinique (AQ) chez le rat Wistar (protocole détaillé la partie Travaux de thèse). L'injection d'AQ induit une perte neuronale proche de celle observée dans la MH et cette injection intrastriatiale est à l'origine du premier modèle *in vivo* de la MH décrit par Schwarcz et Kohler en 1983. L'AQ est un agoniste des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) qui va entraîner leur hyperactivation, provoquant l'ouverture des canaux calciques et l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} . Cette augmentation intracellulaire de la concentration en ions calciques va induire une excitotoxicité caractérisée par l'activation des protéases, endonucléases et lipases qui vont participer à la dégradation de composants cellulaires et à la mort neuronale. Mais cette entrée massive de Ca^{2+} dans la cellule va aussi entraîner une surcharge calcique des mitochondries dont l'altération va provoquer un déficit de la production d'ATP (Nicholls, 2004). Le dernier élément intervenant dans l'excitotoxicité est la production de radicaux libres qui résulte des dysfonctionnements mitochondriaux (figure 14). Tous ces événements conduisent à une mort neuronale, associée à une activation massive de la microglie.

Le modèle d'injection intrastriatiale d'AQ a été préalablement validé au sein de l'unité INSERM U930 pour l'étude des effets de la neuroinflammation. Arlicot et al. (2008) ont montré une augmentation de l'expression de la protéine translocatrice de 18 kDa (TSPO), proportionnelle à la quantité d'AQ injectée dans ce modèle. La TSPO, préalablement connue sous le nom de récepteur périphérique aux benzodiazépines (Papadopoulos et al., 2006), est

une protéine multimérique associée avec un canal ionique voltage-dépendant et un transporteur d'ATP (McEnery, 1992). La TSPO est notamment connue pour intervenir dans le transport du cholestérol (Jamin et al., 2005), la synthèse d'hormones stéroïdiennes (Lacapere and Papadopoulos, 2003) et l'apoptose (Sutter et al., 2002). Cette protéine se situe dans la membrane externe des mitochondries et est distribuée dans la plupart des organes périphériques (rein, foie, cœur...). Dans le SNC, la TSPO est faiblement exprimée en conditions physiologiques et est retrouvée dans les cellules gliales (Benavides et al., 1983). L'activation microgliale est associée à une augmentation de l'expression de la TSPO dans ces cellules, faisant de cette protéine un marqueur intéressant de la neuroinflammation.

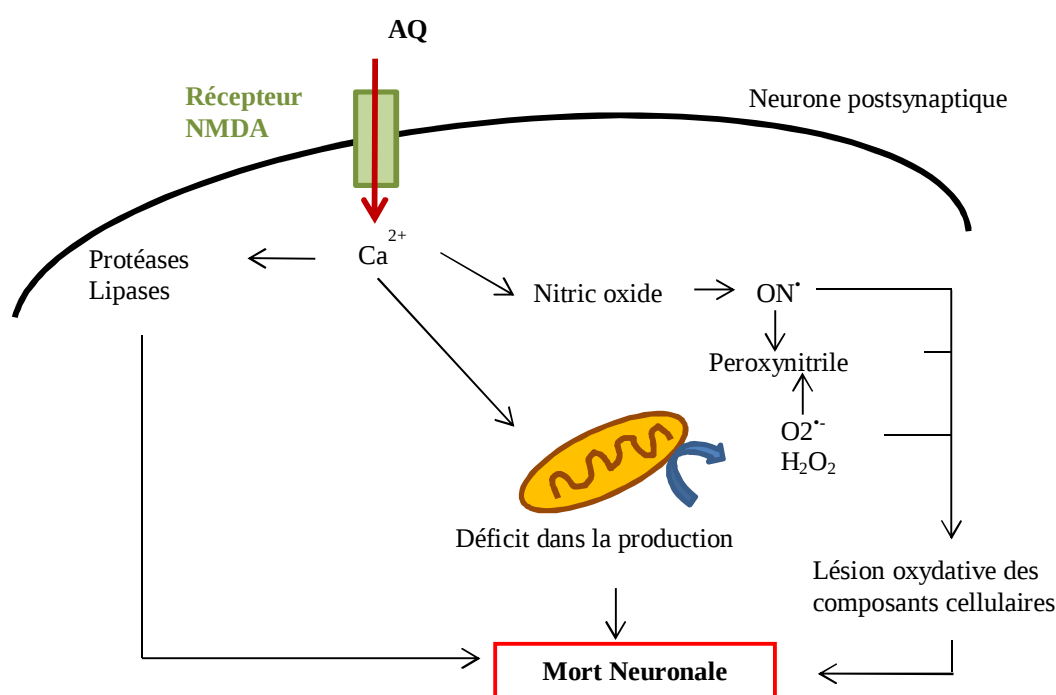


Figure 14. Mécanismes menant à la mort neuronale dans l'excitotoxicité, d'après Estrada Sanchez et al., 2008.

Ainsi, ce modèle d'injection intrastriale d'AQ entraîne une neuroinflammation importante associée à une mort neuronale et permettra donc de tester des traitements potentiellement anti-inflammatoires et neuroprotecteurs. C'est le travail qui a été effectué dans un premier temps et qui a concerné deux molécules dont les mécanismes d'action sont totalement différents.

II. Evaluation des effets de molécules potentiellement neuroprotectrices et anti-inflammatoires dans le modèle de lésion intrastriatale à l'AQ

Dans cette partie expérimentale du travail de thèse, nous avons testé deux molécules :

- l'hémine, un inducteur de l'hème oxygénase 1 (HO-1)
- le C16, un antagoniste de la protéine kinase activée par l'ARN (PKR).

II.1. L'hémine, un inducteur de l'hème oxygénase 1

L'hème oxygénase (HO) est une enzyme ubiquitaire responsable du catabolisme de l'hème qui libère du monoxyde de carbone (CO), des ions ferreux (Fe^{2+}) et de la biliverdine, rapidement transformée en bilirubine sous l'action de la biliverdine réductase (Kirkby and Adin, 2006) (figure 15). Ce système enzymatique a été très conservé au cours de l'évolution et il est connu pour son rôle protecteur en réponse au stress oxydatif.

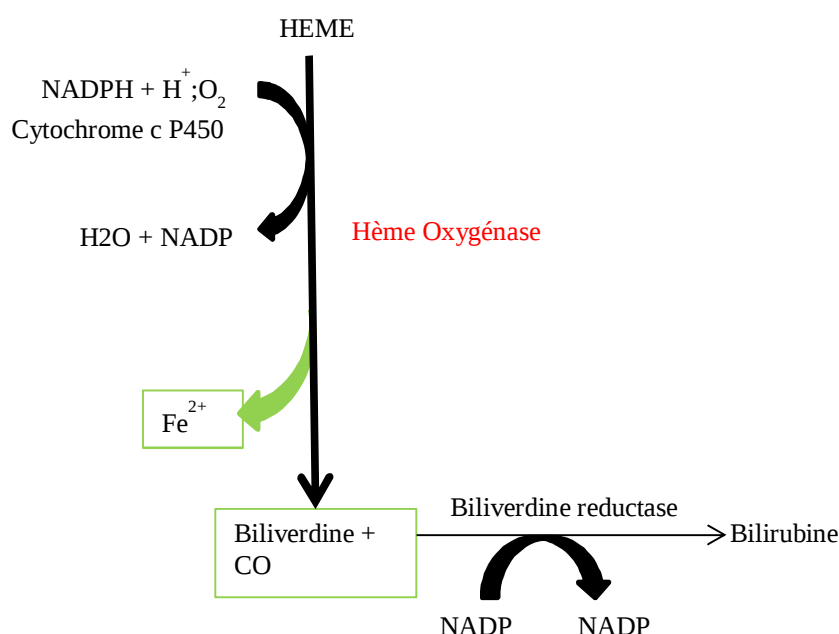


Figure 15 : Catabolisme de l'hème par l'hème oxygénase, d'après Jazwa and Cuadrado, 2010.

Il existe trois isoformes de la HO :

- la HO-1, codée par le gène Hmox1 situé sur le chromosome 22 chez l'homme et qui est une enzyme inductible surexprimée en réponse notamment à un stress oxydatif. Au niveau cérébral, HO-1 est principalement exprimée par les cellules microgliales bien qu'elle soit également retrouvée dans les neurones. De nombreuses molécules sont capables d'induire son expression et notamment l'hème à la fois inducteur et substrat, l'H₂O₂, la dopamine, l'IFN- γ ... Ces molécules peuvent agir sur la transcription, la traduction ou l'activité de la HO-1 (Syapin, 2008) ;

- la HO-2 codée par le gène Hmox2 (chromosome 16), est constitutive et ubiquitaire ;

- la HO-3 qui est un variant d'épissage de la HO-2 et qui n'est décrite que chez les rongeurs.

L'induction de la HO-1 a été associée à un effet anti-inflammatoire en rapport avec les propriétés des dérivés du catabolisme de l'hème. Ainsi, le CO est connu pour ses propriétés anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et anti-prolifératives (Wu and Wang, 2005). La biliverdine, mais surtout la bilirubine, présentent des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires largement décrites (Hayashi et al., 1999; Stocker et al., 1987). Le dernier élément libéré lors de la dégradation de l'hème est le fer, connu pour ses effets pro-oxydants (Halliwell and Gutteridge, 1997). Cependant, l'induction de la HO-1 a été associée à une surexpression de la ferritine (Nath et al., 1992), protéine ubiquitaire capable de séquestrer le fer libre intracellulaire et donc de limiter son action oxydative. De plus, la ferritine présente des capacités anti-oxydantes comparables à celles de la biliverdine et qui permettraient de compenser les effets dus à la libération de fer dans les conditions physiologiques (Balla et al., 1992). Ainsi, les produits de dégradation de l'hème sous l'action de la HO-1 présentent tous, directement ou non, des effets antioxydants ou anti-inflammatoires faisant de cette enzyme une cible très intéressante en théorie pour le traitement de la neuroinflammation.

Toutefois, les effets relatifs à l'induction de la HO-1 au niveau cérébral rapportés dans la littérature sont contradictoires *in vivo* comme *in vitro*. Ainsi, dans des cellules en culture soumises à une excitotoxicité induite par le glutamate, l'induction de HO-1 s'avère protectrice (Jeong et al., 2011) tandis que cette induction est associée à un effet délétère dans des cultures astrocytaires (Schipper, 2000). Les souris KO pour HO-1 montrent bien la dualité des effets associés à cette enzyme. En effet, ces souris vont être à la fois plus sensibles à

l'encéphalomyélite expérimentale (Chora et al., 2007) et plus résistantes à une hémorragie intracérébrale (Wang and Dore, 2007) par rapport aux souris wild-type.

Nous avons donc voulu savoir quels seraient les effets de l'induction de HO-1 dans notre modèle de neuroinflammation *in vivo*. Parmi les nombreux inducteurs de HO-1 disponibles nous avons retenu l'hémine (figure 16) qui possède une autorisation de mise sur le marché puisqu'elle est utilisée en clinique sous le nom de Normosang® dans le traitement des porphyries. En cas de résultats intéressants et neuroprotecteurs, l'étude chez l'homme des effets de l'hémine dans les pathologies neurodégénératives pourrait bénéficier du recul acquis et notamment des données de tolérance relatives à son utilisation actuelle en clinique.

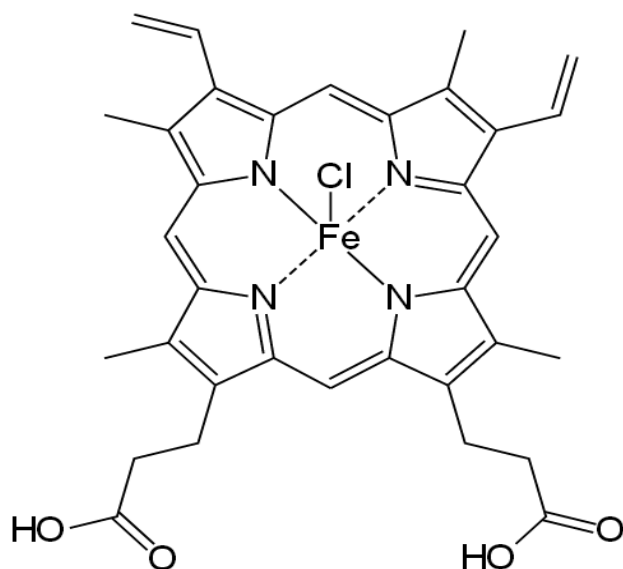


Figure 16 : Structure de l'hémine, extrait de Guo et al., 2011.

L'hémine est connue pour augmenter l'activité de la HO-1 (Yoshida et al., 1988) mais également pour son action positive sur sa synthèse protéique (Goldstein et al., 2003), agissant ainsi à la fois comme inducteur et substrat de l'enzyme. Les posologies (50 mg/kg) et le schéma d'administration (voie intrapéritonéale (i.p.) en chronique) de l'hémine retenus pour l'étude découlent des travaux de (Desbuard et al., 2007).

Le DMSO a été choisi pour la dissolution de l'hémine en raison de la solubilisation délicate de ce produit à pH neutre. La toxicité de ce solvant a déjà fait l'objet de publications et il apparaît que la dose létale 50 (DL50) en i.p. chez le rat est de 13 g/kg (Ali, 2001) soit 40

fois plus que les doses administrées au cours de notre travail. Par ailleurs, des études prêtent au DMSO un effet neuroprotecteur (Shimizu et al., 1997) mais l'utilisation d'une dose très faible couplée à la réalisation d'un groupe témoin uniquement traité par le solvant permettent de s'affranchir de ce biais.

Dans cette étude, nous nous sommes principalement intéressés à l'activation microgliale et à la survie neuronale. Or, les premiers résultats enregistrés ont montré que les lésions cérébrales consécutives à l'injection d'AQ chez les animaux traités par l'hémine étaient plus importantes que chez les animaux non traités. De nouvelles investigations visant à comprendre la nature des mécanismes délétères mis en jeu ont été menées. Le caractère précoce du développement des lésions et la sévérité de la destruction tissulaire dans notre modèle nous ont logiquement mis sur la piste d'une surproduction de ROS.

Par ailleurs, afin de nous assurer que les résultats observés étaient bien dus à l'induction de la HO-1, et non pas à l'hémine en elle-même, nous avons étudié un groupe d'animaux traités par l'hémine et le zinc protoporphyrin IX (ZnPP IX), un inhibiteur sélectif de l'activité de l'HO-1. La confirmation du rôle central joué par la HO-1 dans ce phénomène d'aggravation des lésions cérébrales et les effets délétères de l'induction de la HO-1 ayant été associés à la production de fer dans d'autres études, nous avons pu confirmer l'influence de cet élément via l'administration d'un chélateur du fer, la déféroxamine (DFX).

Ainsi, cette étude présentée dans l'article 1 nous a permis de mettre en évidence un effet délétère de l'induction de l'HO-1 dans notre modèle et dans les conditions d'administration retenues. Mais elle nous a surtout fait comprendre la mécanistique mise en jeu et les implications du fer et des ROS.

Suite à cette étude, une nouvelle molécule potentiellement neuroprotectrice et anti-inflammatoire a été testée : le dérivé oxindole/imidazole C16.

II.2. Le C16, un antagoniste de la PKR

La protéine kinase activée par l'ARN (PKR) est une kinase à sérine et thréonine, dont l'activation nécessite la phosphorylation de la thréonine 451 (Romano et al., 1998). Structuellement, la PKR est principalement composée de deux domaines de liaison à l'ARN double brin (ARNdb) et d'un site catalytique (KD) possédant plusieurs sites de

phosphorylation (Li et al., 2006). A l'état inactif, la PKR est repliée et le site catalytique n'est pas accessible. En cas d'activation par l'ARNdb, l'IFN- α ou des protéines d'activation de PKR, la protéine se déplie, ce qui expose le site catalytique (Singh and Patel, 2012). Ensuite, la PKR se dimérise, procède à une auto-phosphorylation et atteint ainsi son état activé (Ung et al., 2001). Cependant, une autre voie d'activation est possible. En effet, les caspases activées lors de l'apoptose vont pouvoir cliver la PKR et libérer le fragment catalytique qui est capable de s'auto-phosphoryler et d'avoir la même fonctionnalité que la PKR dans sa configuration complète (Saelens et al., 2001; Suen et al., 2003) (figure 17).

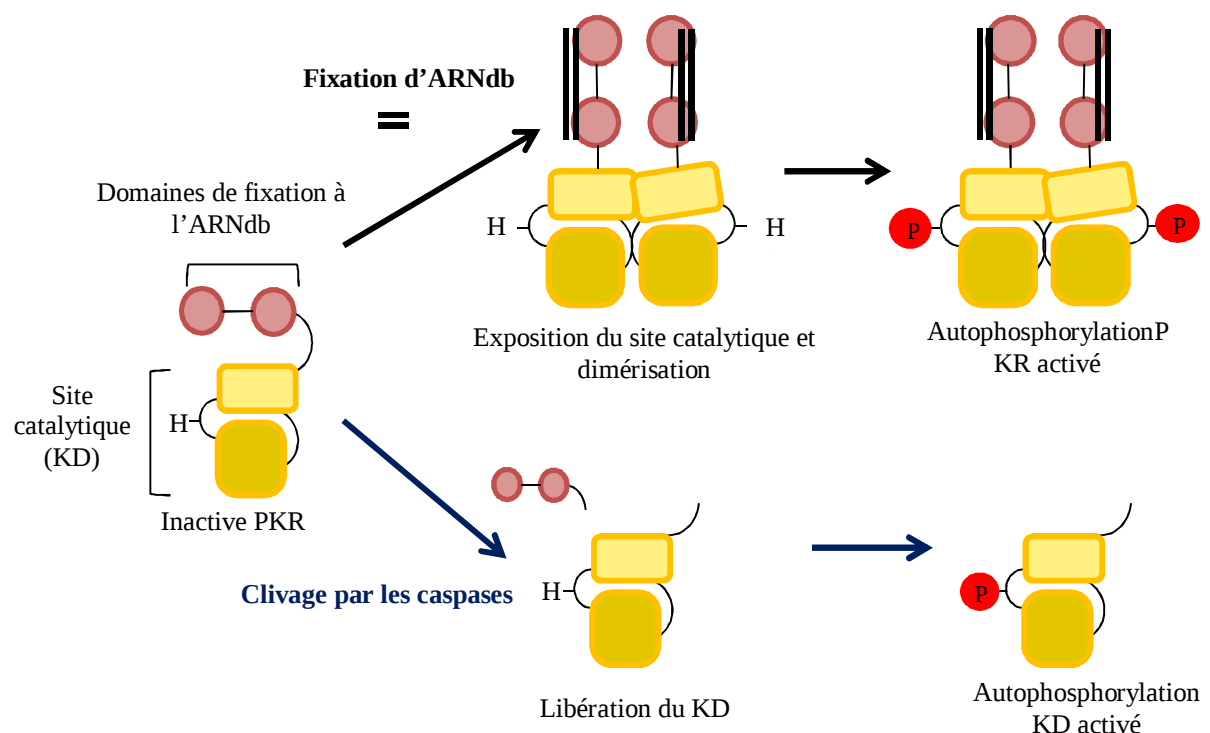


Figure 17 : Voies d'activation de PKR via la fixation d'ARNdb ou le clivage et la libération du site catalytique par les caspases, d'après Dey et al., 2005; Li et al., 2006 ; Saelens et al., 2001.

L'activation de la PKR va induire la phosphorylation du facteur de traduction EIF2 α , ce qui entraîne une inactivation de ce facteur et donc une inhibition de la traduction protéique. La PKR interagit également avec la voie NF κ B, impliquée dans la régulation de nombreuses cytokines (Saelens et al., 2001).

La PKR est également impliquée dans la réponse inflammatoire puisqu'*in vitro* cette protéine participe à la régulation de la production de cytokines pro-inflammatoires. En effet, l'inhibition de la PKR en culture de cellules microgliales et astrocytaires conduit à une diminution de la production d'IL-6, d'IL-1 β et de TNF- α (Couturier et al., 2011). Par ailleurs, il a été récemment montré chez la souris que la PKR participait à la formation d'inflammasomes, des complexes oligomériques de protéines impliqués dans l'immunité innée (Lu et al., 2012). Les inflammasomes participent à la neuroinflammation et sont notamment décrits dans la MA (Salminen et al., 2008).

L'inhibition de la PKR pourrait donc être une piste intéressante pour limiter la neuroinflammation. Pour tester cette hypothèse, l'inhibiteur choisi est le C16, un composé oxindole/imidazole (figure 18) qui inhibe la phosphorylation et donc l'activation de PKR. Le C16 a déjà été étudié dans un modèle de souris Alzheimer où il a permis de réduire l'activation cérébrale de la PKR ainsi que la neuroinflammation à l'âge de 12 mois (Couturier et al., 2012).

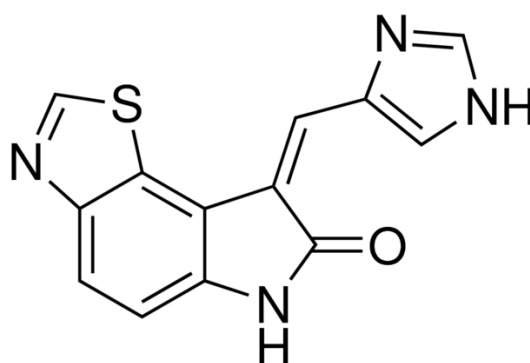


Figure 18 : Structure du composé oxindole/imidazole C16, extrait de Jammi et al., 2003.

Le C16 a été utilisé dans notre modèle *in vivo* de lésion intrastriatale pour mesurer les effets de son administration sur l'expression de la PKR totale phosphorylée ou non et sur le niveau d'expression du fragment catalytique KD. L'intégrité tissulaire, l'expression et l'activation du facteur de traduction EIF2 α , l'expression de cytokines pro- et anti-inflammatoires ainsi que la survie neuronale et l'activation de la caspase-3 ont également été étudiées, ce qui nous a permis non seulement de voir les effets du traitement par le C16 mais également de clarifier l'implication de la PKR dans notre modèle.

III. Caractérisation cinétique du modèle de lésion intrastriatale à l'AQ

Parallèlement aux évaluations des propriétés de molécules potentiellement anti-inflammatoires et neuroprotectrices, une étude menée sur le modèle AQ a permis de quantifier le niveau d'activation microgliale au cours du temps, suite à l'injection intrastriatale d'AQ. Sept points de mesure ont été réalisés entre J1 et 3 mois après l'injection d'AQ, soit à J1, J4, J7, J14, J30, J60 et J90 post-lésion. L'activation microgliale a été étudiée par imagerie moléculaire à l'aide d'un radioligand spécifique de la TSPO, le 6-chloro-2-(4'iodophenyl)-3-(N, N-diethyl)-imidazo[1,2-a]pyridine-3-acetamide ou CLINDE, dans le cortex, le striatum et l'hippocampe ipsi- et contro-latéraux mais aussi dans le cervelet. L'activation microgliale a également été étudiée par immunohistochimie, de même que la survie neuronale et l'activation astrocytaire.

Cette étude complémentaire visait à accroître notre compréhension du modèle et notamment notre connaissance de la cinétique du développement de l'activation microgliale induite par l'AQ à différents temps post-lésion et ce, sur une période totale de 3 mois. Les informations collectées ainsi sont importantes pour définir un véritable schéma thérapeutique d'administration d'agents à visée anti-inflammatoire, la notion de fenêtre thérapeutique prenant ici tout son sens. En effet, les résultats collectés ont montré que la neuroinflammation induite par l'AQ perdure au cours du temps faisant de ce modèle une piste intéressante pour l'étude de la neuroinflammation chronique.

Cette étude en trois temps a donc permis d'étudier les effets de 2 molécules potentiellement neuroprotectrices mais également de comprendre des éléments majeurs de leur mécanistique d'action. Par ailleurs, ce travail a permis d'améliorer la caractérisation du modèle de neuroinflammation par injection intrastriatale d'AQ et de connaître notamment son évolution au cours du temps et de renforcer les hypothèses en faveur du rôle majeur de l'inflammation cérébrale dans les pathologies neurodégénératives, lors d'épisodes aigus ou chroniques.

Travaux de thèse

Présentation du modèle : Lésion intrastriale par injection d'acide quinolinique

Toutes les études ont été réalisées sur des rats Wistar mâles de 300-320g (Centre d'élevage Janvier, l'Arbresle, France). Ces travaux ont été réalisés en accord avec les Directives de la Communauté Européenne 2010/63/EU et approuvées par le comité d'éthique local (agrément n°2012-03-1). Les rats sont restés dans un environnement à la température ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) et à l'hygrométrie ($40 \pm 7\%$) contrôlés, avec un cycle lumière/nuit de 12h et un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*.

Les animaux ont été endormis par anesthésie gazeuse à l'isoflurane (4% pour l'induction ; 2,5 % pour le maintien de l'anesthésie ; Baxter, Maurepas, France) puis placés dans un appareil à stéréotaxie de type David Kropf (Stoelting, Wood Dale, USA) avec la barre d'incisives placée à 3,3 mm. L'os du crâne a été dégagé puis trépané aux coordonnées stéréotaxiques suivantes : + 0,7 mm en antéropostérieur (AP) et - 3 mm en latéralité, coordonnées définies par rapport au bregma et grâce à l'atlas de stéréotaxie de Paxinos et Watson (1986) (figure 19A). Une aiguille à biseau droit de 26 gauges (Hamilton, Bonadz, Suisse), reliée à un nanoinjecteur (kdScientific, Avignon, France) a ensuite été insérée dans le cerveau à une profondeur de 5,5 mm (figure 19B).

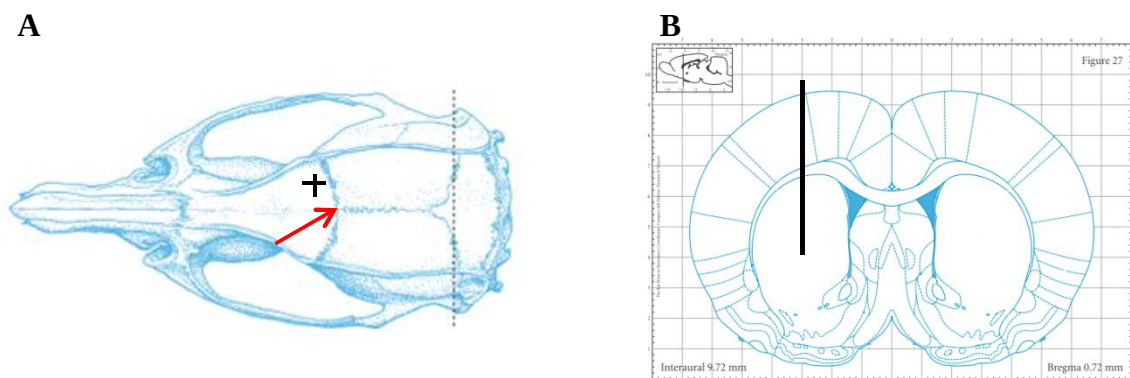


Figure 19 : Emplacement de la lésion stéréotaxique.

A. Crâne de rat, vue du dessus. La flèche rouge indique le bregma (point zéro) et la croix noire le lieu de la lésion (bregma +0,7 mm en antéropostérieur et -3 mm en latéralité).

B. Représentation sagittale d'un cerveau de rat (bregma +0,72 mm). Le trait noir représente le trajet de l'aiguille dans le striatum (profondeur 5,5 mm).

D'après Paxinos and Watson, 1986

Chaque injection (2 μ L d'AQ, 150 nmol) a duré 4 min (0,5 μ L/min) et l'aiguille a été maintenue en place 4 min supplémentaires pour éviter tout reflux du produit et s'assurer de sa diffusion dans le striatum. Le crâne a été rebouché avec de la cire à os (Ethicon, Aureau, France) et la peau suturée. L'animal a été remis dans sa cage et surveillé régulièrement jusqu'à son réveil, puis quotidiennement jusqu'au sacrifice.

Article 1

“Le stress oxydatif est associé aux effets délétères de l’induction de l’hème oxygenase 1 dans un modèle de neuroinflammation *in vivo* chez le rat”

C. Tronel, G.Y. Rochefort, N. Arlicot, S. Bodard, S. Chalon et D. Antier.

Oxid Med Cell Longev. 2013. Epub 2013 Mar 5.

Introduction

L’hème oxygenase (HO) est l’enzyme terminale de la dégradation de l’hème. Son isoforme inductible, l’hème oxygenase 1 (HO-1), participe à la régulation de l’inflammation et cette enzyme est surexprimée en réponse à différents stimuli tels que le stress oxydatif ou nitrosatif. Dans le SNC, HO-1 est principalement exprimée par la microglie et les astrocytes mais est également retrouvée dans les neurones (Matsuoka et al., 1999). L’induction de la HO-1 va augmenter le catabolisme de l’hème et la sécrétion de ses produits de dégradation, notamment la biliverdine transformée en bilirubine par la biliverdine réductase, dérivés connus pour leurs propriétés anti-oxydantes et leurs capacités à inhiber la peroxydation lipidique et la production des radicaux libres oxygénés.

De nombreuses études ont été menées sur l’induction de la HO-1 dans la neuroinflammation, rapportant des effets bénéfiques ou délétères en fonction des modèles utilisés. Ainsi chez la souris l’action de la HO-1 s’avère délétère en cas d’hémorragie intracérébrale (Wang and Dore, 2007) et protectrice dans un modèle de sclérose en plaques (Chora et al., 2007). Les propriétés anti-inflammatoires et anti-radicalaires des produits issus du catabolisme de l’hème par la HO-1, associé à la possibilité d’expression de la HO-1 dans le cerveau, soutiennent l’hypothèse en faveur de l’intérêt potentiel son induction dans le traitement de la neuroinflammation.

Dès lors, les objectifs de ce premier volet d’étude ont été : i) de vérifier cette hypothèse dans un modèle d’inflammation cérébrale *in vivo* chez le rat en étudiant l’influence de l’induction de la HO-1 sur la survie neuronale et sur l’activation de la microglie et ; ii) de focaliser sur les aspects mécanistiques qui régissent les effets de la HO-1 avec un focus sur la production de ROS.

Méthodes

L'augmentation de l'expression de la HO-1 a été obtenue par injection intrapéritonéale de l'hémine, molécule jouant à la fois le rôle de substrat et d'inducteur spécifique de la HO-1. Une étude préliminaire a été menée chez le rat pour contrôler l'influence de l'injection par voie systémique (i.p.) de l'hémine (50mg/kg) sur le niveau d'expression cérébrale de la HO-1.

Ces évaluations réalisées par western blot et PCR ont montré que 4 jours de traitement à cette dose d'hémine permettaient l'induction cérébrale de l'ARNm et de la protéine HO-1 chez les animaux traités par rapport aux témoins recevant le solvant de l'hémine (le DMSO). Cette étape a permis de valider l'utilisation de la dose d'hémine choisie.

Le modèle retenu pour cette étude, basé sur l'injection intra-striatale unilatérale d'acide quinolinique (AQ) développe une forte excitotoxicité cérébrale et est associé à une composante inflammatoire majeure. Ce modèle, notamment exploité dans l'étude de la maladie de Huntington (Schwarcz and Kohler, 1983) a été récemment utilisé par notre équipe qui a démontré son caractère neuroinflammatoire en étudiant la surexpression de la protéine translocatrice (TSPO) (Arlicot et al., 2008). L'AQ est un puissant agoniste des récepteurs au glutamate NMDA (N-méthyl-D-aspartate) dont l'activation provoque un afflux massif de calcium intracellulaire responsable, par activation des différentes enzymes présentes dans le cytoplasme (lipases, protéases, endonucléases), de la mort neuronale et de la libération de facteurs favorisant l'activation de la microglie (Estrada Sanchez et al., 2008).

Les effets de l'induction de HO-1 par l'hémine ont été quantifiés chez les animaux à J3 post-injection de l'AQ. Les animaux ont été traités par l'hémine selon le schéma suivant : une première dose d'hémine 24h avant l'administration d'AQ ; une 2^{ème} 2h avant la chirurgie puis une dose quotidienne jusqu'au sacrifice des rats le 3^{ème} jour post-lésion. Par ailleurs, des animaux traités ou non par l'hémine ont également reçu un chélateur du fer, la déféroxamine (DFX), à la dose de 150 mg/kg dans le but d'apprécier le rôle joué par les ions fer (Fe^{2+}), issus de la dégradation de l'hème par la HO-1, dans les effets observés dans notre étude. La survie neuronale et l'activation microgliale ont été étudiées par immunohistochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine neuronale nucléaire et le CD11b, respectivement.

Les premiers résultats obtenus – cf. section suivante - ont montré un effet délétère lié à l'induction de la HO-1, caractérisé par une perte tissulaire massive dans la région du striatum du côté exposé à l'injection d'AQ et apparaissant très rapidement après la chirurgie (J3). La

vitesse d'apparition et la sévérité des lésions observées nous ont amenés à formuler une nouvelle hypothèse en faveur du rôle potentiel d'une sur-production de ROS chez les animaux recevant l'hémine. Enfin, la spécificité de l'action de l'enzyme HO-1 sur les résultats a été contrôlée grâce à un groupe supplémentaire d'animaux recevant, en plus de l'hémine, traitement en IP par le zinc protoporphyrine IX (ZnPP), un inhibiteur spécifique de l'activité de la HO-1.

La quantification du niveau d'expression des ROS a été réalisée 1h post-lésion par l'AQ par fluorescence, en utilisant le dihydroéthidium. Cette molécule est oxydée par les espèces réactives de l'oxygène intracellulaires en éthidium et en 2-hydroxy éthidium qui vont tous les deux s'insérer dans l'ADN et émettre une fluorescence rouge proportionnelle à la production de ROS. Le niveau de cette fluorescence a été rapporté au nombre de neurones survivants étudiés simultanément par immunofluorescence en co-marquage.

Principaux résultats

Dans un premier temps, cette étude nous a permis de confirmer l'expression de la HO-1 sous l'action du traitement chronique par l'hémine, à la dose de 50 mg/kg. A J3 post-lésion par l'AQ une perte tissulaire dans le striatum ipsilatéral des animaux a été observée après la réalisation du marquage immunohistochimique, perte significativement augmentée par le traitement par l'hémine. En revanche, les animaux traités à la fois par l'hémine et la DFX ont développé des lésions cérébrales significativement plus faibles, par rapport aux animaux hémine-AQ.

Cette perte tissulaire n'a pas permis d'analyser les marquages immunohistochimiques dans le striatum. Aussi cette analyse a-t-elle été réalisée à distance de la lésion (bregma – 3 mm, tandis que la lésion a lieu à bregma + 0,7 mm en AP). Les mesures réalisées dans cette zone ont montré une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'activation des cellules microgliales dans l'hémisphère ipsilatéral vs controlatéral. De plus, le traitement par l'hémine a fortement augmenté cette activation microgliale, tandis que chez les animaux traités par la DFX le niveau d'augmentation était comparable à celui mesuré chez les rats traités par l'AQ seul.

A 1h post-lésion, nous avons mesuré une nette augmentation de la production de ROS et de la mort neuronale chez les animaux AQ et le traitement par l'hémine a induit un effet délétère en augmentant les effets toxiques de l'AQ. En revanche, l'administration de ZnPP ou de DFX aux animaux traités par l'hémine et l'AQ a permis de réduire significativement ($p < 0,05$) les effets associés à l'induction de la HO-1 avec des niveaux d'activation microgliale et de mort neuronale non significativement différents de ceux mesurés chez les animaux ne recevant que l'AQ.

Research Article

Oxidative Stress Is Related to the Deleterious Effects of Heme Oxygenase-1 in an *In Vivo* Neuroinflammatory Rat Model

Claire Tronel,¹ Gaël Y. Rochefort,² Nicolas Arlicot,¹ Sylvie Bodard,¹
Sylvie Chalon,¹ and Daniel Antier^{1,3}

¹ UMR INSERM U930, Université François Rabelais de Tours, PRES Centre Val de Loire Université, 37000 Tours, France

² EA 4708, IPROS, CHR Orléans, BP 2439, 1 rue Porte Madeleine, 45032 Orléans, France

³ Département Pharmacie, CHRU de Tours, Tours, France

Correspondence should be addressed to Daniel Antier; d.antier@chu-tours.fr

Received 5 November 2012; Revised 21 January 2013; Accepted 22 January 2013

Academic Editor: Sumitra Miriyala

Copyright © 2013 Claire Tronel et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Heme oxygenase-1 (HO-1) induction is associated with beneficial or deleterious effects depending on the experimental conditions adopted and the neurodegenerative rodent models used. The present study aimed first to evaluate the effects of cerebral HO-1 induction in an *in vivo* rat model of neuroinflammation by intrastratial injection of quinolinic acid (QA) and secondly to explore the role played by reactive oxygen species (ROS) and free iron (Fe^{2+}) derived from heme catabolism promoted by HO-1. Chronic I.P. treatment with the HO-1 inducer and substrate hemin was responsible for a significant dose-related increase of cerebral HO-1 production. Brain tissue loss, microglial activation, and neuronal death were significantly higher in rats receiving QA plus hemin (H-QA) versus QA and controls. Significant increase of ROS production in H-QA rat brain was inhibited by the specific HO-1 inhibitor ZnPP which supports the idea that ROS level augmentation in hemin-treated animals is a direct consequence of HO-1 induction. The cerebral tissue loss and ROS level in hemin-treated rats receiving the iron chelator deferoxamine were significantly decreased, demonstrating the involvement of Fe^{2+} in brain ROS production. Therefore, the deleterious effects of HO-1 expression in this *in vivo* neuroinflammatory model were linked to a hyperproduction of ROS, itself promoted by free iron liberation.

1. Introduction

Neuroinflammation is well known as an important element of brain disorders and in particular neurodegenerative diseases [1]. Microglial cells play a role often compared to the macrophage function in the central nervous system [2, 3]. Quiescent microglia are activated in the occurrence of brain damage such as oxidative stress, leading to an inflammatory cascade response. This activation is characterized by morphologic modifications and mostly secretion of proinflammatory factors such as cytokines or reactive oxygen species (ROS) [4, 5]. Without appropriate regulation, those proinflammatory agents cause brain damage to worsen. Therefore neuroinflammation is a relevant target on purpose to treat neurodegenerative diseases. Many experimental studies have been carried out to explore the effects of anti-inflammatory treatments against neurodegeneration especially in animal models, demonstrating that treatment

with nonsteroidal anti-inflammatory (NSAIDs) drugs [6–8] or nitric-oxide-releasing NSAIDs [9] could have a beneficial effect on neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease, or multiple sclerosis. However, prospective anti-inflammatory strategies against disease progression in human subjects with established AD have failed to show significant positive results [10].

Heme oxygenase (HO) is the final enzyme involved in the degradation of heme [11]. The inducible isoform HO-1 has been implicated in the regulation of inflammation and this enzyme is overexpressed in response to different stimuli such as oxidative and nitrosative stresses [12]. The induction of HO-1 increases the heme catabolism into biliverdin and bilirubin, potent antioxidant scavenging peroxy radicals, and inhibits lipid peroxidation [13].

Previous studies have reported controversial effects of HO-1 induction, either deleterious or beneficial depending on the different neuroinflammatory models and various

drug exposure methods. For example, in microglial cell cultures, HO-1 induction has been shown as protective in a model of neurotoxicity induced by glutamate [14]. In experimental autoimmune encephalomyelitis, HO-1 induction demonstrated a protective role by inhibiting major histocompatibility complex II expression and lymphocyte proliferation [15]. Conversely, HO-1 induction was associated with a deleterious iron accumulation in cultured astrocytes [16] as well as in activated microglia in a rodent stroke model [17]. The anti-inflammatory role of the products of heme degradation and the potential activation of HO-1 in the brain support the potential interest of this enzyme in neuroinflammation treatment. We hypothesized that deleterious HO-1 activation effects are linked to products resulting from heme degradation during brain inflammation.

In order to test this hypothesis, we experimentally increased the expression of HO-1 using the specific inducer hemin, in a rat model of neuroinflammation obtained by unilateral striatal injection of quinolinic acid (QA). This well-known model of Huntington's diseases [18] has recently been shown to be useful to study the overexpression of the translocator protein (TSPO) as a relevant marker of neuroinflammation [19]. QA is a strong agonist of glutamate NMDA (*N*-methyl-*D*-aspartate) receptors. Overactivation of NMDA receptors causes a massive intracellular influx of calcium that leads to neuronal death by activation of various enzymes (lipases, proteases, endonucleases) triggering different cell components then leading to neuronal death [20]. Factors released during the death of neurons rapidly lead to an important microglial activation.

Therefore, the purpose of the present study was first to assess *in vivo* the effects of the HO-1 inducer hemin on both neuronal survival and microglial activation in the neuroinflammatory excitotoxic rat model induced using QA intra-striatal injection and secondly to investigate the underlying mechanisms, especially focusing on ROS production in brain structures and the hypothetic role of iron derived from HO-1 enzymatic activity.

2. Materials and Methods

2.1. Animals. Sixty-six male Wistar rats (Janvier, l'Arbresle, France) weighing $\sim 340 \pm 10$ g were used. The experiments were performed in accordance with the Guideline for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication no. 85-23, revised 1996) and with European Directives (86/609/CEE) and approved by local ethical committee (Agreement no. 2012-03-1). Rats were kept in a temperature ($23 \pm 0.5^\circ\text{C}$)—and humidity ($43 \pm 8\%$)—controlled environment under a 12 h light-dark cycle with food and water available *ad libitum*. All efforts were made to minimize animal suffering and discomfort.

2.2. Determination of the Relevant Hemin Dose. We first investigated the potential dose-related effect of chronic intraperitoneal (I.P.) treatment with hemin on cerebral expression levels of HO-1. Based on a previously published

study [21], rats received a hemin solution in a daily dose of 10 mg/kg ($n = 3$) or 50 mg/kg ($n = 3$) over a 4-day period (final volume of 100 μL by injection, in DMSO). Hemin-treated rats were compared to a control group receiving its vehicle DMSO (100 μL ; daily I.P.; $n = 3$). The DMSO solvent is known to be a strong antioxidant compound [22] but the volume (100 μL) necessary to solubilize hemin for I.P. injection has been already used in previous studies without influence on biological parameters and the anti-inflammatory properties of DMSO reported in the literature considered large amounts of DMSO up to 6 mL/kg [23]. On day 5, the animals were euthanatized by decapitation and their brains were removed to analyze HO-1 expression by western blotting (WB).

The entire right hemispheres were rapidly crushed by Turrax, homogenized with lysis buffer 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% tritonX-100, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, and an inhibitor protease cocktail (chymotrypsin, thermolysin, papain, pronase, pancreatic extract and trypsin inhibitor; Roche), and centrifuged at 20,000 g for 1 hour. After denaturation by boiling (100°C , 5 min), beta mercaptoethanol and bromophenol blue were added to samples. Protein quantification was performed according to the Bradford method and then 25 mg of protein were separated on a 10% polyacrylamide gel and were transferred (30 min, 110 V) onto a nitrocellulose membrane (Amersham). Blots were blocked for 2 hours at room temperature with 5% (v/v) nonfat dried milk in Tris-buffered saline [10 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 150 mM NaCl] containing 0.05% Tween 20. The membrane was incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal antibody against HO-1 (1/400, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) or with a mouse polyclonal antibody against rat beta-3 tubulin used as housekeeping protein (1/400, Tubb3, Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA). The blot was then incubated with the conjugated goat antirabbit or antimouse horseradish peroxidase (1/1000, BioSource) for 2 h at room temperature. Immunoreactive proteins were detected with the ECL western blotting detection system (Amersham) using an imager (Gel doc XRS +, Biorad, Marnes-la-Coquette, France). The results were analyzed with Quantity One (Biorad, Marnes-la-Coquette, France).

2.3. Excitotoxic Neuroinflammation Model. One day after the first I.P. injection of hemin or its vehicle, the rats were anesthetized with isoflurane (4% for anesthesia induction and thereafter 2% for its maintenance) and placed in a stereotaxic David Kopf apparatus (tooth bar: -3.3 mm). The animals were unilaterally injected with 150 nmol of quinolinic acid (QA) (Sigma-Aldrich, Lyon, France) or its vehicle (0.1 M PBS, pH 7.4) into the right striatum (injection rate: 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$) using a 25- μL microsyringe (Hamilton, Bonaduz, Switzerland) and a micropump (KD Scientific, Holliston, MA, USA). Two microliters of QA were injected at the following coordinates: AP: $+0.7$ mm; ML: -3 mm; DV: -5.5 mm from bregma, according to Paxinos and Watson [24]. Body temperature ($36.9 \pm 0.6^\circ\text{C}$) was monitored during the surgery with a thermal probe. The injection syringe was left in place for additional 4 min to avoid QA backflow and

then slowly removed. The scalp was sutured and animals replaced in their cages and examined daily until sacrifice.

2.4. Experimental Procedure and Drug Treatment. Drugs or vehicles for control were administered I.P. the day before surgery, 2 h before surgery, and daily for 2 days. Consecutively to the above study (see Section 3), rats treated by hemin received 50 mg/kg I.P.

2.4.1. Effect of Hemin Treatment on Neuron Survival and Microglia Activation. The animals were randomly divided as follows: control group (DMSO I.P.; PBS intrastratial; $n = 6$); QA (DMSO I.P.; QA 150 nmol/2 μ L intrastratial; $n = 6$); H (hemin 50 mg/kg; PBS intrastratial; $n = 6$); H-QA (hemin 50 mg/kg I.P.; QA 150 nmol/2 μ L intrastratial; $n = 6$). At day 3 after surgery, the rats were euthanized for immunohistochemistry (IHC) processing. The rats were deeply anesthetized by I.P. injection of pentobarbital (Céva Santé Animale, Paris, France), perfused through the heart with 250 mL of heparinized (Héparine Choay, Sanofi-Aventis, Vitry-sur-Seine, France) saline (1 UI/mL of saline), and then followed by 400 mL of 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich, Lyon, France). The brains were removed and fixed in 4% PFA for 2 h then stored 48 h in 30% sucrose and frozen at -80°C .

Five transversal sections 40 μ m thick of both the striatum and hippocampus regions were used for IHC staining of neurons or activated microglia. Endogenous peroxidase was blocked using 3% H_2O_2 in 10% methanol and distilled water for 15 min. Slices were incubated overnight at room temperature with primary antibodies 1:500 diluted NeuN (Millipore, Molsheim, France) or 1:500-diluted Ox-42 (AbD Serotec, Düsseldorf, Germany), 0.1 M PBS supplemented with 0.2% v/v of Tween and 2% v/v of normal horse serum. As we used horse secondary antibodies, nonspecific binding sites were blocked by adding 2% horse serum and then incubated simultaneously with primary antibodies overnight at room temperature. Sections were then incubated with biotinylated horse anti-mouse IgG secondary antibodies (AbCys, Paris, France) for 90 min at room temperature. Neurons or activated microglia were visualized by staining with streptavidin-biotin-conjugated horseradish peroxidase (AbCys, Paris, France) for 60 min at room temperature. Peroxidase was developed for 3 min with diaminobenzidine at room temperature. Slices were analyzed under a light binocular microscope (Leica, Wetzlar, Germany) and histological analysis was performed with Histolab imagery software (US Histology Laboratories, Rockville, USA). Neuron survival and microglia activation were analyzed in 2 different areas for each brain: the area of QA injection (bregma +0.7 mm) and the cortical area at a distance from the site of injury (bregma -3 mm). The neurons were visually counted and the percentage of neuronal loss in the ipsi-versus contra-lateral hemisphere was calculated in matching areas of analysis. For Ox-42, the total surface area occupied by activated microglia was automatically measured by the imagery software and the percentage of increase in ipsi-

versus contralateral hemisphere was measured for each section. Five striatal slices were made within the QA injection site (from Bregma +0.6 to Bregma +0.8). Three areas per hemisphere were then randomly selected and neurons and surface occupied by activated microglia were counted by 2 independent operators. The surface area of tissue destruction in striatum was measured using Beta-Vision Plus software (Biospace Lab, Paris, France) and the percentage of tissue loss in ipsi- versus contra-lateral hemisphere was calculated on 5 slices per animal.

2.4.2. Effect of Hemin Treatment on Cerebral Reactive Oxygen Species Production. To understand the results observed in hemin-treated rats (see Section 3), a complementary study was performed focusing on the effect of HO-1 activity on ROS production in neurons of the striatum. The specificity of HO-1 influence on ROS was tested by adding a group of animals exposed to the inhibitor of HO-1 activity zinc protoporphyrin IX (ZnPP, Sigma-Aldrich) in a concentration of 50 mg/kg 24 h and 2 h before surgery [25].

Twenty rats were separated into 4 groups as follows: control group (DMSO I.P.; PBS intrastratial; $n = 5$); QA (DMSO I.P.; QA 150 nmol/2 μ L intrastratial; $n = 5$); H-QA (hemin 50 mg/kg I.P.; QA 150 nmol/2 μ L intrastratial; $n = 5$); ZnPP-H-QA (ZnPP 50 mg/kg I.P.; hemin 50 mg/kg I.P.; QA 150 nmol/2 μ L intrastratial; $n = 5$). Bearing in mind the short life span of ROS [26], the influence of QA and hemin on ROS expression levels was determined in the striatum at 1 h after QA injection in both QA and H-QA groups. ROS production was quantified by measuring the fluorescence of dihydroethidium (DHE, Sigma-Aldrich, Lyon, France), which is oxidized into ethidium and 2-hydroxy ethidium by intracellular ROS [27]. After intercalation into DNA, both products derived from DHE oxidation emit a red fluorescence proportional to ROS production. Therefore, neuron immunofluorescence detection and ROS quantification were performed simultaneously to normalize ROS fluorescence measurements to the number of preserved neurons after QA injection. One hour after surgery, the animals were deeply anesthetized by I.P. injection of pentobarbital and perfused through the heart with 250 mL of heparinized saline (1 UI/mL of saline) to limit noise floor caused by blood autofluorescence [28]. ROS quantification in frozen tissue has already been described in the literature especially with brain material [29–31]. After perfusion, the brains were removed and snap-frozen at -80°C . Sections (20 μ m) were fixed in PFA 4% (15 min) for neuron immunostaining, before saturation of nonspecific sites with normal horse serum (1:200) for 30 min at room temperature and incubation with 1:500 diluted primary antibody NeuN (Millipore, Molsheim, France) overnight at room temperature. Revelation was made using a secondary antibody fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated (1:200, Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, USA) for 3 h at room temperature. ROS analyzing was performed using DHE (4 μ M, Sigma-Aldrich, Lyon, France) applied to slides then cover-slipped before incubation (37°C , 30 min) in a dark humidified chamber. Preliminary study was performed to check out that the tissue fixation did not alter

the DHE signal. We compared fluorescence in frozen versus fixed/frozen brain slices and then confirmed that the DHE signal was unchanged regardless of the fixation (unpublished data). FITC and DHE fluorescence were measured using an Olympus BX51 microscope and analyzed with Cell D (Olympus, Hamburg, Germany) to measure the intensity of fluorescence and Image J (Rasband, WS, Image J, US National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) to manually perform neuron counting. Then, the intensity of ROS fluorescence in surviving neurons population and the ratio augmentation rate (%) in ipsi- versus the contra-lateral hemisphere was calculated.

2.4.3. Influence of Ferrous Iron (Fe^{2+}) Chelator Treatment on Hemin Effects. Given that ferrous iron (Fe^{2+}) is a product of heme, we investigated the influence of the Fe^{2+} chelator deferrioxamine (DFX) on neuron survival, microglia activation, tissue destruction, and ROS production in QA and hemin-treated rats. The compound was administered chronically according to the same schedule as hemin in 2 additional groups of animals as follows: DFX-QA (DFX, 150 mg/kg I.P.; QA 150 nmol/2 μL intrastriatal; $n = 5$ for IHC) and DFX-H-QA (DFX, 150 mg/kg I.P.; hemin 50 mg/kg I.P.; QA 150 nmol/2 μL intrastriatal; $n = 5$ for IHC; $n = 3$ for ROS analysis). IHC and ROS measurement were performed according to the methodology described above.

2.5. Statistical Analysis. Results are expressed as means $\pm$ SEM. Data for multiple variable comparisons were analyzed by a one-way ANOVA followed by a Newman-Keul's test as a posthoc test using GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The level of significance was $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Influence of Chronic Hemin Treatment on HO-1 Expression in the Brain. This preliminary study aimed to evaluate the effect of 4-day chronic treatment with either 10 or 50 mg/kg of the HO-1 inducer hemin on HO-1 protein expression levels in the rat brain. Western blotting measurements showed a significant ($P < 0.05$) increase of HO-1 protein expression in rats exposed to 50 mg/kg hemin versus 10 mg/kg and control (Figures 1(a) and 1(b)). Results normalized with tubulin protein are illustrated in Figure 1(b). Therefore, the highest dose of hemin (50 mg/kg) was used to evaluate the influence of HO-1 induction in the neuroinflammatory *in vivo* model.

3.2. Effect of Hemin Treatment and Influence of Ferrous Iron Chelator DFX on Neuron Survival, Cerebral Macroscopic Integrity, and Microglial Activation

3.2.1. In the Area of Quinolinic Acid Injection: Bregma +0.7 mm. Results are illustrated as a percentage of tissue loss in the ipsilateral hemisphere for all groups in Figure 2. In QA ($n = 6$), H-QA ($n = 5$), DFX-QA, and DFX-H-QA ($n = 5$) groups, major tissue destruction within the striatum

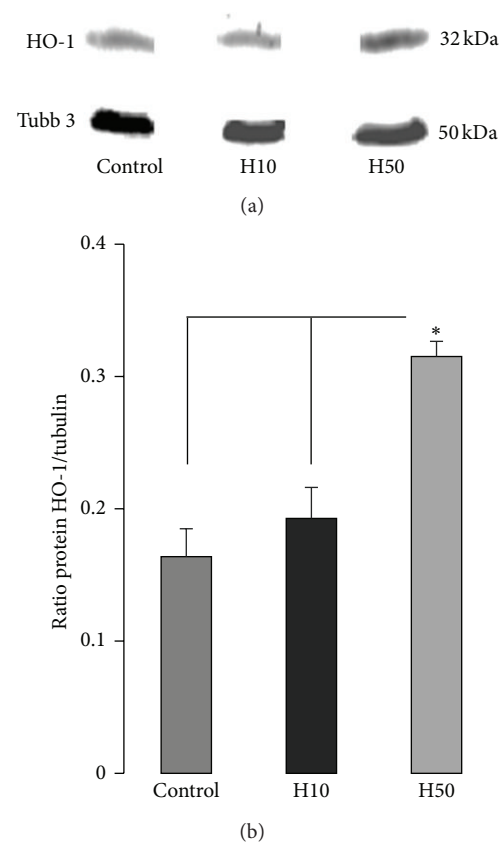


FIGURE 1: Dose effect of systemic hemin treatment on HO-1 protein expression in the brain (a) HO-1 and tubuline beta 3 (Tubb 3) western blotting bands for control ($n = 3$), hemin 10 ($n = 3$), and hemin 50 mg/kg ($n = 3$) groups. (b) DO of HO-1 normalized with Tubb-3. * $P < 0.05$.

did not allow neuron survival or microglia activation analysis. We observed in the ipsilateral cerebral hemisphere exposed to QA injection a major tissue loss ($17 \pm 6.5\%$) significantly ($P < 0.01$) worsened by hemin treatment ($51 \pm 9.0\%$ in H-QA animals). DFX treatment significantly ($P < 0.05$) decreased tissue loss caused by hemin ($33 \pm 4.6\%$ in DFX-H-QA group) but had no effect on QA alone ($20.0 \pm 4.7\%$ in DFX-QA group, $n = 5$). No cerebral tissue loss was observed, except mechanical lesions consequent to the needle injection, in control and H groups.

NeuN IHC was performed by 2 independent operators. For each brain, 5 slices were processed and 3 areas in the striatum per hemisphere were used for the measurement. Neuronal loss in the ipsilateral hemisphere did not show any significant difference between H and control groups (Figure 3).

Microglial activation was analyzed using Ox-42, an antibody specific to CD11b expressed in activated microglia. The relative area of brain slices occupied by activated microglial cells was measured in 3 areas per hemisphere (5 slices) of control and H groups and the overall level in the ipsi- and contralateral hemispheres was compared. No significant difference was observed between the animals.

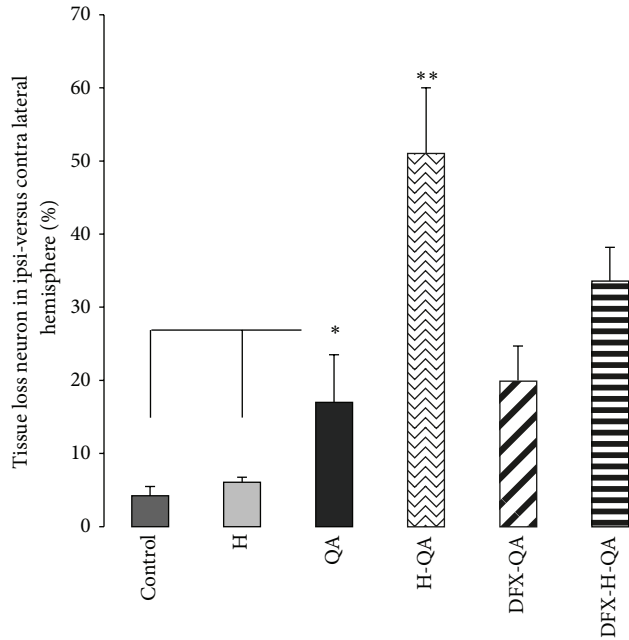


FIGURE 2: Relative cerebral tissue loss in the ipsilateral hemisphere versus the contralateral hemisphere 3 days after injury in control ($n = 6$), H ($n = 5$), QA ($n = 6$), H-QA ($n = 5$), DFX-QA ($n = 5$) and DFX-H-QA ($n = 5$) groups. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

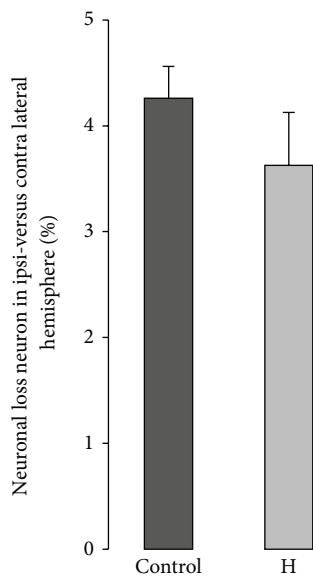


FIGURE 3: Relative neuronal loss in the ipsi- versus contra-lateral striatum in control and H groups 3 days after striatal injection.

3.2.2. In a Cortical Area Remote from the Site of Injury: Bregma -3 mm. In this area remote from the site of injury (Figure 4(a)), no difference in the number of neurons was found between contra- and ipsilateral cortex, regardless of the rats treatments (data not shown). However, the augmentation rate of activated microglia, evaluated by Ox-42 IHC, in the injured hemisphere was significantly ($P < 0.01$) more important in QA ($71.0 \pm 9.8\%$), DFX-QA ($48.7 \pm 16.8\%$),

DFX-H-QA ($105.2 \pm 11.5\%$), and in H-QA ($542.8 \pm 32.3\%$) than in both control and H groups (Figures 4(b) and 4(c)). The microglial activation measured in the H-QA group was significantly higher ($P < 0.01$) than in the QA, DFX-QA, and DFX-H-QA groups. Interestingly, the microglia activation level in DFX-QA, and QA groups was similar but DFX significantly decreased this activation in rats exposed to hemin treatment ($P < 0.01$ between DFX-QA and DFX-H-QA).

3.3. Effect of Hemin Treatment and Influence of Ferrous Iron Chelator DFX on Neuronal Loss and ROS Production in the Striatum 1 h after Surgery. Intracellular ROS production was measured 1 h after QA injection with the DHE fluorometric method coupled with immunofluorescence NeuN-FITC neuron survival quantification to calculate ROS expression per neuron. Both measurements were performed on the same 3 areas for each hemisphere (3 slices per brain). Neuronal loss and ROS activity level were measured in control ($n = 5$), in QA ($n = 5$), in H-QA ($n = 5$), in DFX-H-QA ($n = 3$), and in ZnPP-H-QA ($n = 5$) rats exposed to chronic treatment with the inhibitor of HO-1 activity zinc protoporphyrin IX (Figures 5(a) and 5(b), resp.). Merge of neurons and ROS expression is represented in Figure 5(c).

After visual counting, the percentage of neuronal loss in the ipsilateral versus the contralateral hemispheres was analyzed. Neuronal loss in the ipsilateral hemisphere 1 h after surgery was significantly different between the control ($14.0 \pm 3.1\%$) and all other groups. Hemin significantly ($P < 0.05$) enhanced neuronal loss ($60.0 \pm 6.6\%$ in H-QA group) when compared to QA alone ($36.3 \pm 4.6\%$). Both ZnPP and DFX limited the enhancement of this neuronal loss: $27.0 \pm 3.9\%$ and $23.1 \pm 4.8\%$ for ZnPP-H-QA and DFX-H-QA groups, respectively. These results are presented in Figure 5(d).

The percentage of augmentation of ROS level in neurons in the injured versus the contralateral striatum was significantly ($P < 0.05$) increased in the H-QA group ($49 \pm 6.2\%$) versus all the other groups. However, it is noteworthy that no significant difference was observed between control ($21.7 \pm 9.4\%$), QA ($23.1 \pm 5.5\%$), ZnPP-H-QA ($27.3 \pm 5.5\%$), and DFX-H-QA ($39.7 \pm 2.0\%$), although ROS increasing is greater in the latter group than in the others. Results of ROS production are summarized in Figure 5(e).

4. Discussion

We report here the effects of a chronic treatment with the direct HO-1 inducer and substrata hemin in an *in vivo* rodent model of excitotoxic neuroinflammation based on striatal quinolinic acid (QA) injection previously validated by our team [19]. Moreover, 3 days after QA injection was the time at which neuroinflammation was found to be at its greatest by our team using TSPO measurement (unpublished data) and has been chosen to analyze neuroinflammation in this study. The first step was to determine the optimal concentration of hemin that was able to significantly induce the expression of the HO-1 protein. Results obtained by WB showed that 4-day I.P. of hemin injections at a dose of 50 mg/kg were able

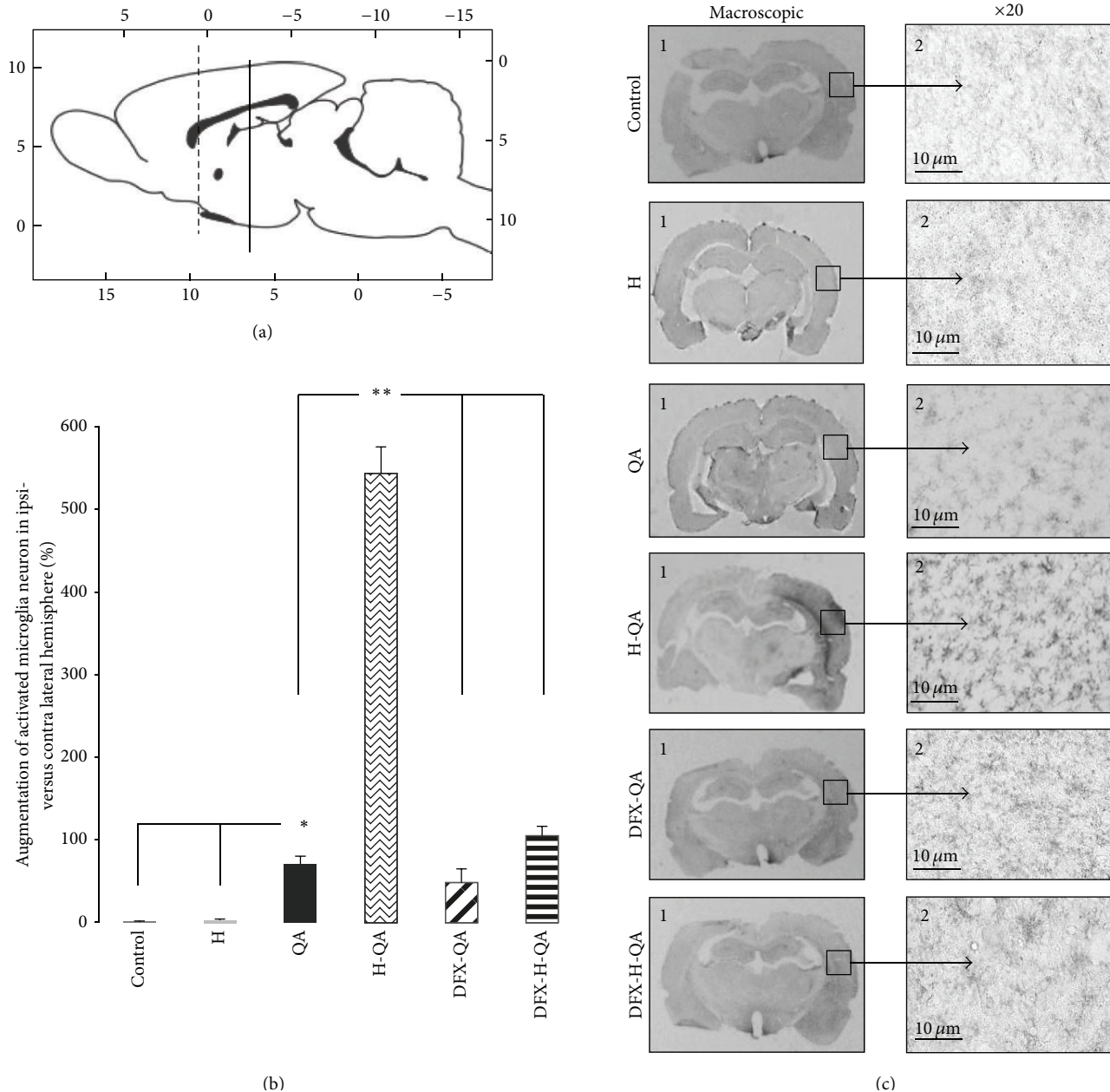


FIGURE 4: Microglial activation in the cortex (bregma -3 mm) 3 days after intrastriatal injection. (a) Sagittal rat brain representation [24]. The dotted and full lines symbolize, respectively, the site of injury (bregma +0.7 mm) and the area where Ox-42 immunohistochemistry was performed (bregma -3 mm). (b) Increasing of microglia activation in the ipsi- versus the contra-lateral hemisphere for each brain. Measurements were performed in the cortex (3 areas per hemisphere) at a distance of 3.7 mm posterior from the site of injury (bregma -3 mm). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. (c) Ox-42 immunohistochemistry in control, H, QA, H-QA, DFX-QA, and DFX-H-QA brains. 1: macroscopic view (bregma -3 mm). 2: microscopic view ($\times 20$) of activated microglia in the cortex of the ipsilateral hemisphere.

to induce cerebral HO-1 expression significantly higher than in the control group or at a dose of 10 mg/kg of hemin.

In the past decade, many studies have reported that HO-1 induction could be either beneficial or deleterious in the case of neuroinflammation, according to the *in vivo* or *in vitro* models and to the HO-1 induction procedure [32–34]. In our experimental conditions, the IHC method demonstrated the deleterious impact of the HO-1 induction, characterized by a significant lesion worsening in animals receiving hemin

(H-QA group) versus QA rats. Therefore, we focused on the potential mechanism that could explain the harmful effect of HO-1 induction on neuroinflammation.

Microglial cells are the sensors of brain integrity through surface molecules, such as Toll-like or scavenger receptors, sensitive to background modifications that induce microglia activation [35]. In chronic neuroinflammation, unregulated microglia activity is responsible for neurotoxic factor production like ROS [5] that can lead to neuronal death. This

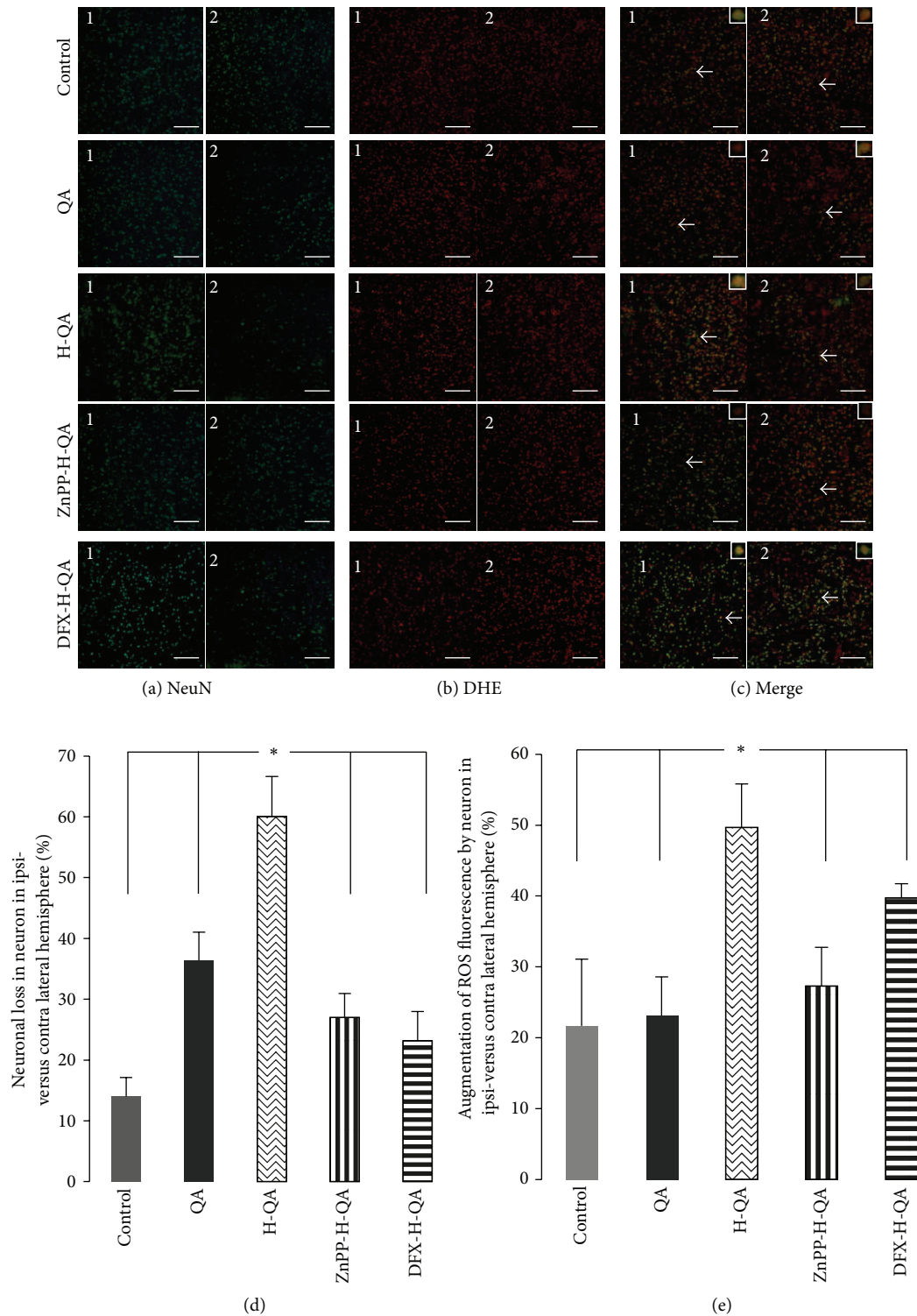


FIGURE 5: Immunofluorescence of NeuN and ethidium in rat striatum 1 h after QA injection. (a), (b), and (c) represent the same areas of contra- and ipsi-lateral striatum (1 and 2, resp.) of control ($n = 5$), QA ($n = 5$), H-QA ($n = 5$), ZnPP-H-QA ($n = 5$), and DFX-H-QA ($n = 3$) groups. Magnification was $\times 20$ ($\times 120$ for inserts). Data are means $\pm$ SEM. Bars: $20 \mu\text{m}$. (a) NeuN (green channel). Neurons staining in contra- and ipsi-lateral striatum (1 and 2) for each group. Data are expressed as relative neuronal loss in the ipsilateral hemisphere versus the contralateral hemisphere (d). * $P < 0.05$ compared to respective contralateral side. (b) ROS expression analyzed with dihydroethidium (DHE) in the contra- and ipsi-lateral striatum (1 and 2) for each group. ROS measurements were performed at the same location as NeuN counting. Data are expressed as relative augmentation of ROS level in neurons in the ipsilateral hemisphere versus the contralateral hemisphere (e). * $P < 0.05$. (c) Merge representing neurons and ROS expression in contra- and ipsi-lateral striatum (1 and 2) for each group.

has also been confirmed and quantified in our study where massive brain tissue destruction occurred 3 days after QA injection, amplified by hemin treatment (H-QA group). Since a brief time lapse suggested a fast and highly toxic destruction mechanism, we hypothesized an involvement of ROS in the cerebral tissue loss especially in this group. Because of their brief lifetime, ROS production has been measured 1 h after QA striatal injection by using the dihydroethidium (DHE) method that allows ROS detection only in intact cells. DHE penetrates into the cell where superoxide ion turns it into ethidium bromide which enters the cell nucleus and then inserts into the DNA before emitting a red fluorescence [36]. As the neuronal death was massive at the time of analysis, a double labeling was performed using NeuN coupled to FITC to have fluorescence related to the surviving neuron population. ROS fluorescence rationalized per neuron and compared in ipsi- versus contra-lateral striatum showed no difference between the QA and control groups, demonstrating that QA alone had no significant influence on ROS production. Conversely, chronic hemin treatment significantly promoted ROS production in the injured brain hemisphere in comparison to all other groups. The ROS production increasing in the H-QA group was inhibited in rats receiving the specific HO-1 inhibitor ZnPP, supporting the hypothesis that ROS level augmentation in hemin animals was a direct consequence of HO-1 activation. However, although a reduction of ROS production was observed in DFX-H-QA group, the ROS level remained higher than in the QA or ZnPP groups, suggesting the involvement of another mechanism than iron on ROS production.

Induction of HO-1 results in the catabolism of the prooxidant heme to bile pigments, biliverdin, and bilirubin, which are potent antioxidants [37]. However, HO-1 metabolizes heme into free irons protoporphyrin then releases equimolar amounts of Fe^{2+} [38]. Free iron is well known for its catalyzing reaction that generates ROS and Schipper et al. [39] suggested that the negative effect of HO-1 induction observed in cultures of primary neonatal rat astroglia could be related to iron accumulation. Our results support this hypothesis in an *in vivo* animal model since the DFX iron chelator reduced tissue losses induced by the hemin treatment. Incidentally, it is to be noted that DFX had no effect on tissue destruction in animals receiving QA alone. As no difference was observed between controls and unexposed-to-QA hemin-treated rats (group H), we first hypothesized that QA and hemin developed a synergic destruction pattern. Considering the severity of the striatum lesions and those in the immediate surrounding areas, the microglial activation level measurement was performed in the cortical regions at a distance of 3 mm posterior to the site of injury. The microglia cells at J3 postlesion exhibited thick ramifications matching with activated microglia cells according to Kreutzberg [3]. However, no confusion with infiltrated macrophages could be made in our microscopic analysis as we only identified resting morphology cells in control rats and activated with ramifications microglia cells in H-QA rats. Results showed that microglia was significantly activated in QA animals versus the control in the ipsilateral

hemisphere. It is noteworthy that this neuroinflammation was strongly enhanced by hemin in H-QA rats then matching with the tissue loss described. DFX treatment in DFX-H-QA group significantly decreased microglia activation in the ipsilateral hemisphere, strongly suggesting that Fe^{2+} may be implicated in deleterious HO-1 effects. Deleterious effects of microglia activation characterized by proinflammatory cytokines production (e.g., $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$, iNOS) in striatum area have already been reported at J1 in this QA adult rat model [40]. Unfortunately, the massive tissue destruction observed in H-QA rats in our experimental conditions (J3 after QA injection) did not allow us to quantify the expression level of cytokines. The strong activation of microglia (Ox-42) measured at distance from the lesion (bregma -3 mm) in H-QA animals (Figure 4) was not associated with significant neuronal loss and no difference in neuronal survival in the cortex between the groups was observed. Indeed, the microglia activation in cortical area is not systematically associated with neurons death like in adult rats exposed to temporary brain ischemia [41]. Interestingly, the global level of activated microglia in this area was markedly more important in H versus control animals, suggesting a potential proinflammatory effect of HO-1 induction.

Therefore, we report here that HO-1 induction, ROS production, and cerebral destruction are closely linked in our neuroinflammatory model. ROS production itself could be directly connected to the HO-1 enzyme activity and probably results from a massive release of iron. The striatal injection of QA was responsible for tissue destruction but the induced excitotoxicity did not significantly modify ROS production 1 h after the injection. Nevertheless, hyperactivation of NMDA receptor is associated to massive intracellular Ca^{2+} entrance and accumulation leading to mitochondrial damages and nitric oxide synthase activation which are both responsible for ROS production [20]. So, we thought that the delay between QA injection and ROS production relating to QA effects take longer than one hour before reaching a significant level.

The deleterious effect of HO-1 in this neuroinflammatory model could be explained by a hyperproduction of ROS. The diminution of both tissue loss and ROS production observed in rats receiving both DFX and hemin shows that iron is directly implicated in ROS production caused by HO-1 expression. Given that hemin alone did not induce either microglia activation or detectable neuronal death, it appears that the ROS-HO-1-mediated production created a cerebral destruction pattern in combination with the QA cerebral excitotoxicity. Constitutive heme oxygenase (HO-2) is also expressed in the brain and inhibited by ZnPP [42]. Its involvement in the deleterious effect associated to HO-1 activity cannot be totally rejected. HO-2 is mostly described for its role in the homeostasis of heme in brain [43] and therefore could participate in HO-1 regulation [44]. However, the specific influence of HO-2 in our model was not evaluated.

Recently, it has been proposed that hemin caused microglia to release deleterious inflammatory factors via Toll-like receptor (TLR) 4 in a mouse model of intracerebral

hemorrhage [45]. Indeed, exogenous hemin administration significantly increased microglial activation and exacerbated brain injury in WT mice but not in TLR4^{-/-} mice. Moreover, application of TLR4 antibody suppressed hemin-induced microglial activation in WT mice, suggesting a direct correlation between TLR4 and hemin-induced microglial activation. This was supported by the observation that TLR4 activates NF- κ B, which plays a critical role in the inflammatory response by regulating the gene expression of inflammatory mediators such as the cytokines IL-1 α and -1 β , TNF- α , and IL-6 [46, 47]. Therefore, targeting the TLR4 signaling pathway using anti-TLR4 antibody administration could be a potential therapeutic strategy in our excitotoxic rat model of neuroinflammation.

Complementary experiments could be carried out to determine the optimal hemin doses and administration schedule to achieve a positive benefit-risk balance of the drug. Indeed, most drugs of the Pharmacopoeia can generate deleterious effects if they are not used properly. With the aim of *in vivo* neuroprotection, the drug hemin should be associated to an ROS scavenger or an iron chelator. Thus, HO-1 activity promotes sequestration of redox-active iron in astroglia. This is confirmed by a recent review showing that selective human HO-1 expression in the astrocytes of transgenic mice is associated with iron sequestration in these cells [48]. Glial HO-1 may be a rational therapeutic target in AD, PD, and other human CNS conditions characterized by the unregulated deposition of brain iron.

In conclusion, this study showed first that hemin treatment and HO-1 induction had a deleterious effect in this QA model and enhanced tissue loss and microglia activation. Secondly, we showed that this effect is probably linked to a hyperproduction of ROS and iron accumulation.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interests.

References

- [1] C. K. Glass, K. Saijo, B. Winner, M. C. Marchetto, and F. H. Gage, "Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration," *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 918–934, 2010.
- [2] E. Ulvestad, K. Williams, R. Bjerkvig, K. Tiekotter, J. Antel, and R. Matre, "Human microglial cells have phenotypic and functional characteristics in common with both macrophages and dendritic antigen-presenting cells," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 56, no. 6, pp. 732–740, 1994.
- [3] G. W. Kreutzberg, "Microglia: a sensor for pathological events in the CNS," *Trends in Neurosciences*, vol. 19, no. 8, pp. 312–318, 1996.
- [4] R. M. Ransohoff and V. H. Perry, "Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses," *Annual Review of Immunology*, vol. 27, pp. 119–145, 2009.
- [5] M. L. Block and J. S. Hong, "Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism," *Progress in Neurobiology*, vol. 76, no. 2, pp. 77–98, 2005.
- [6] P. L. McGeer and E. G. McGeer, "NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies," *Neurobiology of Aging*, vol. 28, no. 5, pp. 639–647, 2007.
- [7] A. Gupta, A. Kumar, and S. K. Kulkarni, "Targeting oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neuroinflammatory signaling by selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors mitigates MPTP-induced neurotoxicity in mice," *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 35, no. 4, pp. 974–981, 2011.
- [8] A. Mirshafiey, H. Matsuo, S. Nakane, B. H. A. Rehm, C. S. Koh, and S. Miyoshi, "Novel immunosuppressive therapy by M2000 in experimental multiple sclerosis," *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, vol. 27, no. 2, pp. 255–265, 2005.
- [9] P. T. Jantzen, K. E. Connor, G. DiCarlo et al., "Microglial activation and β -amyloid deposit reduction caused by a nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug in amyloid precursor protein plus presenilin-1 transgenic mice," *Journal of Neuroscience*, vol. 22, no. 6, pp. 2246–2254, 2002.
- [10] B. P. Imbimbo, "An update on the efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease," *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 18, no. 8, pp. 1147–1168, 2009.
- [11] R. Tenhunen, H. S. Marver, and R. Schmid, "The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 61, no. 2, pp. 748–755, 1968.
- [12] S. Immenschuh and G. Ramadori, "Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target," *Biochemical Pharmacology*, vol. 60, no. 8, pp. 1121–1128, 2000.
- [13] R. Stocker, "Antioxidant activities of bile pigments," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 6, no. 5, pp. 841–849, 2004.
- [14] G. S. Jeong, D. S. Lee, D. C. Kim et al., "Neuroprotective and anti-inflammatory effects of mollugin via up-regulation of heme oxygenase-1 in mouse hippocampal and microglial cells," *European Journal of Pharmacology*, vol. 654, no. 3, pp. 226–234, 2011.
- [15] A. Chora, P. Fontoura, A. Cunha et al., "Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 2, pp. 438–447, 2007.
- [16] H. M. Schipper, "Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration," *Experimental Gerontology*, vol. 35, no. 6-7, pp. 821–830, 2000.
- [17] C. Justicia, P. Ramos-Cabrera, and M. Hoehn, "MRI detection of secondary damage after stroke: chronic iron accumulation in the thalamus of the rat brain," *Stroke*, vol. 39, no. 5, pp. 1541–1547, 2008.
- [18] R. Schwarcz and C. Köhler, "Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid," *Neuroscience Letters*, vol. 38, no. 1, pp. 85–90, 1983.
- [19] N. Arlicot, A. Katsifis, L. Garreau et al., "Evaluation of CLINDE as potent translocator protein (18 kDa) SPECT radiotracer reflecting the degree of neuroinflammation in a rat model of microglial activation," *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, vol. 35, no. 12, pp. 2203–2211, 2008.
- [20] A. M. Estrada Sánchez, J. Mejía-Toiber, and L. Massieu, "Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease," *Archives of Medical Research*, vol. 39, no. 3, pp. 265–276, 2008.
- [21] N. Desbuides, G. Y. Rochefort, D. Schlecht et al., "Heme oxygenase-1 inducer hemin prevents vascular thrombosis," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 98, no. 3, pp. 614–620, 2007.

- [22] B. Bektaşoğlu, S. Esin Celik, M. Ozyürek, K. Güçlü, and R. Apak, "Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC method," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 345, no. 3, pp. 1194–1200, 2006.
- [23] C. K. Chang, M. V. Albarillo, and W. Schumer, "Therapeutic effect of dimethyl sulfoxide on ICAM-1 gene expression and activation of NF- κ B and AP-1 in septic rats," *Journal of Surgical Research*, vol. 95, no. 2, pp. 181–187, 2001.
- [24] G. Paxinos and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, New York, NY, USA, 6th edition, 1986.
- [25] N. Desbuides, J. M. Hyvelin, M. C. Machet et al., "Heme oxygenase-1 inducer hemin attenuates the progression of remnant kidney model," *Nephron—Experimental Nephrology*, vol. 113, no. 1, pp. e35–e44, 2009.
- [26] S. Borgmann, "Electrochemical quantification of reactive oxygen and nitrogen: challenges and opportunities," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 394, no. 1, pp. 95–105, 2009.
- [27] B. Kalyanaraman, "Oxidative chemistry of fluorescent dyes: implications in the detection of reactive oxygen and nitrogen species," *Biochemical Society Transactions*, vol. 39, no. 5, pp. 1221–1225, 2011.
- [28] S. Khandelwal and R. K. Saxena, "Age-dependent increase in green autofluorescence of blood erythrocytes," *Journal of Biosciences*, vol. 32, no. 2, pp. 1139–1145, 2007.
- [29] R. Poulet, M. T. Gentile, C. Vecchione et al., "Acute hypertension induces oxidative stress in brain tissues," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 26, no. 2, pp. 253–262, 2006.
- [30] H. Shichinohe, S. Kuroda, H. Yasuda et al., "Neuroprotective effects of the free radical scavenger Edaravone (MCI-186) in mice permanent focal brain ischemia," *Brain Research*, vol. 1029, no. 2, pp. 200–206, 2004.
- [31] E. Yamamoto, N. Tamamaki, T. Nakamura et al., "Excess salt causes cerebral neuronal apoptosis and inflammation in stroke-prone hypertensive rats through angiotensin II-induced NADPH oxidase activation," *Stroke*, vol. 39, no. 11, pp. 3049–3056, 2008.
- [32] D. Y. Lu, Y. Y. Tsao, Y. M. Leung, and K. P. Su, "Docosahexaenoic acid suppresses neuroinflammatory responses and induces heme oxygenase-1 expression in BV-2 microglia: implications of antidepressant effects for omega-3 fatty acids," *Neuropsychopharmacology*, vol. 35, no. 11, pp. 2238–2248, 2010.
- [33] M. D. Laird, C. Wakade, C. H. Alleyne Jr., and K. M. Dhandapani, "Hemin-induced necroptosis involves glutathione depletion in mouse astrocytes," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 45, no. 8, pp. 1103–1114, 2008.
- [34] J. S. Park, J. A. Shin, J. S. Jung et al., "Anti-inflammatory mechanism of compound K in activated microglia and its neuroprotective effect on experimental stroke in mice," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 341, no. 1, pp. 59–67, 2012.
- [35] H. Kettenmann, U. K. Hanisch, M. Noda, and A. Verkhratsky, "Physiology of microglia," *Physiological Reviews*, vol. 91, pp. 461–553, 2011.
- [36] H. Zhao, J. Joseph, H. M. Fales et al., "Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 16, pp. 5727–5732, 2005.
- [37] T. Morita, "Heme oxygenase and atherosclerosis," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 25, no. 9, pp. 1786–1795, 2005.
- [38] P. J. Syapin, "Regulation of haeme oxygenase-1 for treatment of neuroinflammation and brain disorders," *British Journal of Pharmacology*, vol. 155, no. 5, pp. 623–640, 2008.
- [39] H. M. Schipper, A. Gupta, and W. A. Szarek, "Suppression of glial HO-1 activity as a potential neurotherapeutic intervention in AD," *Current Alzheimer Research*, vol. 6, no. 5, pp. 424–430, 2009.
- [40] J. K. Ryu, H. B. Choi, and J. G. McLarnon, "Peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195 reduces microglial activation and neuronal death in quinolinic acid-injected rat striatum," *Neurobiology of Disease*, vol. 20, no. 2, pp. 550–561, 2005.
- [41] Z. Soltys, O. Orzylowska-Sliwiska, M. Zaremba et al., "Quantitative morphological study of microglial cells in the ischemic rat brain using principal component analysis," *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 146, no. 1, pp. 50–60, 2005.
- [42] R. J. Wong, H. J. Vreman, S. Schulz, F. S. Kalish, N. W. Pierce, and D. K. Stevenson, "In vitro inhibition of heme oxygenase isoenzymes by metalloporphyrins," *Journal of Perinatology*, vol. 1, pp. S35–S41, 2011.
- [43] Y. M. Kim, H. O. Pae, J. E. Park et al., "Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 14, no. 1, pp. 137–167, 2011.
- [44] K. Sodhi, K. Inoue, K. H. Gotlinger et al., "Epoxyeicosatrienoic acid agonist rescues the metabolic syndrome phenotype of HO-2-null mice," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 331, no. 3, pp. 906–916, 2009.
- [45] S. Lin, Q. Zhong, F. L. Lv et al., "Heme activates TLR4-mediated inflammatory injury via MyD88/TRIF signaling pathway in intracerebral hemorrhage," *Journal of Neuroinflammation*, vol. 9, no. 46, 2012.
- [46] K. Miyake, "Endotoxin recognition molecules MD-2 and toll-like receptor 4 as potential targets for therapeutic intervention of endotoxin shock," *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy*, vol. 3, no. 3, pp. 291–297, 2004.
- [47] K. Takeda and S. Akira, "TLR signaling pathways," *Seminars in Immunology*, vol. 16, pp. 3–9, 2004.
- [48] H. M. Schipper, "Heme oxygenase-1 in Alzheimer disease: a tribute to Moussa Youdim," *Journal of Neural Transmission*, vol. 118, no. 3, pp. 381–387, 2011.

Article 2

“Le C16, inhibiteur spécifique de la PKR, prévient l’apoptose et la production neuronale d’IL-1 β induites dans un modèle d’excitotoxicité aiguë chez le rat avec une composante inflammatoire”

C. Tronel, G. Page, S. Bodard, S. Chalon, D. Antier.

En révision mineure dans *Neurochemistry International* (10/13)

Introduction

La protéine kinase activée par l’ARN, ou PKR, est une kinase à sérine/thréonine qui est activée par différents agents, tels que l’IFN- α ou le calcium. Son activation se traduit par sa dimérisation et son autophosphorylation, notamment au niveau de la thréonine 451 (T₄₅₁) dont la phosphorylation est nécessaire à l’activité de la PKR (Peel and Bredesen, 2003). Sous l’action des caspases, la PKR peut être clivée et libérer un fragment catalytique N-terminal, ou KD, capable de s’autophosphoryler et de développer une activité enzymatique comparable à celle de la PKR activée totale (Saelens et al., 2001).

L’un des substrats de la PKR est le facteur de traduction eIF2 α , dont la phosphorylation entraîne l’inhibition. Mais la PKR est également impliquée dans la production de cytokines, son inhibition se traduisant par une diminution de l’expression du TNF- α , de l’IL-1 β et de l’IL-6 en culture cellulaire mais également dans un modèle de la MA chez la souris (Couturier et al., 2011; Lu et al., 2012). L’activation de la PKR, quant à elle, est associée à une perte neuronale en rapport avec le rôle inducteur de l’apoptose de la PKR via notamment l’activation de la caspase-3 (Balachandran et al., 2000; Field et al., 2010). En culture de monocytes extraits de patients MA, l’inhibition de la PKR a été associée à une diminution de l’expression de cytokines pro-inflammatoires (Couturier et al., 2010b). De plus, le niveau d’expression de la PKR augmente avec l’âge mais également dans les maladies neurodégénératives telles que la MA, la MP ou la MH (Morel et al., 2009). Ces données font de l’inhibition de la PKR une cible potentielle dans le traitement de la neuroinflammation.

Plusieurs molécules ont été développées pour inhiber la PKR, dont le C16, composé oxindole/imidazole. Cette molécule inhibe non seulement la phosphorylation et donc l’activation de la PKR mais a également été associée à une diminution de l’activation de la

caspase-3 induite par le peptide A β en culture cellulaire (Couturier et al., 2010b; Morel et al., 2009). L'une des rares études ayant exploré les effets du C16 *in vivo* chez des souris modèles de la MA a montré que l'injection de C16 induisait une diminution de l'activation de la PKR ainsi que de la neuroinflammation aux stades précoces de la maladie (Couturier et al., 2012). Cependant, aucune étude n'a jusqu'à présent rapporté les effets du C16 dans un modèle de neuroinflammation aiguë.

Le but de ce travail était donc d'étudier les effets du C16, inhibiteur de la PKR, dans notre modèle de neuroinflammation *in vivo* chez le rat et plus précisément de décrire l'influence d'un traitement par le C16 sur l'activation de la PKR, sur l'expression du facteur de transcription eIF2 α et de la caspase-3, ainsi que sur la survie neuronale et la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires.

Matériels et méthodes

Une étude préliminaire a été menée afin de déterminer la dose de C16 optimale permettant d'évaluer les effets de cet inhibiteur dans notre modèle. Ainsi, le C16 a été administré à deux doses : 60 et 600 μ g/kg par voie intrapéritonéale, selon un schéma très proche de celui choisi dans l'étude précédente avec 3 injections respectivement réalisées 24h avant, 2h avant et 24h après la lésion par l'AQ.

Pour chaque dose de C16, un groupe d'animaux a reçu l'AQ en intrastratial et un second le solvant de l'AQ (tampon phosphate). Deux groupes témoins recevant le solvant du C16 et l'AQ ou le tampon phosphate ont également été constitués. Toutes les études ont été réalisées en comparant les résultats obtenus dans les striatum contro- et ipsi-latéral, faisant de chaque rat son propre témoin. Les effets de l'injection d'AQ et du traitement par le C16 sur l'activation de la PKR ont été étudiés par western blot. Trois formes de la PKR ont été identifiées : la PKR totale (inactive), la PKR totale phosphorylée au niveau de la T₄₅₁ (PKR activée) et le KD phosphorylé (forme activée du fragment catalytique). Les résultats obtenus lors de cette étude préliminaire nous ont conduits à poursuivre l'étude en utilisant uniquement la dose la plus élevée de C16 (600 μ g/kg).

A la suite de cette étude préliminaire, le projet s'est focalisé sur le facteur de traduction eIF2 α dont les fractions phosphorylées inactives et la forme active non phosphorylée ont été identifiées par western blot. La production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF- α)

et anti-inflammatoires (IL-4 et IL-10) a également été quantifiée avec le Luminex™ à partir des mêmes lysats de striatum que pour les western blot. Des lots supplémentaires d'animaux soumis aux mêmes protocoles ont permis d'étudier l'intégrité tissulaire par une coloration hématoxyline/éosine (H&E) et de quantifier le degré de mort neuronale et d'activation de la caspase-3 par immunofluorescence chez les animaux recevant le C16 *versus* témoins.

Principaux résultats

Les résultats obtenus au cours de l'étude préliminaire ont montré dans le striatum ipsilatéral des animaux recevant l'AQ une forte augmentation de l'expression du KD phosphorylé de la PKR, associée à une diminution significative de la PKR totale ($p < 0,05$). Ces modifications de l'activité de la PKR n'ont pas été retrouvées chez les animaux traités par le C16 à la plus forte dose (600 µg/kg), démontrant que l'environnement apoptotique induit par l'AQ et responsable du clivage de la PKR est inhibé avec cette dose de C16, qui a donc été retenue pour la suite des expérimentations. Concernant l'activation du facteur de traduction eIF2 α , le *ratio* phospho-eIF2 α /eIF2 α , soit le *ratio* de la forme inactive sur la forme active a été fortement augmenté dans le striatum ipsilatéral des animaux AQ. L'augmentation de ce *ratio* a confirmé l'activation de la PKR dans cette structure, tandis que le traitement par le C16 permet de ramener ce *ratio* à un niveau non significativement différent du groupe témoin.

Le dosage des cytokines dans le striatum a montré une augmentation de l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β dans le striatum controlatéral des animaux AQ. A noter qu'aucune élévation de l'IL-1 β n'a été observée dans le striatum ipsilatéral. Cependant, le traitement par le C16 a permis de limiter significativement ($p < 0,05$) l'expression de l'IL-1 β observée dans le striatum controlatéral des animaux ayant reçu l'AQ, mais également de limiter la destruction tissulaire, observée lors de la coloration H&E.

L'immunofluorescence a permis de quantifier la perte neuronale et l'activation de la caspase-3. La perte neuronale massive observée chez les rats AQ a été significativement ($p > 0,05$) réduite par le C16. L'activation de la caspase-3 n'a été observée que dans le striatum ipsilatéral des animaux ayant reçu l'AQ et est significativement ($p < 0,05$) diminuée par le C16.

Manuscript Number: NCI-D-13-00173R2

Title: The specific PKR inhibitor C16 prevents apoptosis and IL-1 β production in an acute excitotoxic rat model with a neuroinflammatory component

Article Type: Research Article

Keywords: Neuroinflammation; PKR; Caspase-3; Oxindole/Imidazole C16; Cytokines; Neuroprotection

Corresponding Author: Mrs claire tronel,

Corresponding Author's Institution:

First Author: claire tronel

Order of Authors: claire tronel; Guylène Page, Professor; Sylvie Bodard; Sylvie Chalon; Daniel Antier

Abstract: The double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR), an apoptotic inducer, regulates much pro-inflammatory cytokine production. The purpose of this study was to evaluate in vivo the effects of the specific PKR inhibitor C16 in the striatum in an acute excitotoxic rat model with an important neuroinflammatory component. Inflammation was induced by unilateral striatal injection of quinolinic acid (QA) in 10-week-old normotensive rats. Animals were separated into groups receiving either vehicle or C16 for both Sham and QA rats. The effects were assessed in ipsi- and contralateral striata by immunoblotting for PKR activation, by Luminex assay for cytokine levels and by immunofluorescent staining for cleaved caspase-3 to detect neuronal apoptosis. The highest dose of C16 (600 μ g/kg; C16-2) in QA rats reduced expression of the active catalytic domain of the PKR vs that in vehicle-injected QA rats. A robust increase of IL-1 β levels on the contralateral side of QA rats was prevented by C16-2 (97% inhibition). Macroscopic and microscopic observation of cerebral tissue (Hematoxylin & Eosin staining) revealed that tissue integrity was more preserved with C16-2 treatment than its vehicle in QA rats. Furthermore, C16-2 treatment decreased by 47% the neuronal loss and by 37% the number of positive cleaved caspase-3 neurons induced by QA injection. In conclusion, C16 prevented not only the PKR-induced neuronal loss but also the inflammatory response in this acute excitotoxic in vivo model, highlighting its promising neuroprotective properties to rescue acute brain lesions.

NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL- RESEARCH ARTICLE

Title: The specific PKR inhibitor C16 prevents apoptosis and IL-1 β production in an acute excitotoxic rat model with a neuroinflammatory component

Authors: ^{1,2}C Tronel, ³G Page, ^{1,2}S Bodard, ^{1,2}S Chalon, ^{1,2}D Antier

1. INSERM U930, Tours, France
2. Université François Rabelais de Tours, UMR U930, Tours, France
3. EA 3808 University of Poitiers "Molecular Targets and Therapeutics of Alzheimer's disease (CiMoTheMA)" - 6 rue de la Milétrie, BP 199, 86034 Poitiers, France

Corresponding author:

Claire Tronel

UMR Inserm U 930

Université François Rabelais - UFR Pharmacie

31 Avenue Monge, Tours, France

Tel 33(0) 247 367 243

Fax 33(0) 247 367 224

email: claire.tronel-2@etu.univ-tours.fr

Abstract

The double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR), an apoptotic inducer, regulates much pro-inflammatory cytokine production. The purpose of this study was to evaluate *in vivo* the effects of the specific PKR inhibitor C16 in the striatum in an acute excitotoxic rat model with an important neuroinflammatory component. Inflammation was induced by unilateral striatal injection of quinolinic acid (QA) in 10-week-old normotensive rats. Animals were separated into groups receiving either vehicle or C16 for both Sham and QA rats. The effects were assessed in ipsi- and contralateral striata by immunoblotting for PKR activation, by Luminex assay for cytokine levels and by immunofluorescent staining for cleaved caspase-3 to detect neuronal apoptosis. The highest dose of C16 (600 µg/kg; C16-2) in QA rats reduced expression of the active catalytic domain of the PKR vs that in vehicle-injected QA rats. A robust increase of IL-1 β levels on the contralateral side of QA rats was prevented by C16-2 (97% inhibition). Macroscopic and microscopic observation of cerebral tissue (Hematoxylin & Eosin staining) revealed that tissue integrity was more preserved with C16-2 treatment than its vehicle in QA rats. Furthermore, C16-2 treatment decreased by 47% the neuronal loss and by 37% the number of positive cleaved caspase-3 neurons induced by QA injection.

In conclusion, C16 prevented not only the PKR-induced neuronal loss but also the inflammatory response in this acute excitotoxic *in vivo* model, highlighting its promising neuroprotective properties to rescue acute brain lesions.

Keywords: Neuroinflammation; PKR; Caspase-3; Oxindole/Imidazole C16; Cytokines; Neuroprotection.

1. Background

Neuroinflammation is known as an important element of neurodegenerative diseases (Glass et al., 2010) and is considered as a consequence of microglia activation responsible for a pro-inflammatory cascade that results in the release of chemokines, cytokines, reactive oxygen species and proteolytic enzymes (Mennicken et al., 1999; Kalaria, 1999). Amongst investigated treatment strategies to down-regulate the inflammation in brain, we can mention the immunotherapy approach which aims to control the immune system and direct it against the pathological features of Alzheimer's (AD) and Parkinson's (PD) diseases, amyotrophic lateral sclerosis (Zotova et al., 2010; Panza et al., 2012; Gendelman and Appel, 2011; Schneeberger et al., 2012) and of course anti-inflammatory drugs (Hoozemans et al., 2011; Whitton, 2010; Chen et al., 2011). Many experimental studies have been carried out in animal models to explore the effects of anti-inflammatory treatments against neurodegeneration, some demonstrating that treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (McGeer and McGeer, 2007; Gupta et al., 2011) or nitric oxide-releasing NSAIDs (Doherty, 2011; Jantzen et al., 2002) could have a beneficial effect. However, prospective anti-inflammatory strategies against disease progression in human subjects with neurodegenerative pathologies have failed to show significant positive results (Gagne and Power, 2010).

Highlighting the molecular mechanisms involved in inflammation has led to new targeted therapeutic strategies such as anti-Nuclear Factor- κ B, anti-Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists for neurodegenerative disorders (Paris et al., 2010; Tobinick and Gross, 2008; Martin et al., 2012; Chiang et al., 2012). Among the molecular mechanisms, it was also demonstrated that the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) interacts with the signaling pathway of NF- κ B (Gil et al., 2004) and is involved in degenerative diseases (Bando et al., 2005).

PKR is a serine/threonine stress kinase, which is activated by several agents like interferon alpha or calcium leading to its autophosphorylation (Peel and Bredesen, 2003). PKR is involved in the regulation of the expression of a wide range of cytokines as PKR inhibition greatly decreased TNF α and interleukin (IL)-1 β , IL-6 production in various models (Couturier et al., 2010a; Couturier et al., 2011, Lu et al., 2012). On the contrary, activated PKR has been associated with the pathogenesis of conditions characterized by a massive neuronal loss and PKR is known for its property to induce apoptosis (Balachandran et al., 1998; Balachandran et al., 2000; Morel et al., 2009) with up-regulation of Fas and Bax and activation of caspase-3 involved (Field et al., 2010). We showed that specific inhibition of PKR at the peripheral level could decrease the inflammatory response in peripheral blood mononuclear cells from AD patients, making the use of pharmacological PKR inhibition a potential strategy against cerebral inflammation (Couturier et al., 2010b).

Several compounds have already been used to inhibit PKR. A cell-permeable peptide was reported to protect SH-SY5Y cells from β -amyloid peptide-induced apoptosis (Page et al., 2006). Furthermore, in this cellular model the oxindole/imidazole derivative C16 prevented not only PKR-phosphorylation but also the activation of caspase-3 induced by A β (Couturier et al., 2010a), confirming published data reporting the protective effect of C16 treatment against the neuronal cell death induced by endoplasmic reticulum-stress in SH-SY5Y cells (Shimazawa and Hara, 2006). The C16 is able to inhibit the autophosphorylation of PKR and to unlock the translation blockade induced by PKR in primary neuronal cultures (Morel et al., 2009). *In vivo* approaches allow an evaluation of the brain response while maintaining the connections between cellular populations like neurons known for producing inflammatory mediators (Griffin et al., 2006; Murphy et al., 1999; Botchkina et al., 1997). However, only a few experimental results relating to *in vivo* investigations of C16 effects are available, one in rat pups and another in an APPswePs1dE9 mouse model of AD, showing that an

intraperitoneal C16 treatment prevents cerebral activation of PKR and neuroinflammation in early stages of disease (Ingrand et al., 2007; Couturier et al., 2012) but no acute cerebral inflammation model has been used in that purpose so far.

The acute excitotoxic rat model with an important neuroinflammatory component obtained by unilateral striatal injection of quinolinic acid (QA) is a described model of Huntington's disease (Schwarz and Köhler, 1983). It has recently been shown to be useful to study the over expression of the translocator protein (TSPO) as a relevant marker of neuroinflammation (Arlicot et al., 2008). QA is a strong agonist of glutamate NMDA (*N*-methyl-*D*-aspartate) receptors. Over activation of NMDA receptors causes a massive intracellular influx of calcium that leads to neuronal death by activation of various enzymes (lipases, proteases, endonucleases) triggering different cell components then leading to neuronal death (Estrada Sánchez et al., 2008). Factors released during the death of neurons rapidly lead to massive microglial activation.

Therefore, the purpose of the present study was to evaluate *in vivo* the effects of the specific PKR inhibitor C16 on PKR activation and cleaved caspase-3 expression, on neuron survival and on pro- and anti inflammatory cytokine production in the striatum of this acute neuroinflammatory rat model.

2. Methods

2.1. Chemical Products

Sodium fluoride (NaF), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), protease and phosphatase inhibitor cocktails, dithiothreitol (DTT), paraformaldehyde (PFA), DAPI, Eukitt® quick-hardening mounting medium and all reagent-grade chemicals for buffers were purchased from Sigma (St Quentin Fallavier, France); NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gels, NuPAGE® LDS 4X LDS Sample Buffer, NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X), NuPAGE® MES

SDS Running Buffer, Seeblue[®] Plus2 pre-stained standard and NuPAGE[®] Antioxidant, iBlot[®] Gel Transfer Device (EU) from Gibco-Invitrogen (Fisher Bioblock Scientific distributor, Illkirch, France); the imidazolo-oxindole compound C16 from Merck Chemicals Calbiochem[®] (Nottingham, UK). For western blot, primary antibodies and secondary anti-rabbit IgG antibody conjugated with Horseradish Peroxydase were purchased from Cell Signalling (Ozyme, St Quentin Yvelines, France) except the anti-P_{T451}-PKR which was obtained from Eurogentec (Seraing, Belgium), anti- β tubulin from Sigma (St Quentin Fallavier, France), peroxidase-conjugated anti-mouse IgG from Amersham Biosciences (Orsay, France), IgG- and protease-Free Bovine Serum Albumin (BSA) from Jackson ImmunoResearch. Rat cytokine/chemokineLuminex custom 4-plex kits (for TNF- α , IL-1- β , IL-4 and IL-10), Mayer's hemalum solution and eosin Y solution 0.5% aqueous were purchased from Millipore (St Quentin Yvelines, France). For immunofluorescence and immunohistochemistry, primary antibodies were purchased from Millipore (Molsheim, France) for anti-NeuN, Cell Signalling (Ozyme, St Quentin Yvelines, France) for anti-cleaved caspase-3. Secondary antibody TRITC and fluorescent mounting medium are from DakoCytomation (Trappes, France). Secondary antibody FITC was from Rockland (Tebu-Bio, Le-Perray-en-Yvelines, France).

2.2. Animals

Normotensive male Wistar rats (Animal housing René Janvier, France), weighing ~350 g were used for this study. The experiments were performed in accordance with the requirements of the European Community Directive 2010/63/EU and approved by the local ethical committee (agreement n°2012-03-1). Rats were kept in a temperature- (22 +/- 1°C) and hygrometry- (40 +/- 7%) controlled environment under a 12-h light-dark cycle with food

and water available *ad libitum*. A total of 62 animals were used for the experiments described below. All efforts were made to minimize animal suffering and discomfort.

2.3. Excitotoxic neuroinflammatory model

We used an *in vivo* model of unilateral striatal excitotoxic lesion in 10-week-old male normotensive rats displaying a high activation of astroglial cells (Gil et al., 2004). Rats were anaesthetized with isoflurane (4% for induction and 2% for maintenance) and placed in a stereotaxic David Kopf apparatus (tooth bar: -3.3 mm). The animals were unilaterally injected with 150 nmol of quinolinic acid (QA; Sigma; dissolved in 0.1 M PBS, pH = 7.4) into the right striatum (injection rate: 0.5 μ L/min) using a 25- μ L microsyringe (Hamilton) and a micropump (KD Scientific). QA (2 μ L) was injected at the following coordinates: AP: +0.7 mm; ML: -3 mm; DV: -5.5 mm from bregma according to Paxinos and Watson (1986). The animals body temperature ($36.9 \pm 0.6^\circ\text{C}$) was monitored during the surgery by using a thermal probe. The injection syringe was left in place for an additional 4 min to avoid QA backflow, and then slowly removed. The scalp was sutured and animals replaced into their cages and examined daily until sacrifice.

2.4. Treatment with the PKR inhibitor: the compound C16

The oxindole/imidazole derivative C16 at the concentrations of 60 (C16-1) or 600 (C16-2) μ g/kg of body weight (injected volume: 800 μ L) was injected intraperitoneally (i.p.) 24h, 2h before QA injection and 24h post-QA injection (2h before sacrifice). Stocked solutions of C16 were prepared in DMSO (final concentration: 0.5%). Animals were separated into 6 groups (n=8 per group) as follows: Sham (2 μ L PBS intrastriatal; DMSO i.p.); C16-1 (2 μ L PBS intrastriatal; C16 at 60 μ g/kg i.p.); C16-2 (2 μ L PBS intrastriatal; C16 at 600 μ g/kg i.p.);

QA (2 μ L QA 150 nmol; DMSO i.p.); QA-C16-1 (2 μ L QA 150 nmol; C16 at 60 μ g/kg i.p.) and; QA-C16-2 (2 μ L QA 150 nmol; C16 at 600 μ g/kg i.p.).

2.5. Immunoblotting

Rats were killed by decapitation following deep isoflurane anesthesia (2 minutes; 4%) and both ipsi- and contra-lateral striatum were dissected from brain tissue. Striatum have been homogenized in 20 volumes of lysis buffer (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) and supplemented with 50 mM NaF, 1 mM PMSF, protease and phosphatase inhibitor cocktails (50 μ L/g of tissue and 10 μ L/mL of lysis buffer, respectively) as previously described (Couturier et al., 2012). Lysates were sonicated and centrifuged at 15, 000g for 15 min at 4°C. The resulting supernatants (dilution 1/200) were collected to measure the quantity of total protein with the Qubit[®] fluorescence detector (Life Technologies, Saint Aubin, France). Samples were stored at -80°C until western blot (WB) analysis and luminex assay as described below.

Samples (30 μ g proteins of striatal lysates) were prepared for electrophoresis by adding NuPAGE[®] LDS 4X LDS sample buffer and NuPAGE[®] Sample Reducing Agent (10X). The samples were heated up to 100°C for 5 min, loaded into 4-12% NuPAGE[®] Novex[®] Bis-Tris Mini Gels, and run at 200 V for 35 min in NuPAGE[®] MES SDS running buffer containing 0.5% NuPAGE[®] antioxidant. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes using the iBlot[®] Dry blotting system (Life Technologies, Saint Aubin, France) set to program 20V for 7 min. Membranes were washed for 10 min in Tris-buffered saline/Tween (TBST: 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.05% Tween 20) and blocked 2 h in TBST containing 5% bovine serum albumin and 0.21% of NaF. Blots were incubated with primary antibody in blocking buffer overnight at 4°C. The antibodies used were rabbit anti-P_{T451}-PKR (1:100) which detect threonine 451 phosphorylated from both full-length (74kDa) and catalytic

fragments of PKR (35kDa) and rabbit anti-total PKR (1:500), rabbit anti-P_{S51}-eIF2 α and rabbit anti-total eIF2 α (38kDa). eIF2 α is a translation factor which can be phosphorylated by PKR. The membranes were washed twice with TBST and incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibody either anti-rabbit or anti-mouse IgG (1:1000) depending on the origin of primary antibody for 1 hour at room temperature (RT). The membranes were washed again and exposed to the chemiluminescence ECL luminol plus WB system (Amersham Biosciences, Orsay, France) followed by signal capture with the Gbox system (GeneSnapTM, Syngene, Ozyme distributor, Montigny-Le-Bretonneux, France). After 2 washes in TBST, the membranes were probed with mouse antibody against tubulin (1:10000) overnight at 4°C. They were washed with TBST, incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody anti-mouse (1:1000) for 1 h, exposed to the chemiluminescence ECL luminol WB system and the signals were captured. Automatic image analysis software was supplied with GeneToolsTM (Syngene, Ozyme distributor, Montigny-Le-Bretonneux, France). Protein/tubulin (housekeeping protein) *ratios* were calculated and are displayed in the corresponding figures.

2.6. Luminex assay

We quantified the expression levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α as well as the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10 in both contra- and ipsilateral striatum of all groups of rats (sham; C16-1; C16-2; QA; QA-C16-1; QA-C16-2; n=8 for each group).

Striatum tissues were prepared and the supernatant protein concentration measured as previously described (see Immunoblotting section). The Rat cytokine Luminex custom 4-Plex kit reagents were used at 25°C according to the user manual to evaluate interleukins for TNF- α (sensitivity: 2 pg/mL), IL-1 β (sensitivity: 15 pg/mL), IL-4 (sensitivity: 2 pg/mL) and IL-10 (sensitivity: 2 pg/mL) expression patterns. The assay was performed in 96-well plates

and all reagents were prepared according to the manufacturers' instructions. The wells were pre-wet with 200 μ L of assay buffer for 10 min at RT on a plate shaker set at 500 rpm and the plate blotted on paper towels to remove excess fluid. Each standard (25 μ L) from a range of concentrations (20,000 to 4.9 pg/mL) (assay buffer was used as a blank); quality control preparations, lysis buffer (as background) and samples were added to the relevant wells. Then 25 μ L of assay buffer were added to each well. The mixed magnetic bead solution was sonicated and vortexed prior to adding 25 μ L into each well. The plates were sealed and incubated with agitation on a plate shaker (at 800 rpm) overnight at 4°C in a darkroom.

After incubation, the magnetic beads were washed twice with 200 μ L/well wash buffer and wash buffer was removed after connecting the 96-well plate to the magnetic stand to hold the beads followed by the addition of 25 μ L biotinylated detection antibodies in each well and incubation for 1h at RT on the plate shaker (at 800 rpm) in a darkroom. Without washing, 25 μ L/well streptavidin-phycoerythrin solution was added, and the plates were incubated for another 30 min at RT on a plate shaker, protected from direct light.

After staining was complete, the microbeads were washed twice with 200 μ L/well wash buffer and were resuspended in 150 μ L/well of Luminex sheath fluid on a plate shaker for 5 min at RT before analyzing. The assay was carried out on a Luminex 200™ instrument using Exponent software (Luminex Corp., Austin, TX). Fifty events (beads) were collected for each cytokine/sample and median fluorescence intensities (MFIs) were obtained and converted to concentrations using results from a standard cytokine preparation. The concentration of each analyte for each sample (pg/mL) was calculated using a five parameter logistic fit curve generated for each analyte from the seven standards using Exponent™ software. The concentrations of each analyte in samples were expressed in pg/mg protein.

2.7. H&E staining and immunofluorescence procedure

Fourteen rats were separated into 4 groups as follows: Sham (PBS intrastratial; DMSO i.p.; n=3); C16-2 (PBS intrastratial; C16 at 600µg/kg i.p.; n=3); QA (QA 150 nmol/2µL intrastratial; DMSO i.p.; n=4); QA-C16-2 (2 µL QA 150 nmol; C16 at 600µg/kg i.p.; n=4). Rats were euthanized 24h post-surgery by intracardiac perfusion to avoid signal noise caused by blood auto fluorescence. Animals were deeply anesthetized by i.p. injection of pentobarbital (50 mg/kg; Céva Santé Animale, Paris, France), perfused through the heart with 250 mL of heparinized saline (1 UI/mL of saline) before the brains were removed and snap-frozen at -80°C.

Briefly, coronal sections (8µm thickness) of striatum were made for hematoxylin and eosin (H&E) staining (Millipore, St Quentin Yvelines, France). Slices were immersed in hemalum for 5 min, and then rinsed with tap water. The nuclear staining achieved in eosin aqueous solution during 2 min. Slides were washed in water and dehydrated in ascending alcohol solution and xylene before mounting on glass slide with EukittTM mounting medium (Sigma, St Quentin Fallavier, France).

Coronal sections (8 µm) of striatum were also used for the immunofluorescence of neurons (NeuN, Millipore, Molsheim, France), cleaved caspase-3 (Asp175, Cell Signalling, Ozyme, St Quentin Yvelines, France) and nucleus with DAPI (Sigma, St Quentin Fallavier, France).

Caspase-3 plays a key role in apoptosis and is activated by both extrinsic and intrinsic pathways. Activation of caspase-3 requires the cleavage of procaspase, making cleaved caspase-3, a characteristic marker of apoptosis. Slices were fixed in paraformaldehyde (PFA) 4% (Sigma, St Quentin Fallavier, France) for 30 min, staining 1h at RT in a buffer to enhance cell permeability and to block non-specific sites (PBS 0.1M/ 0.3% Triton X-100/ 5% horse serum) before incubation with both primary antibody NeuN (1:500) and cleaved caspase-3

(1:50) diluted in PBS/0.3% triton X-100/1% horse serum) overnight at 4°C. The slices were incubated 1h at RT with the mix containing secondary antibodies: swine anti-mouse fluorescein isothiocyanate isomer 1 (FITC) (1:200), and goat anti-rabbit conjugated with tetramethyl rhodamine isomer R (TRITC) (1:200) diluted in PBS/0.3% triton X-100/1% horse serum. The slices were washed twice in distilled water and incubated with DAPI (1µg/mL) for 15 min. After 3 washings in distilled water, the slices were mounted with fluorescent mounting medium (DakoCytomation, Trappes, France) and kept at 4°C.

Multiple labeled samples were examined with a spectral confocal FV-1000 station installed on an inverted microscope IX-81 (Olympus, Tokyo, Japan) with Olympus Uplansapo X60 water, 1.2 NA, objective lens. Fluorescence signal collection and image construction were performed using the control software (Fluoview FV-AS10, Olympus). Multiple fluorescence signals were acquired sequentially to avoid cross-talk between image channels. Fluorophores were excited with 405 nm line of a diode (DAPI), 488 nm line of an argon laser (FITC), 543 nm line of an HeNe laser (TRITC). Emitted fluorescence was detected through spectral detection channels between 425-475 nm and 500-530 nm, for blue and green fluorescence, respectively and through a 560 long pass filters for red fluorescence. The images were merged as an RGB image.

Neurons and activated caspase-3 cell counting and corresponding merges were performed with Image J software (Rasband, WS, Image J, US National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) in 3 areas per hemisphere for each slice and 3 slices per rat. Slices were chosen close to the site of injury (bregma – 3 mm). Cells were counted using a non-stereological approach. The percentage of neurons loss in ipsi- *versus* contra-lateral hemisphere was calculated as was the number of cells or neurons expressing cleaved caspase-3 in ipsilateral hemisphere too.

2.8. Statistics

Results are expressed as means $\pm$ SEM. Data for multiple variable comparisons was analysed by a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's Multiple Comparison test using GraphPad™ Prism version 5 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). The level of significance was $p < 0.05$.

3. **Results**

The influence of the acute treatment with PKR-inhibitor C16 on PKR activation and cleaved caspase-3 expression and on pro- and anti inflammatory cytokine production was evaluated in striatum of contra- and ipsilateral cerebral hemispheres for all groups. Potential C16 dose-dependent effect has been highlighted by comparing results obtained with 60 and 600 mg/kg administered to animals in C16-1 and C16-2 groups, respectively.

3.1. Effects of C16 treatment on striatal PKR activation

PKR consists of two functionally distinct domains: an amino-terminal regulatory domain and a carboxyl-terminal catalytic domain (Meurs et al., 1990). The regulatory domain consists of two dsRNA-binding motifs, followed by a spacer. Binding of dsRNA exposes the catalytic site and induces dimerization of PKR. Dimerization allows autophosphorylation, rendering PKR active (Ung et al., 2001). However, dsRNA-independent protein activators of PKR, such as PACT (human) and RAX (mouse) have been identified (Singh and Patel, 2012; Patel and Sen, 1998; Ito et al., 1999). Furthermore, the T₄₅₁ phosphorylated site in the PKR activation loop was required *in vitro* and *in vivo* for the high-level kinase activity (Romano et al., 1998). During apoptosis, WB analysis revealed that PKR is cleaved by caspase-3, releasing the COOH-terminal part of the protein corresponding to the catalytic kinase domain (KD) of PKR (Saelens et al., 2001; Suen et al., 2003). The specific antibody anti-P_{T451}-PKR used detects

both full-length and catalytic KD of PKR at 74kDa and 35kDa, respectively. The antibody also detects two bands of full-length of PKR as previously described in rodent brain tissue and some cell line (Page et al., 2006; Kalai et al., 2007; Vantelon et al., 2007). The second band could be due to an isoform or an alternative splicing of the PKR. The two bands have been quantified in this work. It was demonstrated that the released KD domain of PKR is constitutively active (Saelens et al., 2001), which is well supported by structure studies (Wu and Kaufman, 1997). Moreover, the caspase-generated fragments of PKR cooperate to activate full-length PKR and amplify the translation inhibitory signal (Kalai et al., 2007). We first checked if the *in vivo* model displayed a significantly increased level of P_{T451}-PKR by WB before evaluating, in a second period, the influence of the PKR inhibitor C16 acute treatment in both ipsi- (hemisphere of the QA injection) and contralateral striatum. As shown in figure 1, QA injection induced a significant decrease of full-length P_{T451}-PKR levels (82% inhibition, $p < 0.01$) and on the contrary a robust increase of catalytic KD P_{T451}-PKR levels (959% increase, $p < 0.05$) in ipsilateral striatum compared to the contralateral side. No modification of P_{T451}-PKR levels was observed in ipsilateral side of sham rats (Figures 1A and 1B). In addition, QA injection induced a significant increase of total PKR in the ipsilateral striatum compared to the contralateral side (253% increase, $p < 0.001$) while in sham rats this increase was not significant.

In these conditions, we studied the effects of C16 used as a specific inhibitor of PKR. Two concentrations were i.p. injected before and after QA injection: 60 (C16-1) and 600 $\mu\text{g/kg}$ (C16-2). Results of PKR immunoreactivity showed that neither C16-1 nor C16-2 alone modified the levels of phosphorylated forms of PKR (Figures 1A and 1B). The treatment with C16-1 did not modify QA-induced PKR immunoreactivity (82% of inhibition and 293% of activation for full length and KD domain, respectively) but it is noteworthy that the highest dose (C16-2) greatly reduced the KD P_{T451}-PKR level (93% inhibition, $p < 0.01$). The decrease

of full-length P_{T451}-PKR level was not significant in QA-C16-2 rats (Figure 1A).

Interestingly, C16-2 decreased the levels of total PKR observed in QA ipsi striatum but not C16-1 (Figure 1C). Compared to C16-1, the dose C16-2 prevents the cleavage of full-length of P_{T451}-PKR level (Figures 1A and 1B) and the increase of total PKR (Figure 1C), therefore we selected this dose for all other experiments.

3.2. Effects of C16 treatment on striatal eIF2 α expression

In figure 2, results showed the expression of eIF2 α , a well-known downstream substrate of PKR. Indeed, PKR phosphorylates eIF2 α , leading to the inhibition of the protein synthesis initiation (Dalton et al., 2012; Williams, 1999). Rats receiving C16-2, QA or QA-C16-2 displayed an increase of P_{S51}-eIF2 α in both contra- and ipsi-lateral sides compared to sham rats (between 130 and 210% of increase). Expression of total eIF2 α showed variability within groups of rats and no significant difference was seen, although the rate of total eIF2 α would tend to increase in the groups that received C16-2 except that in the ipsilateral striatum injured by QA which was comparable to the control (Figure 2B). However, calculated *ratio* P_{S51}-eIF2 α /total eIF2 α showed a great and significant increase ($p < 0.05$) in QA ipsilateral striatum compared to ipsilateral striata from sham, C16-2 and QA-C16-2 rats (365%, 245% and 261%, respectively) (Figure 2C).

3.3. Effects of C16 treatment on macroscopic and microscopic striatal tissue integrity

No difference was observed between Sham and C16-2 animals (Figure 3). However, QA rats showed massive tissue impairment in ipsilateral hemisphere. However, QA-C16-2 group displayed better tissue integrity, with rescue of striosomes contrary to QA animals.

3.4. Effects of C16 treatment on pro- and anti inflammatory cytokine production

We compared by Luminex™ assay the levels of cytokines IL-1 β , TNF α , IL-4 and IL-10 in the striatum of sham, C16-1, C16-2, QA, QA-C16-1 and QA-C16-2 animals. A robust increase of IL-1 β levels in the contralateral striatum of QA rats was significantly prevented by C16-2 (97% inhibition; $p < 0.01$). The treatment of C16-2 in PBS-injected rats has no effect on IL-1 β compared to sham (Figure 4A). For IL-4 and IL-10, no significant difference was observed (Figures 4C and 4D). All amounts of TNF- α were very low and close to the limit of detection and no difference was observed between groups (Figure 4B).

3.5. Effects of C16 treatment on neuron survival and cleaved caspase-3 expression

Neuronal loss, expression of cleaved caspase-3 and neurons expressing cleaved caspase-3 have been analyzed in contra- and ipsi-lateral striatum of Sham (n=3), C16-2 (n=3), QA (n=4) and QA-C16-2 (n=4) groups (Figure 5). Immunofluorescence showed that cleaved caspase-3 was only expressed in ipsilateral striatum of rats exposed to QA (Figure 5 A.1 *versus* A.2). Treatment with C16 at 600 μ g/kg significantly ($p < 0.05$) decreased the number of cells expressing cleaved caspase-3 (30.3 ± 1.8 vs 19.2 ± 2.8 cells in QA and QA-C16-2 groups, respectively) (Figure 5 A.3). For neurons, manual counting was performed in contra- and ipsi-lateral hemispheres (Figures 5 B.1 and B.2, respectively) and percentage of neuronal loss in ipsilateral striatum was calculated (Figure 5 B.3). Since cells were counted using a non-stereological approach, the number of cells detected in the ipsilateral striatum is most likely an over-estimate because of cell shrinkage. Neuronal loss was significantly ($p < 0.01$) increased in both QA (41.3 ± 5.8 %) and QA-C16-2 (21.6 ± 3.0 %) vs Sham (5.6 ± 0.1 %) and C16-2 (6.9 ± 2.3 %) groups but the C16 treatment significantly ($p < 0.01$) decreased the neuronal loss induced by QA injection in QA-C16-2 rats.

Merge images of NeuN and cleaved caspase-3 are represented in Figure 5C. Cleaved caspase-3 is only expressed in ipsilateral striatum of QA and QA-C16-2 animals (Figure 5C.1

vs C.2). Counting of neurons expressing cleaved caspase-3 was performed in ipsilateral striatum of these 2 groups. The number of neurons expressing cleaved caspase-3 in ipsilateral striatum is significantly ($p < 0.05$) decreased by C16-2 treatment (Figure 5 C.3).

4. Discussion

We report here the effects of treatment with the specific stress kinase PKR inhibitor oxindole/imidazole derivative C16 in an *in vivo* excitotoxic neuroinflammatory rat model. The model we used is based on injection in the striatum of the quinolinic acid (QA), an excitotoxic organic acid agonist of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors able to induce brain toxicity and which has been implicated in dementia in old age or AD. Preliminary experiments aimed to check that this model generates PKR activation. The QA injection induced a considerable decrease of full-length P_{T451}-PKR which was cleaved in an apoptotic environment and produced a significant increase of its C-terminal phosphorylated fragment, the KD P_{T451}-PKR, known to be constitutively active (Saelens et al., 2001), as is borne out by structure studies (Wu and Kaufman, 1997). Furthermore, the caspase-induced cleavage of active PKR leads to the release of an N-terminal unphosphorylated fragment (ND fragment) which is not recognized by the antibody against total PKR. The caspase-generated fragments of PKR (ND and KD PKR fragments) cooperate to activate full-length PKR. Specifically, PKR-ND facilitates the interaction of PKR-KD with full-length PKR and thus the activation of the kinase, and amplifies the translation inhibitory signal (Kalai et al., 2007). The phosphorylated form of PKR is cleaved predominantly in ipsilateral striatum of QA-injected rats and thus the total form at 74kDa could correspond especially to the non-phosphorylated form. The increased expression of total PKR could be related to a compensatory mechanism to maintain PKR production for its phosphorylation.

Thereafter, the impact of the C16 administered was evaluated on the expression levels of both PKR and cleaved caspase-3, on neuronal survival and, on pro- and anti-inflammatory cytokines production in striatum. The study paid particular attention to the potential dose-related effects of C16 as animals received either 60 or 600 µg/kg of the compound 24-hour and 2-hour before and 24h after QA injection. The choice of studied doses was based on the local experience in 7-day old rats which received C16 i.p. at concentrations up to 167 µg/kg and in a transgenic AD model treated with C16 i.p. at 0.5 mg/kg every three days for 3, 9 or 15 months (Ingrand et al., 2007; Couturier et al., 2012). Animals' behaviour (fear, aggressiveness, suffering, and pain) and body weight were monitored from the onset of the C16 treatment to the sacrifice and no difference between C16-1 and C16-2 groups was noticed.

In the striatum we systematically compared data from matching cerebral hemispheres. Our main result concerns the highest dose of C16 (600 µg/kg) which significantly reduced the KD P_{T451}-PKR expression in the striatum. Thus, C16-2 prevented the caspase-cleavage of active PKR, leading to a decrease of its KD fragment as shown by the decreased KD P_{T451}-PKR in the ipsilateral striatum compared to the contralateral side.

To validate the activation of PKR in this model, we also studied the expression of total and phosphorylated forms of eIF2α, a well-known substrate of PKR. Its phosphorylation by active PKR on serine 51 results in its inactivation and in a severe decline in *de novo* protein synthesis (Donnelly et al., 2013). Results showed a significant increase in the *ratio* of P_{S51}-eIF2α / total eIF2α in ipsilateral striatum of QA-injected rats, suggesting great protein synthesis impairment. These results were in accordance with the severe destruction of the striatum integrity observed with H&E staining. Interestingly, C16-2 treatment in QA-lesioned rats rescued the activation of PKR/eIF2α signalling pathway with a more preserved tissue quality than QA rats treated with the C16 vehicle.

By inhibiting the PKR/eIF2 α signalling pathway, C16-2 showed neurohistoprotective properties after systemic i.p. injection. Then we wanted to know if it can rescue the toxicity of QA on inflammation, apoptosis and neuronal death because active PKR was also involved in the cytokine production and apoptosis in infected (Gil and Esteban, 2000; Garcia et al., 2006) and in neurodegenerative disease models (Chang et al., 2002; Couturier et al., 2011; Page et al., 2006).

The *in vivo* acute excitotoxic model with a neuroinflammatory component induces microglia activation (Arlicot et al., 2008) and potentially increases cytokine production in cerebral structures. Assays performed with the Luminex™ allowed us to compare the levels of cytokines IL-1 β , TNF α , IL-4 and IL-10 between contra- and ipsilateral striatum in sham, QA, and C16-2-treated animals. Contrary to expected results, neuroinflammatory response has not been observed in the ipsilateral side of QA rats but rather in the contralateral side marked by a robust increase of IL- β levels. As discussed above, the robust toxicity of QA in the ipsilateral side by activating PKR and inhibiting its downstream substrate eIF2 α led to metabolism alteration such as translational machinery. The inflammatory response of the contralateral side may be related to disruption of the blood brain barrier (BBB) by QA, allowing various pro-inflammatory actors including free radicals, cytokines, chemokines and proteolytic enzymes to disseminate, which can induce glial reactivity. Indeed, it is known that QA induces a disruption of BBB after *in vivo* injection (Reynolds and Morton, 1998; Vezzani et al., 1989). Furthermore, QA is a metabolite of kynurenine (KYN) which is an intermediate in the pathway of the metabolism of tryptophan to nicotinic acid and can be produced by endothelial cells and pericytes and further metabolized in QA by perivascular macrophages and microglia (Owe-Young et al., 2008). Both acute (e.g. ischemic stroke) and chronic (e.g. Huntington's disease) brain disorders have been demonstrated to involve multiple imbalances of KYN pathway metabolism with increase of QA production (Zádori et al., 2012). Thus, QA

could be also produced in the contralateral side and induce inflammation by its excitotoxic effects.

The major observation was prominently a decrease of IL-1 β in the contralateral side of QA-C16-2 groups *versus* the contralateral side of QA rats. IL-1 β plays a central role in the neuroinflammatory process which has been demonstrated for example in IL-1 receptor-knockout mice where lack of IL-1 signalling was associated to attenuation in microglial activation and pro-inflammatory cytokine expression (Lin et al., 2006). In a previously published study, we showed that the specific inhibitor of PKR C16 was responsible for decreasing pro-inflammatory cytokine (IL-1, IL-6 and TNF α) production in peripheral blood mononuclear cells from AD patients and in an APPswePS1dE9 transgenic model of AD at 12-months of age (Couturier et al., 2010a; Couturier et al., 2012). Furthermore, a recent paper underlines the crucial role of PKR in inflammasome activation *in vitro* and indicates that it should be possible to pharmacologically target this molecule to treat inflammation (Lu et al., 2012). Here, we showed that PKR inhibitor C16 prevented *in vivo* the production of IL-1 β induced in an acute excitotoxic *in vivo* model. However, in QA-injected rats, we showed that C16 prevented PKR activation in the side without detectable inflammatory factors in this damaged tissue and prevented inflammation in the contralateral side where the PKR activation was not observed. The C16 compound could have other molecular targets controlling inflammatory response than the PKR pathway but determining these new targets would require a broad screening of the kinome cell. Recently, we observed that C16 prevented inflammatory stress by inhibiting the autophagosome accumulation induced by IL-1 β *in vitro* (data not published). It is well established now that active autophagy flux limits the production of IL-1 β by degradation of inflammasome proteins (Shi et al., 2012; Dupont et al., 2011; Harris et al., 2011).

Contrary to IL-1 β , no significant difference for the other cytokines TNF α , IL-4 and IL-10 was noticed between groups in the present work. Considering TNF α , studies have shown that the administration of IL-1 receptor antagonist resulted in reduction in TNF α and limited the loss of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's (Koprach et al., 2008). Therefore we were expecting an influence of C16 treatment on this cytokine too but Luminex™ measurements were mostly down off the scale (Figure. 2B) and did not allow us to quantify the cytokine production accurately. It has been reported the very low basal level of TNF- α and other cytokines in the cortex and hippocampus of adult rats at 18h post-lesion (Taupin et al., 1993). At 24h-post lesion, IL-1 β was the most relevant cytokine among those studied and C16 remarkably prevented its production in contralateral side parallel to partially rescue neuronal death in ipsilateral side.

The immunofluorescence methodology allowed the visualizing and measuring of cleaved caspase-3 expression associated to living neurons in ipsi- and contralateral striatum. The QA cerebral exposure model we used was characterized by a massive neuronal loss with associated apoptosis but the C16 treatment was able to significantly limit this neuronal loss. As the C16 compound administered at 600 μ g/kg reduced the number of neurons expressing the cleaved caspase-3 in the ipsilateral striatum, this suggests that the neuronal protection induced by the C16 could be linked to an anti-apoptotic effect of the compound in our QA rat model.

5. Conclusions

This study demonstrated for the first time the involvement of PKR in an *in vivo* rat model of brain acute excitotoxicity with a neuroinflammatory component. Data collected from animals receiving the inhibitor of PKR C16 showed first the ability of the compound to cross the blood-encephalic barrier and second, the importance of the dose on its pharmacological

effects. The main result we report here is the ability of the oxindole/imidazole derivative C16 to massively decrease the IL-1 β expression and to preserve *in vivo* neurons from apoptosis in the model we used. Although the C16 could be considered as a potentially advantageous strategy for patients with neurodegenerative disease, we note how important it is to optimise the drug administration schedule of the drug as well. The compound was administered 24-h and 2-h before and then 24-h after QA injection in our experiments but clearly this has to be re-evaluated. C16 blood concentration measurements would also provide important pharmacokinetics data as well as toxicity parameters.

6. Acknowledgements

The authors thank the financial support of Region Centre, Vincent Courdavault for technical help and Susan Walters for English corrections. The authors declare no conflict of interest.

7. References

- Arlicot N., Katsifis A., Garreau L., Mattner F., Vergote J., Duval S., Kousignian I., Bodard S., Guilloteau D., Chalon S., 2008. Evaluation of CLINDE as potent translocator protein (18 kDa) SPECT radiotracer reflecting the degree of neuroinflammation in a rat model of microglial activation. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 35, 2203-2211.
- Bando Y., Onuki R., Katayama T., Manabe T., Kudo T., Taira K., Tohyama M. 2005. Double-strand RNA dependent protein kinase (PKR) is involved in the extrastriatal degeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease. *Neurochem. Int.* 46,11-8.

- Balachandran S., Kim C.N., Yeh W.C., Mak T.W., Bhalla K., Barber G.N., 1998. Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *EMBO. J.* 17, 6888-6902.
- Balachandran S., Roberts P.C., Kipperman T., Bhalla K.N., Compans R.W., Archer D.R., Barber G.N., 2000. Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. *J. Virol.* 74, 1513-1523.
- Botchkina G.I., Meistrell M.E.^{3rd}, Botchkina I.L., Tracey K.J., 1997. Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol. Med.* 3, 765-781.
- Chang R.C., Suen K.C., Ma C.H., Elyaman W., Ng H.K., Hugon J., 2002. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha in neuronal degeneration. *J. Neurochem.* 83, 1215-25.
- Chen X., Ma X., Jiang Y., Pi R., Liu Y., Ma L., 2011. The prospects of minocycline in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 235, 1-8.
- Chiang M.C., Chern Y., Huang R.N., 2012. PPARgamma rescue of the mitochondrial dysfunction in Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* 45, 322-328.
- Couturier J., Morel M., Pontcharraud R., Gontier V., Fauconneau B., Paccalin M., Page G., 2010a. Interaction of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) with the death receptor signaling pathway in amyloid beta (Aβ)-treated cells and in APPSLPS1 knock-in mice. *J. Biol. Chem.* 285, 1272-1282.
- Couturier J., Page G., Morel M., Gontier C., Claude J., Pontcharraud R., Fauconneau B., Paccalin M., 2010b. Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase strongly decreases cytokine production and release in peripheral blood mononuclear cells from patients with Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* 21, 1217-1231.

Couturier J., Paccalin M., Morel M., Terro F., Milin S., Pontcharraud R., Fauconneau B., Page G., 2011. Prevention of the β -amyloid peptide-induced inflammatory process by inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase in primary murine mixed co-cultures. *J. Neuroinflammation*. 8.

Couturier J., Paccalin M., Lafay-Chebassier C., Chalon S., Ingrand I., Pinguet J., Pontcharraud R., Guillard O., Fauconneau B., Page G., 2012. Pharmacological inhibition of PKR in APPswePS1dE9 mice transiently prevents inflammation at 12 months of age but increases A β 42 levels in the late stages of the Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer. Res.* 9, 344-360.

Dalton L.E., Healey E., Irving J., Marciniak S.J., 2012. Phosphoproteins in stress-induced disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 106:189-221.

Doherty G.H., 2011. Nitric oxide in neurodegeneration: potential benefits of non-steroidal anti-inflammatories. *Neurosci. Bull.* 27, 366-382.

Donnelly N., Gorman A.M., Gupta S., Samali A., 2013. The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cell. Mol. Life. Sci.* [Epub ahead of print]

Dupont N., Jiang S., Pilli M., Ornatowski W., Bhattacharya D., Deretic V., 2011. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *EMBO. J.* 30:4701-4711.

Estrada Sánchez A.M., Mejía-Toiber J., Massieu L., 2008. Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Arch. Med. Res.* 39, 265-276.

Field R., Campion S., Warren C., Murray C., Cunningham C., 2010. Systemic challenge with the TLR3 agonist poly I:C induces amplified IFN α / β and IL-1 β responses in the diseased brain and exacerbates chronic neurodegeneration. *Brain. Behav. Immun.* 24, 996-1007.

García M.A., Gil J., Ventoso I., Guerra S., Domingo E., Rivas C., Esteban M. 2006. Impact of protein kinase pkr in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 1032–1060.

Gagne J.J., Power M.C., 2010. Anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson disease: a meta-analysis. *Neurology.* 74, 995-1002.

Gendelman H.E., Appel S.H., 2011. Neuroprotective activities of regulatory T cells. *Trends. Mol. Med.* 17, 687-688.

Gil J., Esteban M. 2000. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis.* 5,107-14.

Gil J., García M.A., Gomez-Puertas P., Guerra S., Rullas J., Nakano H., Alcamí J., Esteban M., 2004. TRAF family proteins link PKR with NF-kappa B activation. *Mol. Cell. Biol.* 24, 4502-4512.

Glass C.K., Saijo K., Winner B., Marchetto M.C., Gage F.H., 2010. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell.* 140, 918-934.

Griffin W.S., Liu L., Li Y., Mrak R.E., Barger S.W., 2006. Interleukin-1 mediates Alzheimer and Lewy body pathologies. *J. Neuroinflammation.* 3-5.

Gupta A., Kumar A., Kulkarni S.K., 2011. Targeting oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neuroinflammatory signaling by selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors mitigates MPTP-induced neurotoxicity in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 35, 974-981.

Harris J., Hartman M., Roche C., Zeng S.G., O'Shea A., Sharp F.A., Lambe E.M., Creagh E.M., Golenbock D.T., Tschopp J., Kornfeld H., Fitzgerald K.A., Lavelle E.C., 2011. Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *J. Biol. Chem.* 286, 9587-9597.

- Hirsch E.C., Vyas S., Hunot S., 2012. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism. Relat. Disord.* 18, 210-212.
- Hoozemans J.J., Veerhuis R., Rozemuller J.M., Eikelenboom P., 2011. Soothing the inflamed brain: effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on Alzheimer's disease pathology. *CNS. Neurol. Disord. Drug. Targets.* 10, 57-67.
- Ingrand S., Barrier L., Lafay-Chebassier C., Fauconneau B., Page G., Hugon J., 2007. The oxindole/imidazole derivative C16 reduces in vivo brain PKR activation. *FEBS. Lett.* 581, 4473-4478.
- Ito T., Yang M., May W.S., 1999. RAX: a cellular activator for double-stranded RNA-dependent protein kinase during stress signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 15427-15432.
- Jantzen P.T., Connor K.E., DiCarlo G., Wenk G.L., Wallace J.L., Rojiani A.M., Coppola D., Morgan D., Gordon M.N., 2002. Microglial activation and beta-amyloid deposit reduction caused by a nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug in amyloid precursor protein plus presenilin-1 transgenic mice. *J. Neurosci.* 22, 2246-2254.
- Kalai M., Suin V., Festjens N., Meeus A., Bernis A., Wang X.M., Saelens X., Vandenabeele P., 2007. The caspase-generated fragments of PKR cooperate to activate full-length PKR and inhibit translation. *Cell. Death. Differ.* 14, 1050-1059.
- Kalaria R.N., 1999. Microglia and Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Hematol.* 6:15-24.
- Koprach J.B., Reske-Nielsen C., Mithal P., Isacson O., 2008. Neuroinflammation mediated by IL-1 β increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *J. Neuroinflammation.* 27, 5-8.
- Lin H.W., Basu A., Druckman C., Cicchese M., Krady J.K., Levison S.W., 2006. Astrogliosis is delayed in type 1 interleukin-1 receptor-null mice following a penetrating brain injury. *J. Neuroinflammation.* 3-15.

Lu B., Nakamura T., Inouye K., Li J., Tang Y., Lundbäck P., Valdes-Ferrer S.I., Olofsson P.S., Kalb T., Roth J., Zou Y., Erlandsson-Harris H., Yang H., Ting J.P., Wang H., Andersson U., Antoine D.J., Chavan S.S., Hotamisligil G.S., Tracey K.J., 2012. Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature*. 488, 670-674.

Martin H.L., Mounsey R.B., Mustafa S., Sathe K., Teismann P., 2012. Pharmacological manipulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) reveals a role for anti-oxidant protection in a model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol*. 235, 528-538.

McGeer P.L., McGeer E.G., 2007. NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol. Aging*. 28, 639-647.

Mennicken F., Maki R., de Souza E.B., Quirion R., 1999. Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning. *Trends. Pharmacol. Sci.* 20, 73-78.

Meurs E., Chong K., Galabru J., Thomas N.S., Kerr I.M., Williams B.R., Hovanessian A.G., 1990. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell*. 62, 379-390.

Morel M., Couturier J., Pontcharraud R., Gil R., Fauconneau B., Paccalin M., Page G., 2009. Evidence of molecular links between PKR and mTOR signalling pathways in Abeta neurotoxicity: role of p53, Redd1 and TSC2. *Neurobiol. Dis.* 36, 151-161.

Murphy P.G., Borthwick L.S., Johnston R.S., Kuchel G., Richardson P.M., 1999. Nature of the retrograde signal from injured nerves that induces interleukin-6 mRNA in neurons. *J. Neurosci.* 19, 3791-3800.

Owe-Young R., Webster N.L., Mukhtar M., Pomerantz R.J., Smythe G., Walker D., Armati P.J., Crowe S.M., Brew B.J., 2008. Kynurenine pathway metabolism in human blood-brain-barrier cells: implications for immune tolerance and neurotoxicity. *J. Neurochem.* 105, 1346-1357.

- Page G., Rioux Bilan A., Ingrand S., Lafay-Chebassier C., Pain S., Perault Pochat M.C., Bouras C., Bayer T., Hugon J., 2006. Activated double-stranded RNA-dependent protein kinase and neuronal death in models of Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 139, 1343-1354.
- Panza F., Frisardi V., Solfrizzi V., Imbimbo B.P., Logroscino G., Santamato A., Greco A., Seripa D., Pilotto A., 2012. Immunotherapy for Alzheimer's disease: from anti- β -amyloid to tau-based immunization strategies. *Immunotherapy*. 4, 213-238.
- Paris D., Ganey N.J., Laporte V., Patel N.S., Beaulieu-Abdelahad D., Bachmeier C., March A., Ait-Ghezala G., Mullan M.J., 2010. Reduction of beta-amyloid pathology by celastrol in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation*. 7.
- Patel R.C., Sen G.C., 1998. PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *EMBO. J.* 17, 4379-4390.
- Paxinos G., Watson C., 1982. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press.
- Peel A.L., Bredesen D.E., 2003. Activation of the cell stress kinase PKR in Alzheimer's disease and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 14, 52-62.
- Reynolds D.S., Morton A.J., 1998. Changes in blood-brain barrier permeability following neurotoxic lesions of rat brain can be visualised with trypan blue. *J. Neurosci. Methods*. 79, 115-121.
- Romano P.R., Garcia-Barrio M.T., Zhang X., Wang Q., Taylor D.R., Zhang F., Herring C., Mathews M.B., Qin J., Hinnebusch A.G., 1998. Autophosphorylation in the activation loop is required for full kinase activity in vivo of human and yeast eukaryotic initiation factor 2alpha kinases PKR and GCN2. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2282-2297.
- Saelens X., Kalai M., Vandenabeele P., 2001. Translation inhibition in apoptosis: caspase-dependent PKR activation and eIF2-alpha phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276, 41620-41628.

Schneeberger A., Mandler M., Mattner F., Schmidt W., 2012. Vaccination for Parkinson's disease. *Parkinsonism. Relat. Disord. Suppl* 1, 11-13.

Schwarcz R., Köhler C., 1983. Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid. *Neurosci. Lett.* 38, 85-90.

Shi C.S., Shenderov K., Huang N.N., Kabat J., Abu-Asab M., Fitzgerald K.A., Sher A., Kehrl J.H., 2012. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nature. Immunol.* 13:255-263.

Shimazawa M., Hara H., 2006.. Inhibitor of double stranded RNA-dependent protein kinase protects against cell damage induced by ER stress. *Neurosci. Lett.* 409, 192-195.

Singh M., Patel R.C., 2012. Increased interaction between PACT molecules in response to stress signals is required for PKR activation. *J. Cell. Biochem.* 113, 2754-2764.

Suen K.C., Yu M.S, So K.F., Chang R.C. and Hugon J., 2003. Upstream signaling pathways leading to the activation of double-stranded RNA-dependent serine/threonine protein kinase in beta-amyloid peptide neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* 278, 49819-49827.

Taupin V., Toulmond S., Serrano A., Benavides J., Zavala F., 1993. Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand. *J. Neuroimmunol.* 42, 177-185.

Tobinick E.L., Gross H., 2008. Rapid improvement in verbal fluency and aphasia following perispinal etanercept in Alzheimer's disease. *BMC. Neurol.* 8.

Ung T.L., Cao C., Lu J., Ozato K., Dever T.E., 2001. Heterologous dimerization domains functionally substitute for the double-stranded RNA binding domains of the kinase PKR. *EMBO. J.* 20, 3728-3737.

Vantelon N., Rioux-Bilan A., Ingrand S., Pain S., Page G., Guillard O., Barrier L., Piriou A., Fauconneau B., 2007. Regulation of initiation factors controlling protein synthesis on cultured astrocytes in lactic acid-induced stress. *Eur. J. Neurosci.* 26, 689-700.

Vezzani A., Stasi M.A., Wu H.Q., Castiglioni M., Weckermann B., Samanin R., 1989. Studies on the potential neurotoxic and convulsant effects of increased blood levels of quinolinic acid in rats with altered blood-brain barrier permeability. *Exp. Neurol.* 106, 90-98.

Whitton P.S., 2010. Neuroinflammation and the prospects for anti-inflammatory treatment of Parkinson's disease. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 11, 788-794.

Williams B.R., 1999. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene.* 18(45):6112-20.

Wu S., Kaufman R.J., 1997. A model for the double-stranded RNA (dsRNA)-dependent dimerization and activation of the dsRNA-activated protein kinase PKR. *J. Biol. Chem.* 272, 1291-1296.

Zádori D., Klivényi P., Szalárdy L., Fülöp F., Toldi J., Vécsei L., 2012. Mitochondrial disturbances, excitotoxicity, neuroinflammation and kynurenines: novel therapeutic strategies for neurodegenerative disorders. *J. Neurol. Sci.* 15, 187-191.

Zotova E., Nicoll J.A., Kalaria R., Holmes C., Boche D., 2010. Inflammation in Alzheimer's disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Alzheimers. Res. Ther.* 2.

8. Legends

Figure 1: Representative immunoblots and densitometric analyses of PKR

immunoreactivity in the presence or absence of C16 treatment.

Rats received either 60 µg/kg (C16-1) or 600 µg/kg (C16-2) of C16 or DMSO as vehicle by i.p. as described in the method section. They were unilaterally injected with 150 nmol of QA or PBS. Contralateral and ipsilateral striata were used to measure the expression of full-length P_{T451}-PKR (panel A), kinase domain (KD) P_{T451}-PKR (panel B) and total full-length PKR (panel C) in all groups of rats (n=8 rats per group: sham, C16-1, C16-2, QA, QA-C16-1 and QA-C16-2 animals). Results are expressed as means (% of sham contra) ± S.E.M. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 compared to QA ipsi and † p < 0.05; †† p < 0.01 compared to QA-C16-1 ipsi by a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn multiple comparison test.

Figure 2: Representative immunoblots and densitometric analyses of eIF2α

immunoreactivity with or without C16-2 treatment.

Rats received 600 µg/kg (C16-2) of C16 or DMSO as vehicle by i.p. as described in the method section. They were unilaterally injected with 150 nmol of QA or PBS. Contralateral and ipsilateral striata were used to measure the expression of P_{S51}-eIF2α (panel A), and total eIF2α (panel B) in all groups of rats (n=8 rats per group: sham, C16-2, QA, QA-C16-2 animals). The *ratio* of P_{S51}-eIF2α / total eIF2α were calculated and showed in panel C. Results are expressed as means (% of sham contra) ± S.E.M. †† p < 0.01 compared to contralateral side of sham; ** p < 0.01 compared to ipsilateral side of sham; ‡‡p<0.01 compared to ipsilateral side of QA rats by a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn multiple comparison test.

Figure 3 : Hematoxylin and eosin staining of brain slices of Sham, C16-2, QA and QA-C16-2 rats.

Panel A: Macroscopic view of striatum in the area of injection (bregma + 0.7 mm).

Panel B: Magnified image (x200) of a region (black frame) in the ipsilateral striatum. Scale: 40 μ m

Figure 4: Effect of C16-2 treatment on levels of cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-4, and IL-10) in rat striatum by the 4-plex Luminex xMAP assay containing a mixture of beads specific for each cytokine. Results are expressed as mean $\pm$ SEM in pg/mg protein (8 rats per group).

*p < 0.01 compared to contralateral side of sham rats; †† p < 0.01, ††† p < 0.001 compared to contralateral side of QA rats by a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn multiple comparison test.

Figure 5: Immunofluorescence of cleaved caspase-3 and NeuN in rat striatum.

Panels A, B and C represent the same areas of contra- and ipsi-lateral striatum (1 and 2, respectively) of sham (n=3), C16-2 (n=3), QA (n=4) and QA-C16-2 (n=4) groups.

Magnification was x20 and x120 for inserts. Data are means $\pm$ SEM and analyzed by using a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn multiple comparison test. Scale: 20 μ m.

Panel A: Cleaved caspase-3 (red channel). Cells expressing cleaved caspase-3 in contra- and ipsi-lateral striatum (1 and 2) for each group. The number of positive cells in ipsilateral striatum of animal has been counted (3). * p<0.05

Panel B: NeuN (green channel). Neurons staining in contra- and ipsi-lateral striatum (1 and 2) for each group. The percentage of neuronal loss in ipsilateral striatum, reported to contralateral one, has been performed (3). ** p<0.01 compared to respective contralateral side.

Panel C: Merge representing neurons and cleaved caspase-3 in contra- and ipsi-lateral striatum (1 and 2) for each group. Neurons expressing cleaved caspase-3 in both striatum have been counted (3). * $p < 0.05$ compared to respective contralateral side.

Figure 1

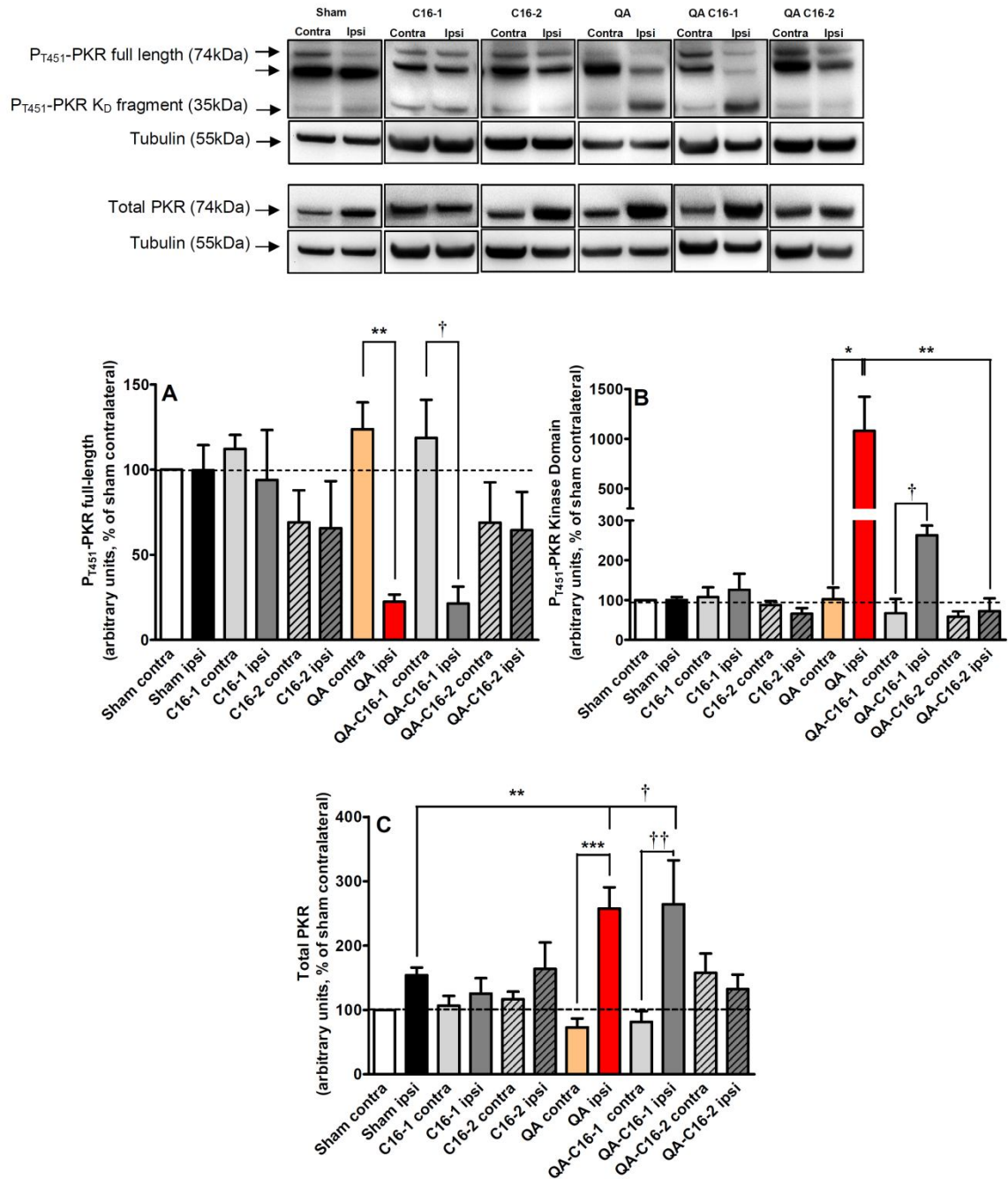


Figure 2

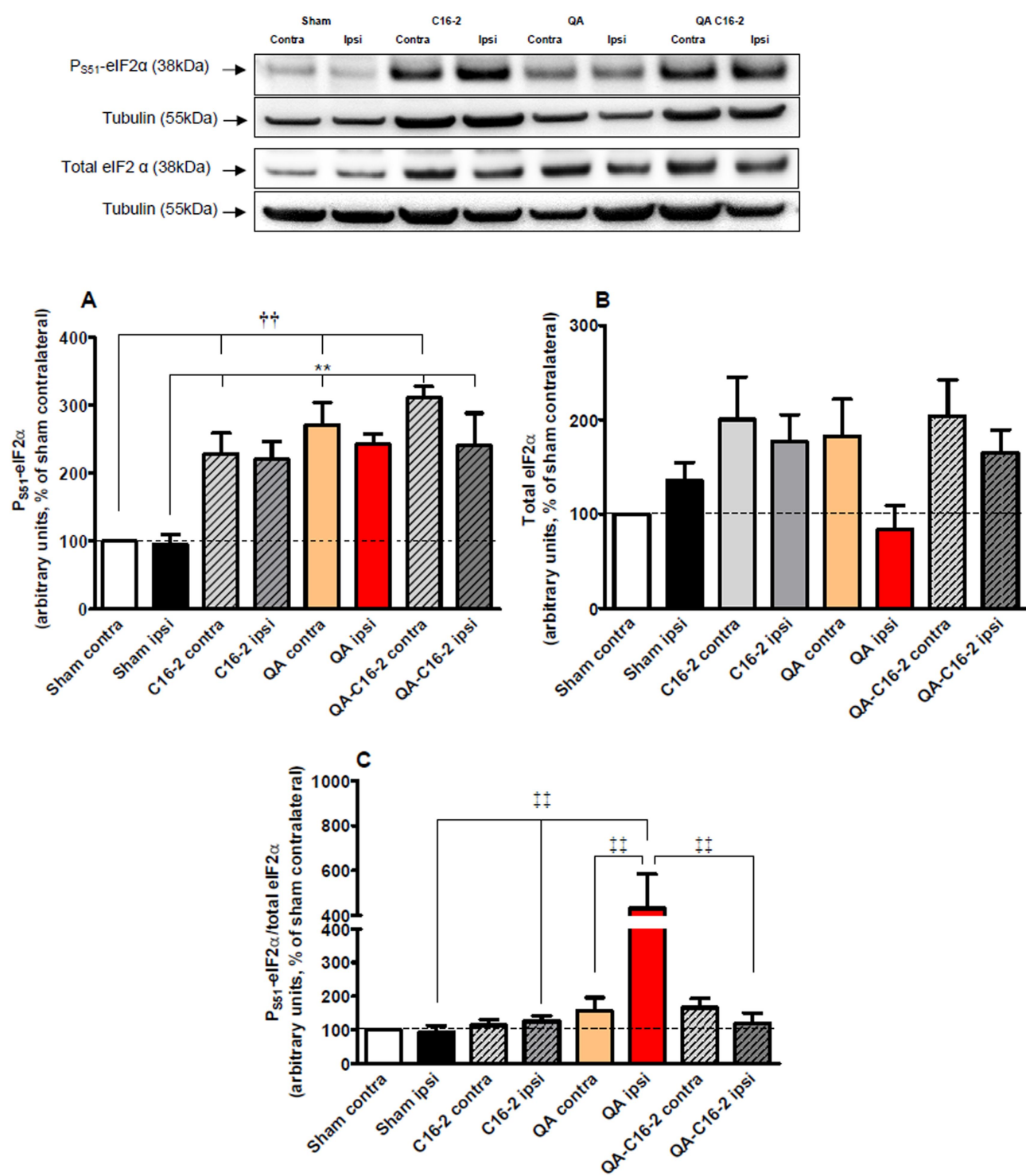


Figure 3

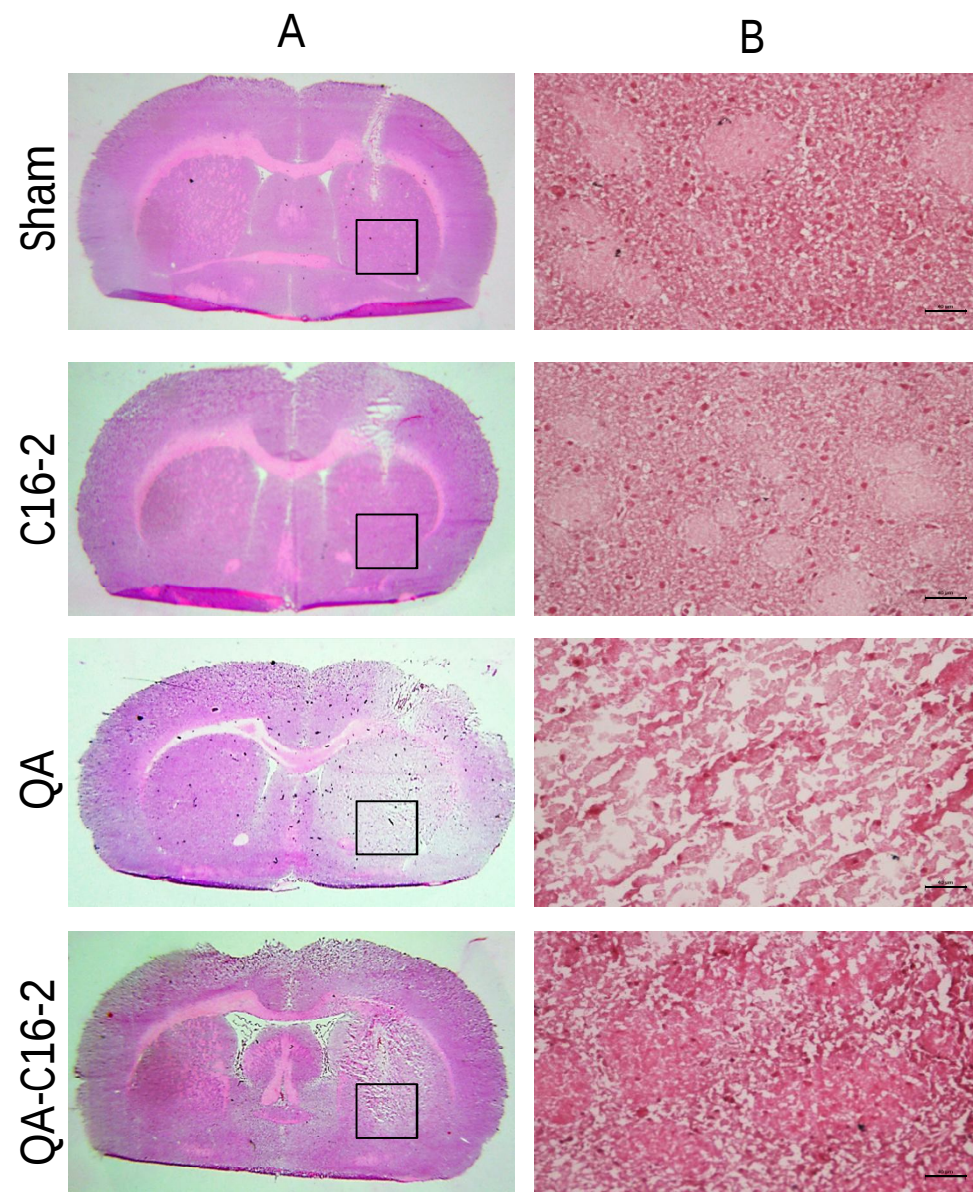


Figure 4

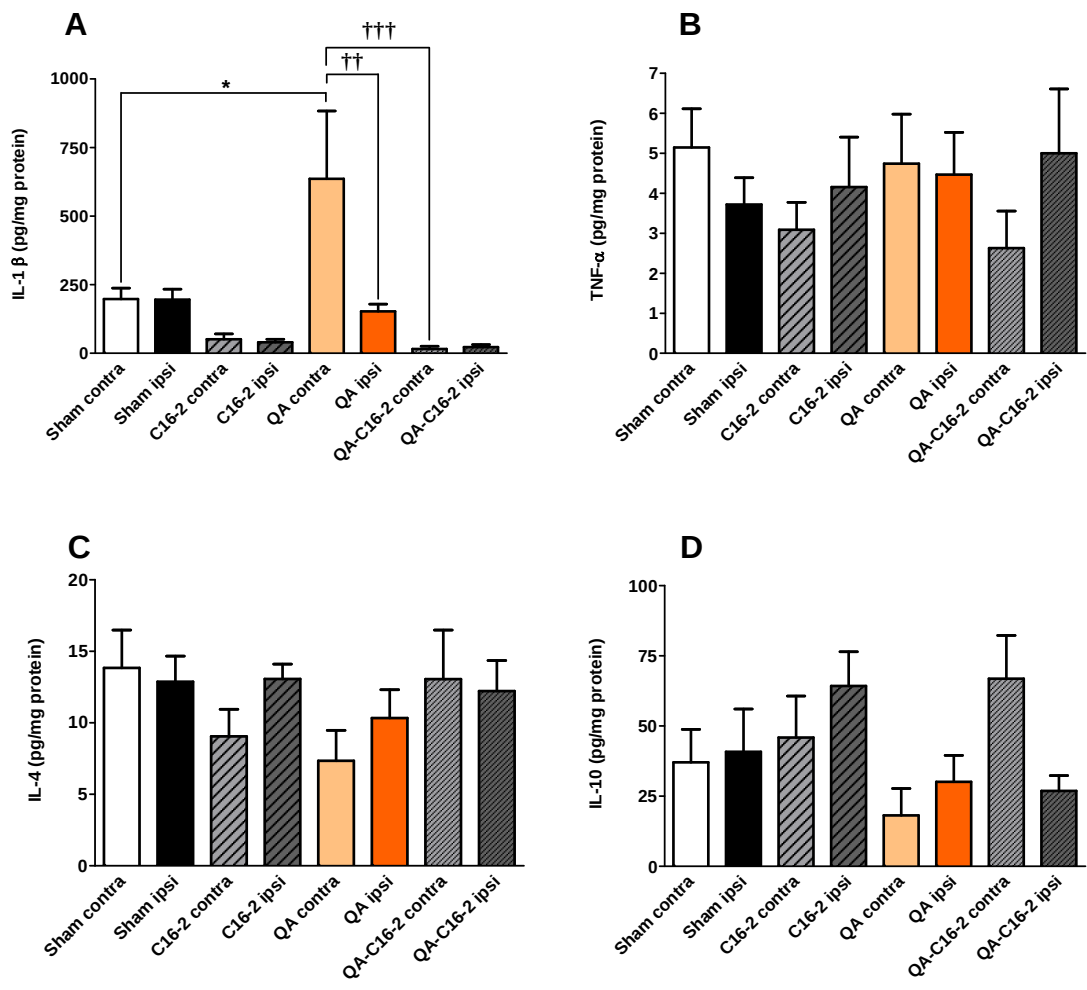
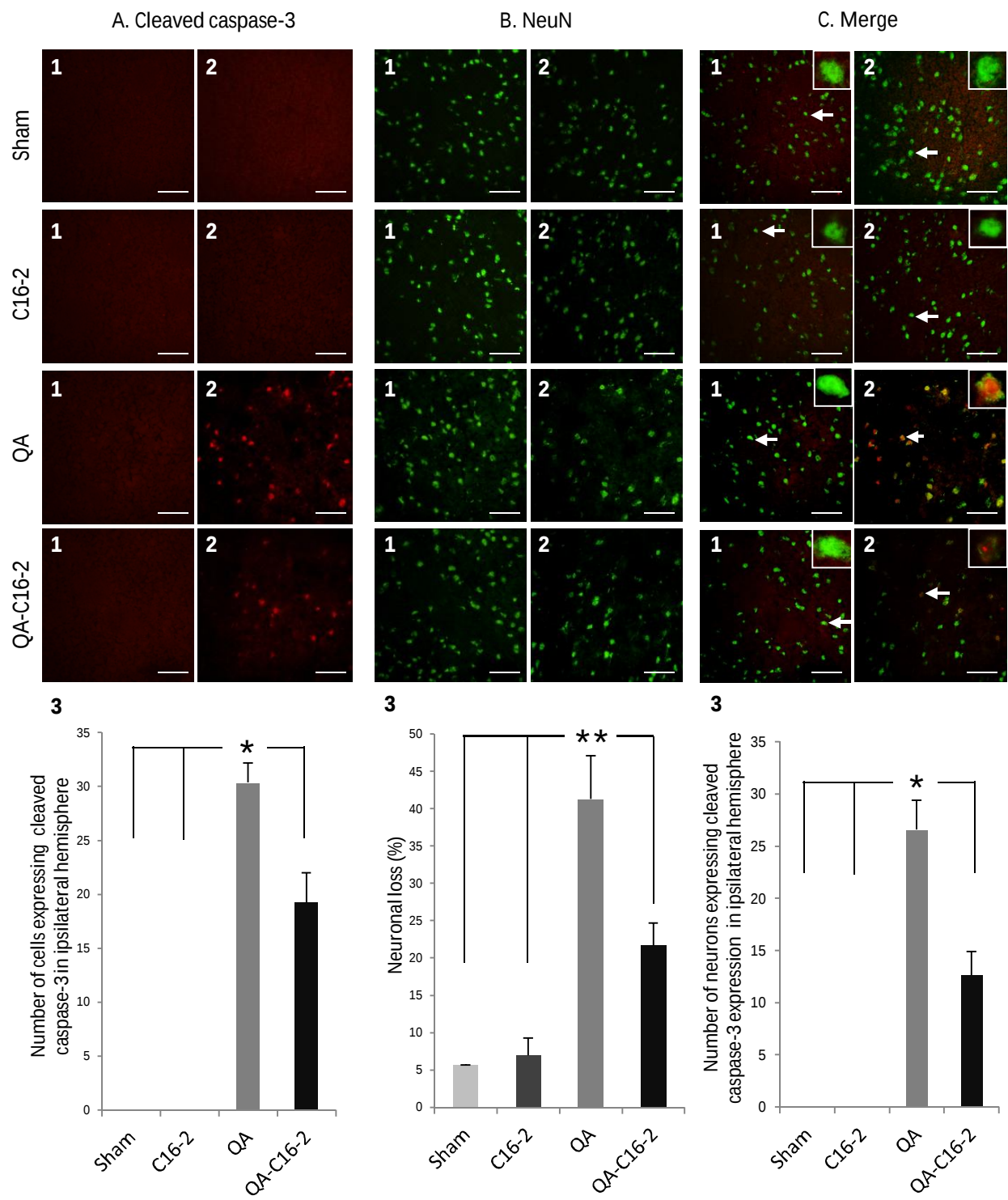


Figure 5



Article 3

“Etude de la biodistribution de la protéine translocatrice (18 kDa) avec le [¹²⁵I]-CLINDE dans un modèle d’excitotoxicité *in vivo* chez le rat : une comparaison longitudinale de l’activation microgliale, de l’astrogliose et de la mort neuronale”

N. Arlicot, C. Tronel, S. Bodard, L. Garreau, B. de la Crompe, I. Vandeveld, D. Guilloteau, D. Antier, S. Chalon.

Soumis dans *Molecular Imaging* (10/13)

Introduction

La neuroinflammation joue un rôle central dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives. La connaissance des mécanismes de cette inflammation cérébrale *in vivo* est importante pour le diagnostic et le suivi de la maladie. Les traceurs existants de la neuroinflammation ciblent principalement la TSPO, protéine mitochondriale surexprimée par la microglie activée. La validation de ces traceurs chez l’animal est nécessaire avant de pouvoir les utiliser chez l’homme.

Le modèle d’injection intrastriatale d’AQ est à l’origine destiné à l’étude de la MH mais des modèles transgéniques de cette maladie ont été développés depuis quelques années et cette injection est depuis utilisée le plus souvent comme un modèle d’excitotoxicité (Mangiarini et al., 1996; von Horsten et al., 2003). L’association de l’injection d’AQ avec une activation massive des cellules microgliales observée chez les animaux lésés nous autorise à considérer ce modèle pour étudier la neuroinflammation. Cependant, ce modèle n’a jamais été caractérisé de façon longitudinale. Une seule étude a été réalisée jusqu’à J60 post-lésion, mais elle ne comporte que 4 points temporels (Moresco et al., 2008). Une étude longitudinale faisant le lien entre la neuroinflammation et la mort neuronale permettrait d’améliorer nos connaissances des mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans la neuroinflammation mais pourrait également permettre d’évaluer de nouvelles thérapeutiques.

Pour ce 3^e volet de la thèse, nous avons utilisé le CLINDE, un ligand de haute affinité pour la TSPO, afin de quantifier de façon longitudinale l’activation de la microglie chez des animaux lésés par l’AQ. Le CLINDE peut détecter les processus inflammatoires *in vivo* caractérisés par une augmentation de la neuroinflammation dans différents modèles animaux de SEP (Mattner et al., 2005), d’ischémie cérébrale (Arlicot et al., 2010) et d’épilepsie

(Dedeurwaerdere et al., 2012). Dans cette étude, nous avons réalisé des biodistributions cérébrales *ex vivo* avec le [¹²⁵I]-CLINDE afin d'étudier la distribution spatiale et temporelle de l'expression de la TSPO à plusieurs temps après l'injection d'AQ. Cette évaluation quantitative a été illustrée par des analyses parallèles d'autoradiographie *ex vivo* et complétée par une étude d'immunohistochimie avec marquage de la microglie, des astrocytes et des neurones.

Matériels et méthodes

Après l'injection de 150 nmol d'AQ dans le striatum droit, les animaux ont été euthanasiés à différents temps post-lésion (1, 4, 7, 14, 30, 60 et 90 jours), 30 min après avoir reçu une injection intraveineuse (i.v. ; veine du pénis) de 0,3 MBq de [¹²⁵I]-CLINDE. Différentes structures cérébrales ont été prélevées : striatum droit (ipsilatéral) et gauche (controlatéral) ; cortex antérieur droit et gauche ; hippocampe droit et gauche ; cervelet. Chaque structure a été pesée et la quantité de radioactivité présente dans chacune d'elles a été mesurée à l'aide d'un compteur gamma. Le pourcentage de dose injectée par gramme de tissu (%ID/g) a été calculé en se basant sur les mesures de radioactivité effectuées sur des dilutions de la solution de CLINDE. Parallèlement, des autoradiographies *ex vivo* ont été réalisées au niveau du striatum, de l'hippocampe et du cervelet dans le but d'illustrer la distribution cérébrale du CLINDE.

A J14, deux groupes d'animaux supplémentaires ont été constitués pour compléter les résultats de biodistribution et d'autoradiographies. Un groupe témoin recevant le solvant tampon phosphate de l'AQ pour confirmer que l'expression de la TSPO n'est pas due uniquement à la lésion mécanique. L'autre groupe lésé par l'AQ a été prétraité par une injection i.v. de PK11195 non radioactif 15 min avant l'injection de [¹²⁵I]-CLINDE, et en très large excès par rapport au radioligand. Le PK11195 étant le ligand de référence de la TSPO, le but de cette compétition était de s'assurer de la spécificité du marquage par le CLINDE.

Parallèlement à la biodistribution et pour chaque point de mesure, l'activation microgliale (CD11b), l'activation astrocytaire (GFAP) et la survie neuronale (NeuN) ont été mesurées au cours du temps.

Principaux résultats

La biodistribution cérébrale a montré que l'expression de la TSPO dans le striatum ipsilatéral augmentait dès J1, avant d'atteindre un plateau entre J4 et J30 puis de décroître progressivement. Dans le cortex ipsilatéral, l'expression de la TSPO a atteint un pic à J4 puis a décliné dès J14. Un niveau basal a été retrouvé à J90 pour ces deux structures. Il n'y a eu aucune variation de la fixation du CLINDE du côté controlatéral ou dans l'hippocampe, et ce quel que soit le point temporel considéré.

En revanche, dans le cervelet, le niveau d'expression de la TSPO était significativement plus élevé que dans les structures controlatérales (cortex, striatum et hippocampe), et ce à chaque temps. L'étude de compétition avec le PK11195 a induit une forte diminution de la fixation du CLINDE, dans toutes les structures y compris le cervelet. De plus, l'expression de la TSPO était significativement ($p < 0,05$) plus élevée dans le cervelet que dans toutes les autres structures chez le groupe d'animaux témoins.

L'immunohistochimie a montré que dans ce modèle la mort neuronale dans le striatum ipsilatéral atteignait son maximum à J14 avant de décroître progressivement, sans pour autant permettre un retour à la normale du nombre de neurones à J90. La neuroinflammation a été étudiée au regard de l'activation de deux types cellulaires : la microglie et les astrocytes. L'activation microgliale était significativement ($p < 0,05$) plus élevée dans le striatum ipsilatéral que dans le controlatéral à chaque temps ; elle a atteint un maximum à J14 avant de décroître. La distribution de l'astrogliose était similaire, avec un maximum à J7 et J14.

**Translocator Protein (18 kDa) mapping with [125I]-CLINDE
in the quinolinic acid rat model of excitotoxicity: a
longitudinal comparison to microglial activation, astrogliosis
and neuronal death.**

Journal:	<i>Molecular Imaging</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Articles
Keywords - General Terms:	animal Models of Disease, molecular imaging of inflammation, molecular imaging of neuro-degenerative diseases
Keywords - Detailed Scientific Terms:	molecular neuroimaging, animal Models of Disease, radiopharmaceutical

SCHOLARONE™
Manuscripts

Review

1 **Title page**

2 **Title**

3

4 **Translocator Protein (18 kDa) mapping with [¹²⁵I]-CLINDE in the quinolinic acid rat**
5 **model of excitotoxicity: a longitudinal comparison to microglial activation, astrogliosis**
6 **and neuronal death.**

7

8 **Authors:**

9 Arlicot Nicolas^{1,2,3†}, Tronel Claire^{1,2}, Bodard Sylvie^{1,2}, Garreau Lucette^{1,2}, de la Crompe
10 Brice^{1,2}, Vandeveld Inge^{1,2}, Guilloteau Denis^{1,2,4}, Antier Daniel^{1,2,3}, Chalon Sylvie^{1,2}

11

12 **Affiliations:**

13 ¹Inserm, U930, Tours, France

14 ²Université François-Rabelais de Tours, UMR-U930, Tours, France

15 ³CHRU de Tours, Hôpital Bretonneau, Pôle Santé Publique – Produits de Santé, Tours,
16 France

17 ⁴CHRU de Tours, Hôpital Bretonneau, Service de Médecine Nucléaire In Vitro, Tours, France

18

19 **† Corresponding author:**

20 Address: Laboratoire de Biophysique - UFR Sciences Pharmaceutiques ; 31 avenue Monge -
21 37200 TOURS – France

22 Tel: +33 (0)2 47 36 72 41 / Fax: +33 (0)2 47 36 72 24

23 e-mail: nicolas.arlicot@univ-tours.fr

24

25 **Running title:** Inflammation follow-up in a rat excitotoxic model

26 **Keywords:** excitotoxicity; neuroinflammation; molecular imaging; SPECT; quinolinic acid

27

28 **Abbreviations:**

29 BBB: Blood–Brain Barrier

30 dpl: days post-lesion

31 GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein

32 NMDA: N-Methyl-D-Aspartate

33 PET: Positron Emission Tomography

34 QA: Quinolinic Acid

35 SPECT: Single-Photon Emission Computed Tomography

36 SVZ: SubVentricular Zone

37 TSPO: Translocator Protein 18-kDa

38

39 **Abstract**

40 Excitotoxicity leads to an inflammatory reaction involving an overexpression of TSPO in
41 cerebral microglia and astrocytes. Therefore, we performed ex vivo explorations with [¹²⁵]-
42 CLINDE, a TSPO specific radioligand, to follow the time course of TSPO expression, in
43 parallel with lesion progression, over 90 days after induction of cerebral excitotoxicity in rats
44 intrastriatally injected with QA. Biodistribution data showed significant increase in CLINDE
45 uptake on the injured side from 1dpl; the maximal striatal binding values evidenced a plateau
46 between 7 and 30dpl. [¹²⁵I]-CLINDE binding was displaced from the lesion by PK11195,
47 suggesting TSPO specificity. These results were confirmed by ex vivo autoradiography.
48 Combined immunohistochemical studies showed a markedly increase in microglial expression
49 in the lesion, peaking at 14dpl, astrocytic reactivity enhanced at 7 and 14dpl, whereas a
50 prominent neuronal cell loss was observed. At 90dpl, CLINDE binding, and
51 immunoreactivity targeting activated microglia, astrogliosis and neuronal cell density returned
52 to a basal level. These results show that both neuroinflammation and neuronal loss profiles
53 occurred concomitantly and appeared to be transitory processes. These findings provide the
54 possibility of a therapeutic temporal window to compare the differential effects of anti-
55 inflammatory treatments in slowing down neurodegeneration in this rodent model, with
56 potential applications to humans.

57

58 **Introduction**

59 Excitotoxicity occurs due to the overstimulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors
60 by glutamate and leads to increased calcium influx and production of free radicals which can
61 trigger a cascade of events ultimately leading to neuronal death (1). Therefore excitotoxicity
62 is recognized as an important biological process involved in neuronal death in a range of brain
63 disorders and in particular neurodegenerative diseases (2, 3). Quinolinic acid (QA) is an
64 endogenous NMDA receptor agonist, metabolite of tryptophan, which is found in normal
65 subjects as a byproduct along the kynurenine pathway leading to the synthesis of the essential
66 co-factors nicotinic acid and nicotinamide adenine dinucleotide. The unilateral intrastriatal
67 injection of QA induces excitotoxicity via NMDA receptor activation, and is admitted as an
68 animal model mimicking early stages of Huntington's disease as it reproduces some
69 biochemical, behavioural and pathologic features of the disease in rodents and non-human
70 primates (4-6). Since the emergence of transgenic models of Huntington's disease (7, 8), the
71 QA-induced striatal lesion became more relevant as a model of excitotoxicity. To date, this
72 model is still widely used in studies assessing new therapeutic approaches (9, 10), and has
73 been shown to produce large lesions accompanied by an inflammatory response involving
74 increased microglial activation, which is directly associated with the degree of brain damage
75 (3, 11). Microglia are the resident immune cells of the brain which, under normal conditions,
76 display a ramified morphology with small cell bodies and long, thin processes. The activation
77 of microglia, following pathological changes in the brain such as excitotoxic injury, includes
78 changes in their morphology, adopting an amoeboid-like shape, migration toward the lesion
79 site, proliferation, and acquisition of new functions in injured tissue, including the capacity to
80 express and release a wide variety of proinflammatory molecules and to phagocytose dead
81 cells (12). The role of these activated microglial cells appears to be variable, with both
82 harmful and beneficial effects on brain function, a currently frequently debated subject (13,

14), and it has been proposed that prolonged activation of microglia could contribute to the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

One of the earliest molecules to be overexpressed during microglial activation process is the Translocator Protein 18 kDa (TSPO), formerly known as the peripheral benzodiazepine receptor (15). TSPO is a component of a multimeric protein complex closely associated with a voltage-dependent anion channel and an adenine nucleotide carrier (16). TSPO is located on the outer membrane of the mitochondria and is widely distributed in peripheral organs. Whereas TSPO is minimally expressed in the healthy brain, its basal expression dramatically increases in several neurodegenerative and acute brain disorders, thus providing a sensitive biomarker for imaging microglial activation associated with neuroinflammation (17).

Molecular imaging has the capability of providing functional data with high resolution and sensitivity for following pathology and neurodegeneration non-invasively in the central nervous system. These can elucidate the temporal and spatial evolutions of the toxin induced neuropathology, which are important determinants of animal model studies (18). The current development of TSPO high-affinity radioligand allowing monitoring of the neuroinflammation process should be valuable for this purpose. Thus, the QA striatal lesion model has been widely investigated by molecular imaging (19-22). However, a comprehensive longitudinal molecular imaging study has not been performed yet on the QA model, although a previous work has shown the evolution of the lesion until 60 days after surgery, but only referring to 4 time points (23), and while we have studied QA levels in a dose response manner in one time-point (19). Indeed, longitudinal study of links between neuroinflammation and neurodegeneration would improve understanding of the physiopathological mechanism and also accessibility to early diagnosis and/or new therapeutic approaches. In that respect, we used here the TSPO SPECT high-affinity ligand, the 6-chloro-2-(4'iodophenyl)-3-(N, N-diethyl)-imidazo[1,2-a]pyridine-3-acetamide or

CLINDE, to explore longitudinally expression of activated microglia in QA lesioned rats. It has previously been shown that CLINDE was able to detect in vivo inflammatory processes characterised by increased density of TSPO in several preclinical models of neuroinflammation, including experimental autoimmune encephalomyelitis (24), cerebral ischemia (25) and temporal lobe epilepsy (26). In the present work, we performed a serial ex vivo cerebral biodistribution studies with [125 I]-CLINDE to investigate the spatial and temporal density of TSPO at several time-points (1, 4, 7, 14, 30, 60, and 90 days) after unilateral QA lesion in the rat striatum. This quantitative evaluation was complemented in parallel by ex vivo autoradiography and the relevance of our findings was faced with immunohistochemistry data targeting at neuronal survival, microglial activation, and astrogliosis.

Materials and Methods

Radiochemical synthesis of [¹²⁵I]-CLINDE

The radioligand [¹²⁵I]-CLINDE was prepared as previously described (19), with minor modifications. Briefly, the tributyltin precursor (100 µg) in acetic acid (200 µl) was treated with a solution of Na¹²⁵I (specific activity 80 GBq/ µmol; PerkinElmer, Courtaboeuf, France). The iodination was initiated by adding peracetic acid (1-3%, 100 µl), and quenched 5 min later with sodium bisulphite (200 µl, 50 mg/ml). The solution was then neutralised with sodium bicarbonate (200 µl, 50 mg/ml). The product was purified using high performance liquid chromatography with a semipreparative C-18 RP-column (10 x 250 mm Phenomenex) and a mixture of acetonitrile/0.1 M ammonium acetate (60/40) as mobile phase at a flow rate of 4 mL/min. The retention times of precursor, iodide, and [¹²⁵I]-CLINDE in this system were 4, 5, and 15 min, respectively. The peak corresponding to [¹²⁵I]-CLINDE was collected, passed through a C-18 Sep-Pack (Waters), and eluted with ethanol to eliminate the solvent. The final radiolabelled product was assessed using an analytical C-18 RP-column (4.6 x 250 mm Phenomenex), with the same mobile phase and flow rate as described above. The radiochemical yield following purification was about 85% and the specific activity of [¹²⁵I]-CLINDE was 80 GBq/µmol.

Animals

All procedures were conducted in accordance with the requirements of the European Community Council for the care of laboratory animal's 2010/63/EU; and approved by the local ethical committee (INSERM37-002, agreement n°2012-03-1). Experiments were carried out on adult Wistar rats (Centre d'Elevage René Janvier, Le Genest-St-Isle, France) weighing 282 ± 15 g at the beginning of the experiment. Animals were housed in groups of two per

cage in a temperature and humidity controlled environment (temperature $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; hygrometry $40\% \pm 7\%$), under a 12 h light/dark cycle with food and water available ad libitum.

Surgery

Surgery was performed under isoflurane (AErrane, Baxter, France) anaesthesia (4% for anaesthesia induction and thereafter 2% for its maintenance, in $\text{N}_2\text{O}-\text{O}_2$: 70%-30%). Animal's body temperature ($36.9 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$) was monitored with a homoeothermic probe during the whole surgery.

Unilateral striatal QA lesion was induced in 94 adult male Wistar rats as previously described (19, 27). This procedure results in a reproducible excitotoxic lesion well-delineated to the striatum and ipsilateral cortex. Rats were placed in a stereotaxic David Kopf apparatus (tooth bar: -3.3 mm, and unilaterally injected with 150 nmol of QA (Sigma-Aldrich, Lyon, France) into the right striatum (injection rate: $0.5 \mu\text{L}/\text{min}$) using a $25\text{-}\mu\text{L}$ microsyringe (Hamilton, Bonaduz, Switzerland) and a micropump (KD Scientific, Holliston, MA, USA). Two microliters of QA were injected at the following coordinates: AP: $+0.7$ mm; ML: -3 mm; DV: -5.5 mm from bregma, according to Paxinos and Watson (28). The injection syringe was left in place for additional 4min to avoid QA backflow and then slowly removed. The scalp was sutured and animals replaced in their cages and examined daily until sacrifice.

A complementary set of 8 animals (sham) were treated with QA vehicle (0.1M PBS, pH 7.4), according to the same procedure.

Ex vivo cerebral biodistribution of [^{125}I]-CLINDE, and blocking studies

Ex vivo cerebral biodistribution studies were performed with [^{125}I]-CLINDE in QA lesioned animals at 1, 4, 7, 14, 30, 60, and 90 days post lesion (dpl) and in sham animals at 14 dpl ($n=6$

per group). Rats were i.v. injected (penis vein) with [125 I]-CLINDE (0.3-0.4 MBq in 300 μ L normal saline). At 14 dpl, nonspecific binding of [125 I]-CLINDE was investigated in 6 other QA lesioned rats by preinjection, 15 min prior to the radiotracer, of an excess (5 mg/kg) of unlabeled PK11195 (the isoquinoline carboxamide TSPO reference ligand, Sigma). Animals were sacrificed 30 min post [125 I]-CLINDE injection. Several brain areas (cerebellum, left and right hippocampus, left and right frontal cortex, and left and right striatum) were removed and weighed, and their radioactivity was measured using an automated gamma counter (Cobra 5010, Packard). The percentage of injected dose per gram tissue (%ID/g) was calculated by comparison with samples to standard dilutions of the initial dose.

Ex vivo autoradiography

Ex vivo autoradiographic studies were performed with [125 I]-CLINDE to illustrate the spatial distribution of its cerebral binding in QA lesioned animals at each time point and in sham animals at 14 dpl (n=2 per group). At 14 dpl, nonspecific binding of [125 I]-CLINDE was investigated in 2 other QA lesioned rats by preinjection, 15 min prior to the radiotracer, of an excess of PK11195. Animals were i.v. injected (penis vein) with [125 I]-CLINDE (2.0 MBq in 300 μ L normal saline), and euthanatized 30 min post [125 I]-CLINDE injection. Brains were removed and frozen at -80°C. Coronal striatal sections (20 μ m-thickness) at the level of the striatal lesion site, hippocampus, and cerebellum, corresponding to the following coordinates, respectively:: AP: 0.72 to 0.60 mm; -4.20 to -4.44 mm; -13.44 to -13.68 mm from bregma (Paxinos & Watson, 1986), were then cut in a cryostat microtome (Jung CM 3000, Leica), thaw-mounted on microscope slides and air-dried at room temperature. Slides were exposed to iodide-sensitive films (Biomax MRTM Kodak) for 6 weeks and then developed (Kodak L24 revelator), fixed (Kodak 3000 fixator) and dried. Autoradiograms were scanned using a Scanner Epson Perfection 4870 Photo.

194

195 *Immunohistochemistry studies*

196 The animals (n=6 per time point), were euthanatized at 1, 7, 14, 60 and 90 dpl for
 197 immunohistochemistry processing. The rats were deeply anesthetized by i.p. injection of
 198 pentobarbital (Céva Santé Animale, Paris, France), perfused through the heart with 250 mL of
 199 heparinized (HéparineChoay®, Sanofi-Aventis, Vitry-sur-Seine, France) saline (1 UI/mL of
 200 saline) then followed by 400 mL of 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma Aldrich, Lyon,
 201 France). The brains were removed and fixed in 4% PFA for 2 h then stored 48 h in 30%
 202 sucrose and frozen at -80°C.

203 Five coronal sections 40µm thick of the striatum region were used for immunohistochemistry
 204 staining of neurons, activated microglial cells and astrocytes. Endogenous peroxidase was
 205 blocked using 3% H₂O₂ in 10% methanol and distilled water for 15 min. Slices were
 206 incubated overnight at room temperature with primary antibodies 1:500 diluted anti-neuronal
 207 nuclei (NeuN, Millipore, Molsheim, France) 1:500-diluted anti-CD11b (Ox-42, AbDSerotec,
 208 Düsseldorf, Germany) or 1:1000 diluted glial fibrillary acidic protein (GFAP, Sigma Aldrich,
 209 Lyon, France), 0.1M PBS supplemented with 0.2% v/v of Tween and 2% v/v of normal horse
 210 serum overnight at room temperature. Sections were then incubated with biotinylated horse
 211 anti-mouse IgG secondary antibodies (AbCys, Paris, France) for 90 min at room temperature.
 212 Neurons, activated microglia or astrocytes were visualized by staining with streptavidin-biotin
 213 conjugated horseradish peroxidase (AbCys, Paris, France) for 60 min at room temperature.
 214 Peroxidase was developed for 3 min with diaminobenzidine at room temperature. Slices were
 215 analyzed under a light binocular microscope (Leica, Westlar, Germany) and histological
 216 analysis was performed with Histolab imagery software (US Histology Laboratories,
 217 Rockville, USA). The neurons were visually counted and the percentage of neuronal loss in

the ipsi- *versus* contra-lateral hemisphere was calculated in matching areas of analysis. For Ox-42 and GFAP, the total surface area occupied by activated microglia or astrocytes was automatically measured by the imagery software and the percentage of increase in ipsi- *versus* contra-lateral hemisphere was measured for each section. Five slices per animal, at the level of the striatal lesion site (AP: 0.72 to 0.60 mm from bregma, (28)), and 3 areas per hemisphere, were then randomly selected and neurons or surface occupied by activated microglia or astrocytes were counted by 2 independent operators.

Statistical analysis

All data are presented mean $\pm$ standard error of the mean. Significance was set at $p < 0.05$. Data for multiple variable comparisons were analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by nonparametric analysis (Mann-Whitney & Kruskal-Wallis tests) to determine significant difference. Statistics were performed using the Statview software (Abacus concepts Inc., USA).

Results

Ex vivo longitudinal follow-up of [¹²⁵I]-CLINDE cerebral distribution, blocking studies

The cerebral biodistribution of [¹²⁵I]-CLINDE at 1, 4, 7, 14, 30, 60, and 90 dpl in rats lesioned with 150 nmol of QA was expressed as the radioactivity levels, in percent injected dose per gram of tissue (%ID/g) and shown in Fig. 1A. At 1 dpl, the accumulation of radioactivity in the right (lesioned) striatum and cortex was significantly increased ($p < 0.05$) compared with the controlateral side: $0.36 \pm 0.02\%$ ID/g tissue vs $0.16 \pm 0.01\%$ ID/g tissue in striatum, i.e. +125%; $0.32 \pm 0.02\%$ ID/g tissue vs $0.18 \pm 0.01\%$ ID/g tissue in cortex, i.e. +78%). This difference between both hemispheres was maintained in the striatum up to 60 dpl, but was not statistically significant any more at 90 dpl. In cortex, significant increase of [¹²⁵I]-CLINDE binding was observed only until 14 dpl.

In the lesioned striatum, the accumulation of [¹²⁵I]-CLINDE continued to increase significantly at 4 dpl ($0.65 \pm 0.05\%$ ID/g tissue, $p < 0.05$ vs. 1 dpl), and reached a plateau between 4 and 30 dpl. Indeed, we did not observe any statistically significant differences between [¹²⁵I]-CLINDE uptake at 4, 7, 14 and 30 dpl, whereas all these time points evidenced a higher value versus 1 dpl ($p < 0.05$). After 30 dpl, this value decreased progressively, reaching significance at 90 dpl ($0.58 \pm 0.04\%$ ID/g tissue at 30 dpl vs $0.27 \pm 0.04\%$ ID/g tissue at 90 dpl, $p < 0.05$).

In the ipsilateral cortex, the radioactive signal peaked at 4 dpl ($0.46 \pm 0.05\%$ ID/g tissue, $p < 0.05$ vs 1 dpl), and then progressively decreased to return to a basal level, similar to the values observed in the contralateral hemisphere, at 90 dpl.

In the hippocampus, [¹²⁵I]-CLINDE uptake was low ($\approx 0.16 \pm 0.02\%$ ID/g tissue) and steady regardless of the brain hemisphere or the considered time point of the longitudinal follow-up.

The cerebellum provide likewise a consistent accumulation of radioactivity whatever the time point, with values between $0.25 \pm 0.03\%$ ID/g tissue at 7 dpl and $0.35 \pm 0.02\%$ ID/g tissue at 90 dpl and no significant difference observed by multiple variable comparison analysis. However, cerebellar [^{125}I]-CLINDE binding appeared significantly higher than the values obtained in contralateral hemisphere, whatever the considered time point (for instance at 30 dpl: $0.30 \pm 0.03\%$ ID/g tissue in cerebellum vs $0.14 \pm 0.01\%$ ID/g tissue in striatum contralateral to the QA lesion, $p < 0.05$).

Ex vivo autoradiographic images, illustrating the striatal and cortical distribution of radioactivity 30 min after [^{125}I]-CLINDE injection to rats lesioned with 150 nmol QA, are presented in Fig. 1B. Autoradiography studies showed preferential localisation of [^{125}I]-CLINDE labelling in the ipsilateral striatum and cortex when compared to contralateral side, with a maximal signal between 4 and 30 dpl. Moreover, at 1 and 4 dpl the distribution of radioactivity was diffused and homogeneous in the whole ipsilateral hemisphere, whereas it was restricted to the lesioned striatum and the cortical needle track for QA injection at 7, 14, 30 and 60 dpl. At 90 dpl, the increased [^{125}I]-CLINDE ipsilateral binding was almost unnoticeable, in comparison with contralateral side.

Competition studies, consisting of a pretreatment with unlabeled PK11195 (5 mg/kg), 15 min before the radiotracer, as well as evaluation of [^{125}I]-CLINDE brain accumulation in sham animals, were undertaken at 14 dpl. Results are presented in Figure 2A.

We observed that the accumulation of radioactivity in the ipsilateral striatum was significantly decreased in sham animals compared with the QA lesioned group at 14 dpl: $0.21 \pm 0.01\%$ ID/g tissue for sham group vs $0.56 \pm 0.07\%$ ID/g tissue for QA group, i.e. -62%, ($p < 0.05$), while no significant difference was observed in any other brain region between these 2 groups. The pre-treatment with PK11195 significantly reduced the intensity of ipsilateral striatal and

cortical [125 I]-CLINDE binding ($p<0.05$), with the same profile of inhibition (decreases of 75% and 69% in striatum and cortex, respectively), while no significant difference was observed in contralateral hemisphere and in ipsilateral hippocampus. Moreover, whereas cerebellar radioactivity was similar in QA lesioned and sham group ($0.33\pm0.02\%$ ID/g tissue for both groups), PK11195 pre-treatment induced a strong decrease of the signal in cerebellum ($0.08\pm0.01\%$ ID/g tissue, ie -75%, $p<0.05$).

Ex vivo autoradiographic images, comparing the striatal, hippocampal and cerebellar localization of radioactivity 30 min after [125 I]-CLINDE injection between sham, PK11195 pre-injected and QA lesioned animals at 14 dpl are presented in Fig. 2B. Autoradiography study evidenced that pre-treatment with PK11195 markedly decreased striatal [125 I]-CLINDE binding, and that in sham group, accumulation of radioactivity was spatially corresponding to the needle track for vehicle injection. Moreover, it confirmed that [125 I]-CLINDE cerebellar distribution was similar in sham and QA lesioned animals, and inhibited by PK11195 pre-treatment.

Immunohistochemistry studies

A time course of neuronal loss, as well as activation of two glial subpopulations, microglia and astrocytes have been analyzed by immunohistochemistry in contra- and ipsilateral striatum of rats at days 1, 7, 14, 60 and 90 after QA injection (Fig. 3).

The excitotoxic QA lesion significantly increased ($p<0.05$) OX-42 and GFAP immunoreactivity with respect to non-lesioned side of the brain early as 1 dpl, ie concomitantly with significant evidence of neuronal loss.

Neuronal loss was significantly higher at day 14 (83.9 ± 2.2 %) with respect to the other time points ($p < 0.05$). Neuronal loss decreased with time after QA injection and was of 12.5 ± 3.4 at day 90.

Microglia immunostaining using Ox-42 showed cells with the ramified morphology of reactive microglia in the lesion, and evidenced an increase of CD11b immunoreactivity between days 1 and 14, where microglia activation was the highest (4443.9 ± 1030.7 %). Beyond this time point, immunolabeling showed a clear decrease in microglial expression in ipsilateral striatum to 257.3 ± 89.6 % in relation to the control at 90 dpl. Measurement of GFAP immunoreactivity demonstrated that QA injection increased astrogliosis relative to nonlesioned control at days 7 and 14 (760.9 ± 63.4 % and 704.6 ± 57.4 %, respectively) and decreased further after ($p < 0.05$).

At 90 dpl, immunoreactivity of OX-42 and GFAP in ipsilateral striatum remained slightly but significantly higher than the theoretical value of 0%; likewise, neuronal density in ipsilateral striatum remained lower than that measured in contralateral.

Discussion

Expression of TSPO is dramatically upregulated under neuropathological conditions, including neurodegenerative diseases, brain trauma, and cerebral ischemia. This overexpression of TSPO has been related to the activation of glial cells after brain injury. Thereby, TSPO is considered an attractive and sensitive marker for the quantification and visualization of neuropathological changes induced during cerebral inflammation. We have shown in a previous paper that the TSPO SPECT ligand CLINDE reflects accurately the changing degree of neuroinflammation in the same rat model of excitotoxic lesion induced by striatal lesion with QA (19). We demonstrated that the large TSPO up-regulation in the lesioned brain hemisphere was correlated with the intensity of the lesion and that in vivo accumulation of CLINDE was able to discriminate these various degrees of microglial activation.

In the present study, we evaluated over a long time period (1- to 90-days post lesion, dpl) the time-dependent evolution in [125 I]-CLINDE signal induced by a 150 nmol striatal injection of QA, as compared with that in the contralateral side. In ipsilateral striatum, ex vivo cerebral biodistribution, a method recognized to reflect the exhaustive distribution of the tracer in living animals, evidenced an increased binding of [125 I]-CLINDE from 1 day after striatal lesion, reaching a maximal value at day 4, followed by a plateau up to 30 dpl, and before a progressive return to normal values at 90 days, i.e., similar binding on the lesioned and intact sides.

The binding profile in the ipsilateral cortex was different, showing a progressive increase beginning at 1 dpl and peaking at 4 dpl, with a 170% increase on the lesioned compared to the intact side, followed by a progressive decrease until a basal level at 90 dpl, as in the striatum. This discrepancy correlates with a widespread breakdown of the blood–brain barrier (BBB). Indeed, this QA model has the drawback of causing a rupture of the BBB during injection,

which may influence brain distribution of the tracer. This BBB disruption is reversible and integrity is restored about 7 days after surgery (29). Therefore, cortical peak at 4 dpl might be related to this BBB transitory breakdown, and the lasting cortical uptake probably reflected the presence of a mechanical lesion due to the needle track, whereas microglial activation was still present in the excitotoxic striatal lesion. Accordingly, ex vivo autoradiographic imaging confirmed the trend of a higher uptake of [125 I]-CLINDE associated with neuroinflammation in both ipsilateral striatum and cortex. This BBB disruption was also evidenced by the diffused and homogeneous distribution of radioactivity in the whole ipsilateral hemisphere in autoradiography at 1 and 4 dpl.

The inflammatory astro- and microglial reactions, in parallel to neuronal loss, were also characterized by immunohistochemistry at 1, 7, 14, 60 and 90 days after QA injection. The results showed an overall increase in glial expression in the lesioned area and indicated that this increase was maximal at 7 dpl for astrocytes and at 14 dpl for microglia. Indeed, the number of CD11b-reactive cells (i.e., of monocytic lineage) increased progressively up to day 14 and decreased in the following weeks, until day 90. The origin of these OX-42-positive cells can be the activation of central resident microglia, or the migration within brain parenchyma of peripheral circulating leukocytes after BBB disruption.

Immunohistochemistry using a primary antibody targeting CD11b antigen as a marker of microglia was used in previous studies to characterise the temporal profile of microglial activation in a slightly different model of excitotoxicity in which QA was administered at higher dose (210 nmol vs 150 nmol in the present work), and further forward in the striatum (AP: +1.5 mm vs +0.7 mm in the present work, (23)). The increase in activated microglia expression was detected in the striatum at 8 dpl, was still present at 30 dpl, and then disappeared at 60 dpl. Therefore, this time course of microglial activation closely paralleled the pattern of uptake of [125 I]-CLINDE we described here.

The expression of GFAP-immunoreactive astrocytes peaked at 7 and 14 dpl, in agreement with the results observed by Ryu et al (30) in a close model of QA striatal injection. This observation is consistent with reports of increased microglial populations at 7 days after ethanol-induced neuronal insults, followed by a later decrease at 30 days (31).

Interestingly, the time course of [125 I]-CLINDE binding that we observed using ex vivo biodistribution and autoradiography matched with the temporal profile of both microglia / macrophage activation and astrogliosis. This observation is not in agreement with data from Moresco et al (23), suggesting that OX-42 signal decreased after 30 dpl, whereas [11 C]-PK11195 binding still significantly enhanced at 60 dpl. Authors suggested that this discrepancy could be explained by the TSPO expression in delayed reactive gliosis, but this hypothesis was not demonstrated using GFAP specific antibody. Nevertheless, these data were based on low number of animals (n=1 for OX-42 and n=3 for [11 C]-PK11195, versus n=6 for both immunohistochemistry and CLINDE studies in our experiments). Moreover, the relevance of our finding is also based on the fact that analyses were extended to later time points up to 90 days after lesion, and both molecular imaging ([125 I]-CLINDE) and glial immunoreactivity (OX-42 and GFAP) demonstrated the transitory process of neuroinflammation in this model.

The relative contribution of microglia and astrocytes in TSPO overexpression in central nervous system during neuroinflammation is a subject of debate (32), and may also depend on the animal model, species and strain used, and on the time course of the neuroinflammatory process. To clarify this point, we used combined autoradiographic and immunohistochemical experiments, using OX-42 as marker of microglia, GFAP for astrocytes, and [125 I]-CLINDE for TSPO. It suggests that TSPO overexpression was the consequence of both microglial investigation and astrogliosis, since the plateau observed in CLINDE striatal binding from 7

to 14 dpl, was temporally correlated to the successive peaks of GFAP and OX-42 immunoreactivity. Moreover, ex vivo autoradiography evidenced the striatal co-localization of [¹²⁵I]-CLINDE binding with both antibodies immunostaining. This cellular expression of TSPO shall be confirmed using specific anti-TSPO antibodies in immuno-costaining with OX-42 and GFAP, since we did not achieve this point in the present study for technical reasons.

In our model, neurons staining using NeuN antibody showed an important neuronal loss (about 85% at 14 dpl), while it progressively decreased thereafter, to practically disappear at 90 dpl. Similar results have been previously described after intrastriatal QA injection, but these studies did not explore this “neurogenesis-like” process beyond 6 weeks after surgery (23, 33-35). The mechanisms involved in this neuronal regeneration could be linked to the migration of newborns neurons in the striatum. Indeed, Tattersfield et al evidenced an early increase of progenitor cells in the subventricular zone (SVZ) following QA injection (35). More recently, another study in a QA model showed that these cells expressing the doublecortin marker for neuroblasts, migrate from the SVZ into striatum during the first days after injury (34). Collin et al observed the same cell proliferation in the SVZ following QA injection, related to an important increase of migrating neurons in the ipsilateral striatum at 14 dpl (33). They also showed that these “newborn-cells” became NeuN positive, a marker of neuronal maturation, at 6 weeks after surgery. Moreover, the level of this neuronal proliferation was correlated with the amount of QA injected. Therefore, the neuronal regeneration we observed in the present work might be explained by this neurogenesis process, demonstrated in these different studies using QA.

This study highlighted the comparative time-courses of neuroinflammation and neurodegeneration in this excitotoxic model, showing the concomitance and transitory nature of both neuronal loss and reactive gliosis processes in the lesioned striatum. Therefore, this

finding provide the possibility to propose a time window during which the administration of factors able to block or reduce the neuroinflammation process could also be able to block or slow down the degenerative process, at least in this animal model. Thus, beneficial effects of different agents able to act on microglial activation have recently been reported (9, 30), and it is of great interest for therapy development, follow-up of the disease, and global understanding of pathogenesis, to also consider their effectiveness longitudinally.

In this regard, such therapeutic approach could be accessed through molecular imaging methods using selected Positron Emission Tomography (PET) TSPO radiotracers. Indeed, serial in vivo PET time-course experiments can be performed repeatedly over time for the same animal. Among these PET TSPO radioligands, we previously demonstrated the suitability of the fluorine-18-labeled pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)acetamide, [^{18}F]-DPA-714, to detect neuroinflammation in a slightly different model of excitotoxicity in which QA was administered at higher dose (300 nmol vs 150 nmol in the present work) (22).

Furthermore, blocking studies strongly supported the view that this increase in [^{125}I]-CLINDE uptake was specific binding to TSPO, since it was displaced by pre-treatment with a saturating dose of cold TSPO-specific ligand PK11195. Pre-treatment with PK11195 reduced the striatal radioactive signal by 75%, which was similar to the inhibition measured with PK11195 in the same excitotoxic animal model (19), confirming equilibrium in TSPO expression. In this respect, our present results support the use of the contralateral region rather than cerebellum to optimize the target-to-background ratio measurement, at least in animal models induced by a focal cerebral lesion. Indeed, increase in CLINDE uptake evidenced a well-localized area rich in TSPO, while the brain's other regions remain devoid of TSPO, with the exception of the cerebellum. Remarkably, CLINDE uptake was significantly increased in the cerebellum compared with the left hippocampus as control, for each time point of our longitudinal follow up. At 14 dpl, the target-to-background ratio between

lesioned striatum as target and contralateral striatum or cerebellum as reference region, was 3.3 and 1.7 respectively. Interestingly, we observed a ratio with cerebellum as reference region at 7 dpl of 2.1, similar with data obtained by our group in a previous study in the same model (19). This elevated CLINDE cerebellar uptake was not related to any induced neuroinflammatory challenge, since it was present in sham animals (0.33% ID/g tissue at 14 dpl, identical to QA lesioned group), but was strongly associated with TSPO expression, since it was markedly inhibited by PK11195 pre-treatment (0.08% ID/g tissue at 14 dpl, i.e. -75%). Several authors previously documented the fact that cerebellum in rodents is a TSPO-rich brain region (36, 37); nevertheless, it is still used as reference region for quantification of radioactive signal in molecular imaging studies using TSPO radioligands (23, 38), which may represent a limitation of these studies.

In conclusion, this work highlights that molecular imaging techniques using selected radiopharmaceuticals combined with immunohistochemistry provide complementary information to follow disease progression in a preclinical model of HD disease. The temporal behavior of neuroinflammation evidenced a transitory process, characterized by an elevated and stable TSPO expression from 4 to 30 days after QA administration, evaluating by microglial activation, astrogliosis in parallel with neuronal death measurement. These results suggest that there might be a therapeutic window for anti-inflammatory agents in the early stage of the disease, and will be very useful for the longitudinal evaluation of the potential effectiveness of novel neuroprotective strategies over a long time period.

Conflict of Interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Loftis JM, Janowsky A. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacol Ther* 2003; 97:55-85.
2. Glass CK, Saijo K, Winner B, et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 2010; 140:918-34.
3. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996; 19:312-8.
4. Alexi T, Borlongan CV, Faull RL, et al. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog Neurobiol* 2000; 60:409-70.
5. Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, et al. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 1986; 321:168-71.
6. Schwarcz R, Whetsell WO, Jr., Mangano RM. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 1983; 219:316-8.
7. Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, et al. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 1996; 87:493-506.
8. von Horsten S, Schmitt I, Nguyen HP, et al. Transgenic rat model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2003; 12:617-24.
9. Leaver KR, Reynolds A, Bodard S, et al. Effects of translocator protein (18 kDa) ligands on microglial activation and neuronal death in the quinolinic-acid-injected rat striatum. *ACS Chem Neurosci* 2012; 3:114-9.
10. Ramaswamy S, Shannon KM, Kordower JH. Huntington's disease: pathological mechanisms and therapeutic strategies. *Cell Transplant* 2007; 16:301-12.

- 493 11. Heneka MT, Rodriguez JJ, Verkhratsky A. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res*
494 *Rev* 2010; 63:189-211.
- 495 12. Tikka TM, Koistinaho JE. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-
496 aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol* 2001; 166:7527-33.
- 497 13. Satoh JI, Kawana N, Yamamoto Y, et al. A survey of TREM2 antibodies reveals
498 neuronal but not microglial staining in formalin-fixed paraffin-embedded postmortem
499 Alzheimer's brain tissues. *Alzheimers Res Ther* 2013; 5:30.
- 500 14. Wake H, Moorhouse AJ, Miyamoto A, Nabekura J. Microglia: actively surveying and
501 shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci* 2013; 36:209-17.
- 502 15. Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, et al. Translocator protein (18kDa): new
503 nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and
504 molecular function. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27:402-9.
- 505 16. McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH. Isolation of the
506 mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel
507 and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:3170-4.
- 508 17. Chen MK, Guilarte TR. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of
509 brain injury and repair. *Pharmacol Ther* 2008; 118:1-17.
- 510 18. Choi IY, Lee SP, Guilfoyle DN, Helpert JA. In vivo NMR studies of
511 neurodegenerative diseases in transgenic and rodent models. *Neurochem Res* 2003; 28:987-
512 1001.
- 513 19. Arlicot N, Katsifis A, Garreau L, et al. Evaluation of CLINDE as potent translocator
514 protein (18 kDa) SPECT radiotracer reflecting the degree of neuroinflammation in a rat model
515 of microglial activation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 35:2203-11.

20. Belloli S, Moresco RM, Matarrese M, et al. Evaluation of three quinoline-carboxamide derivatives as potential radioligands for the in vivo pet imaging of neurodegeneration. *Neurochem Int* 2004; 44:433-40.
21. Dobrossy MD, Braun F, Klein S, et al. [18F]desmethoxyfallypride as a novel PET radiotracer for quantitative in vivo dopamine D2/D3 receptor imaging in rat models of neurodegenerative diseases. *Nucl Med Biol* 2012; 39:1077-80.
22. James ML, Fulton RR, Vercoullie J, et al. DPA-714, a new translocator protein-specific ligand: synthesis, radiofluorination, and pharmacologic characterization. *J Nucl Med* 2008; 49:814-22.
23. Moresco RM, Lavazza T, Belloli S, et al. Quinolinic acid induced neurodegeneration in the striatum: a combined in vivo and in vitro analysis of receptor changes and microglia activation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 35:704-15.
24. Mattner F, Katsifis A, Staykova M, et al. Evaluation of a radiolabelled peripheral benzodiazepine receptor ligand in the central nervous system inflammation of experimental autoimmune encephalomyelitis: a possible probe for imaging multiple sclerosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32:557-63.
25. Arlicot N, Petit E, Katsifis A, et al. Detection and quantification of remote microglial activation in rodent models of focal ischaemia using the TSPO radioligand CLINDE. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010; 37:2371-80.
26. Dedeurwaerdere S, Callaghan PD, Pham T, et al. PET imaging of brain inflammation during early epileptogenesis in a rat model of temporal lobe epilepsy. *EJNMMI Res* 2012; 2:60.
27. Tronel C, Rochefort GY, Arlicot N, et al. Oxidative stress is related to the deleterious effects of heme oxygenase-1 in an in vivo neuroinflammatory rat model. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013:264935.

- 541 28. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York; 1986.
- 542 29. Bolton SJ, Perry VH. Differential blood-brain barrier breakdown and leucocyte
543 recruitment following excitotoxic lesions in juvenile and adult rats. *Exp Neurol* 1998;
544 154:231-40.
- 545 30. Ryu JK, Choi HB, McLarnon JG. Peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195
546 reduces microglial activation and neuronal death in quinolinic acid-injected rat striatum.
547 *Neurobiol Dis* 2005;20:550-61.
- 548 31. Maeda J, Higuchi M, Inaji M, et al. Phase-dependent roles of reactive microglia and
549 astrocytes in nervous system injury as delineated by imaging of peripheral benzodiazepine
550 receptor. *Brain Res* 2007; 1157:100-11.
- 551 32. Venneti S, Lopresti BJ, Wiley CA. The peripheral benzodiazepine receptor
552 (Translocator protein 18kDa) in microglia: from pathology to imaging. *Prog Neurobiol* 2006;
553 80:308-22.
- 554 33. Collin T, Arvidsson A, Kokaia Z, et al. Quantitative analysis of the generation of
555 different striatal neuronal subtypes in the adult brain following excitotoxic injury. *Exp Neurol*
556 2005; 195:71-80.
- 557 34. Gordon RJ, Tattersfield AS, Vazey EM, et al. Temporal profile of subventricular zone
558 progenitor cell migration following quinolinic acid-induced striatal cell loss. *Neuroscience*
559 2007; 146:1704-18.
- 560 35. Tattersfield AS, Croon RJ, Liu YW, et al. Neurogenesis in the striatum of the
561 quinolinic acid lesion model of Huntington's disease. *Neuroscience* 2004; 127:319-32.
- 562 36. Gavish M, Bachman I, Shoukrun R, et al. Enigma of the peripheral benzodiazepine
563 receptor. *Pharmacol Rev* 1999; 51:629-50.

37. Lacapere JJ, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* 2003; 68:569-85.
38. Kropholler MA, Boellaard R, Schuitemaker A, et al. Evaluation of reference tissue models for the analysis of [^{11}C](R)-PK11195 studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26:1431-41.

For Peer Review

Figures Legend

Figure 1: Temporal cerebral characterization of TSPO overexpression after 150 nmol QA unilateral striatal injection using [125 I]-CLINDE.

Panel A: Brain regional biodistribution (% injected dose/g tissue: mean $\pm$ SEM) of [125 I]-CLINDE in selected cerebral regions of rats after 1, 4, 7, 14, 30, 60 and 90 days post QA lesion (dpl); 30 min after [125 I]-CLINDE i.v. injection.

Panel B: Representative ex vivo autoradiographic images showing [125 I]-CLINDE accumulation after QA striatal lesion. Coronal sections at the level of striatums from lesioned rats following 1, 4, 7, 14, 30, 60 and 90 dpl are depicted.

Figure 2: [125 I]-CLINDE binding in QA lesioned rat brain and sham animals, and effects of pretreatment with PK11195 at 14 days after surgery, using ex vivo experiments.

Panel A: Brain regional biodistribution (% injected dose/g tissue: mean $\pm$ SEM) of [125 I]-CLINDE in selected cerebral regions of rats after 1, 4, 7, 14, 30, 60 and 90 days post QA lesion (dpl); 30 min after [125 I]-CLINDE i.v. injection.

Brain regional biodistribution (% injected dose/g tissue: mean $\pm$ SEM) of [125 I]-CLINDE and effects of pre-treatment with the TSPO-selective ligand PK11195 (5 mg/kg) on [125 I]-CLINDE binding in selected cerebral regions of rats lesioned in the right striatum with 150nmol of QA, or injected with its vehicle (sham group), 30 min after [125 I]-CLINDE i.v. injection.

Panel B: Representative ex vivo autoradiographic images showing [125 I]-CLINDE accumulation in QA injected animals, with or without PK11195 pre-injection (competition studies) and in sham animals, 14 days after surgery, at the level of the striatal injection, hippocampus and cerebellum.

596

597 **Figure 3:** Immunohistochemistry of NeuN, Ox-42 and GFAP in rat striatum.

598 Panels A, B and C represent the same areas of contra- and ipsi-lateral striatum (1 and 2,
599 respectively) at 1, 14 and 90 days after surgery. Magnification was x20. Data are means $\pm$
600 SEM. Bars: 20 μ m.

601 Panel A: NeuN. Neurons staining in contra- and ipsi-lateral striatum (1 and 2, respectively) at
602 1, 14 and 90 days after surgery. Data for each time are expressed as relative neuronal loss in
603 the ipsilateral hemisphere *versus* the contralateral hemisphere (3).

604 Panel B: Ox-42. Activated microglia immunochemistry in contra- and ipsi-lateral striatum (1
605 and 2, respectively) at 1, 14 and 90 days after surgery. Data for each time are expressed as
606 relative increasing of microglia activation in the ipsi- *versus* the contra-lateral hemisphere (3).

607 Panel C: GFAP. Activated astrocytes staining in contra- and ipsi-lateral striatum (1 and 2,
608 respectively) at 1, 14 and 90 days after surgery. Data for each time are expressed as relative
609 increasing of astrocytes activation in the ipsi- *versus* the contra-lateral hemisphere (3).

Figure 1

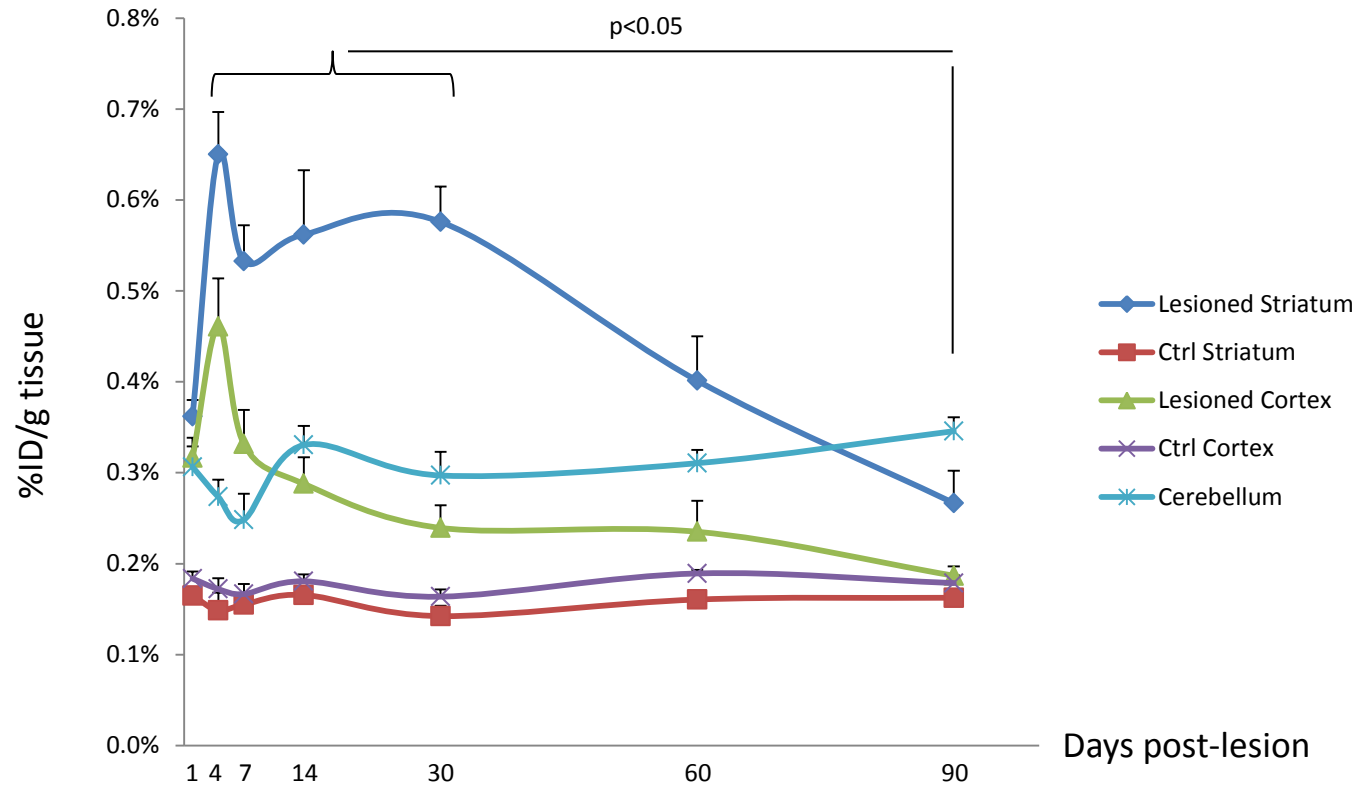
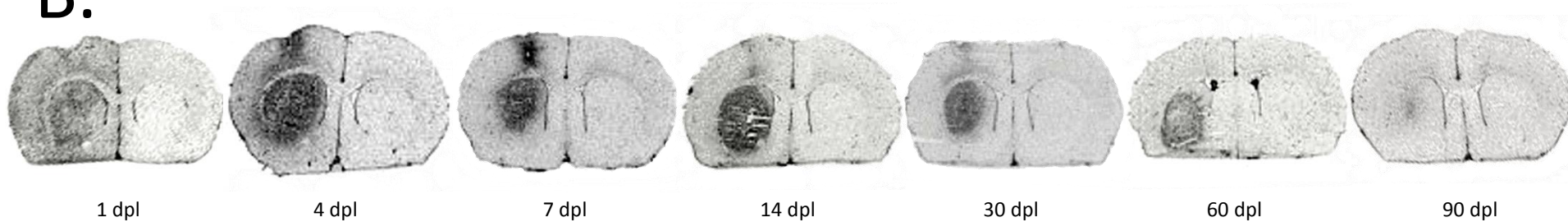
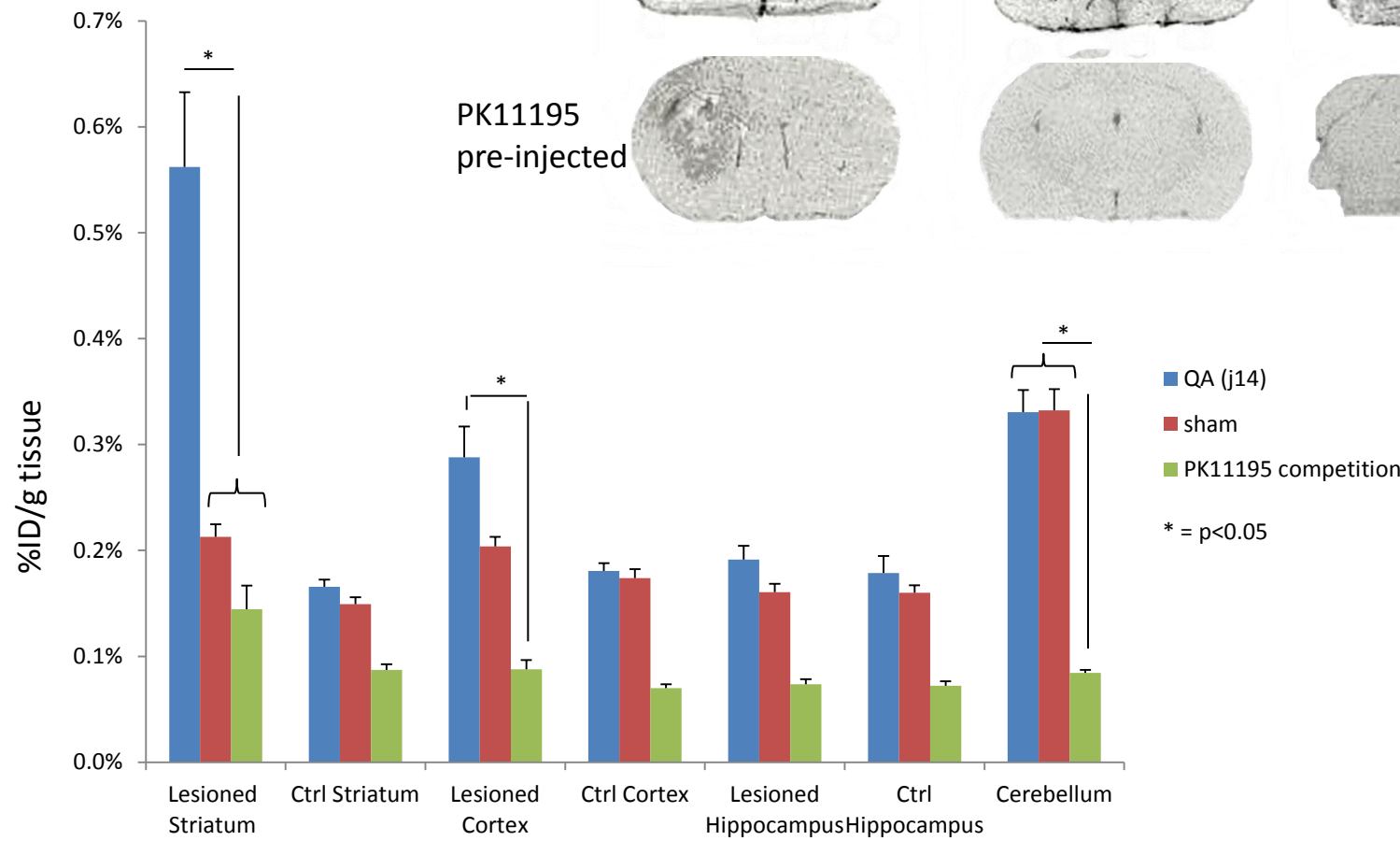
A.**B.**

Figure 2

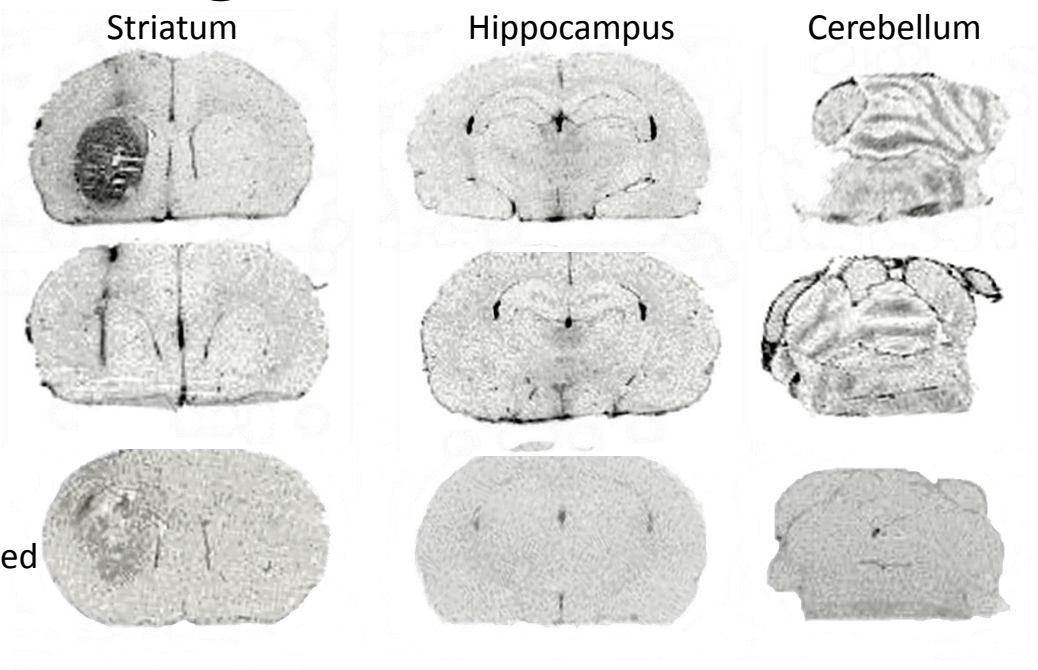
A.



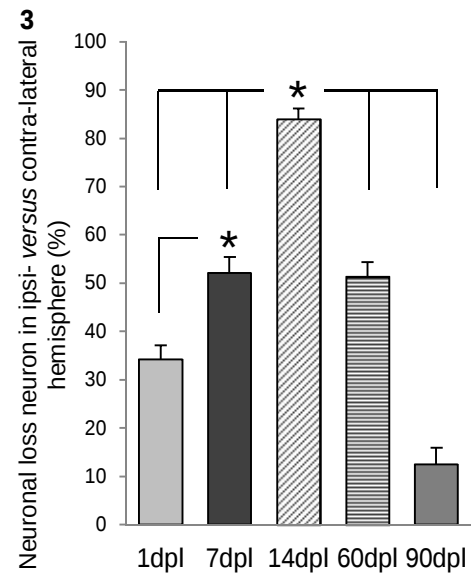
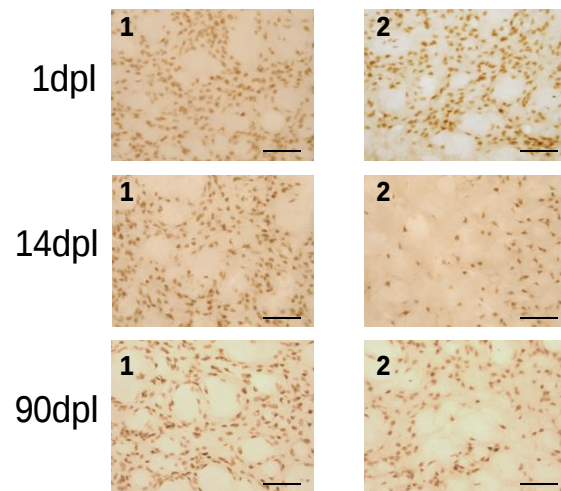
B. QA

Sham

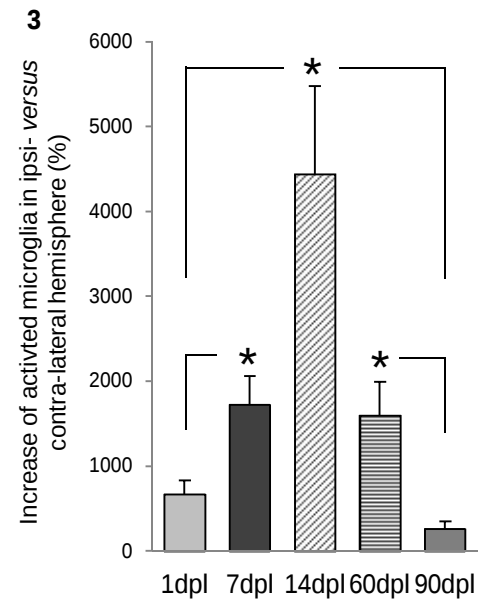
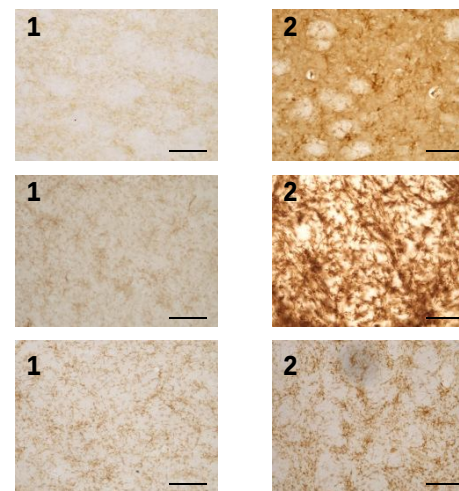
PK11195
pre-injected



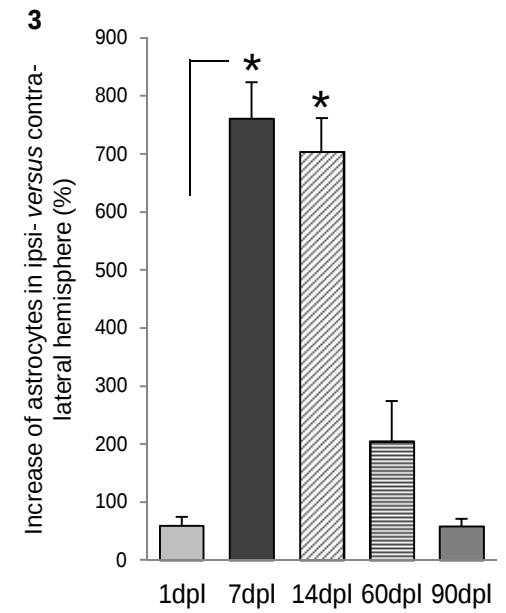
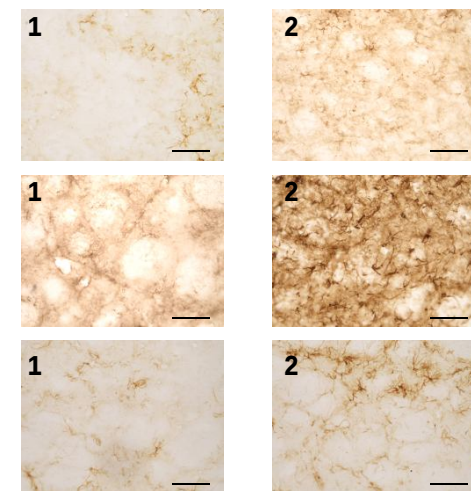
A. NeuN



B. Ox-42



C. GFAP



Discussions

La neuroinflammation est le point commun à la physiopathologie de toutes les maladies neurodégénératives. Le but de ce travail de thèse a été de tester des molécules potentiellement neuroprotectrices et anti-inflammatoires dans un modèle de neuroinflammation *in vivo* par injection intrastriale d'AQ. Deux molécules ont été testées dans ce modèle : l'hémine, un inducteur de l'hème oxygénase 1 (HO-1) et le C16, un antagoniste de la protéine kinase activée par l'ARN (PKR). Parallèlement, une caractérisation de la neuroinflammation (activation microgiale et astrocytaire) et de la mort neuronale dans ce modèle a été réalisée au cours du temps, de J1 à J90 post-lésion.

I. Induction de l'hème oxygénase 1 dans le modèle de neuroinflammation

Dans ce travail de thèse, nous avons tout d'abord étudié les effets de l'induction de la HO-1 dans le modèle AQ. La HO-1 est l'enzyme inductible responsable du catabolisme de l'hème dont l'action se traduit par le relargage de 3 produits : la biliverdine, rapidement transformée en bilirubine, par la bilirubine réductase ; le monoxyde de carbone (CO) ; et les ions ferreux (Fe^{2+}) (Jazwa and Cuadrado, 2010). La biliverdine, la bilirubine et le CO sont connus pour leurs effets anti-inflammatoires et anti-apoptotiques (Hayashi et al., 1999; Stocker et al., 1987; Wu and Wang, 2005).

De nombreuses études ont rapporté les effets de l'induction de la HO-1 dans le SNC, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, qui s'avèrent tantôt délétères et tantôt bénéfiques selon les auteurs et les études concernés. Par exemple, en culture d'astrocytes humains soumis au stress induit par la présence d'IL-1 β , l'induction de la HO-1 par l'hémine a pour conséquence une diminution de l'expression du NO et de ses dérivés, et donc un effet protecteur (Sheng et al., 2010). En revanche, dans un autre modèle de culture astrocytaire, l'induction de la HO-1 s'est avérée délétère et cet effet a été associé à une accumulation de fer intracellulaire (Schipper, 2000). *In vivo*, la HO-1 a des effets protecteurs dans certains modèles d'ischémie cérébrale (Aztatzi-Santillan et al., 2010; Zhang et al., 2012) mais délétères dans d'autres (Wang and Dore, 2007). Son expression a également été associée à des dépôts toxiques et intracellulaires de fer (Song et al., 2012).

La première étape de cette étude a permis de confirmer que l'administration systémique (i.p.) d'hémine, un inducteur et substrat de la HO-1, induisait l'expression cérébrale de la HO-1. Les résultats obtenus par western blot ont montré que 4 jours de traitement par l'hémine à la dose de 50 mg/kg permettent d'induire l'expression de la protéine HO-1 de façon significativement plus élevée que la dose de 10 mg/kg, ce qui a conduit à choisir cette dose pour étudier les effets de l'induction de la HO-1 dans notre modèle.

Trois jours post-injection d'AQ et après une injection quotidienne d'hémine entre J-1 et J2, l'analyse de la survie neuronale et de l'activation microgliale a été réalisée par immunohistochimie sur coupes flottantes. Dans nos conditions expérimentales, la lésion par l'AQ s'est traduite par une importante perte tissulaire dans le striatum, significativement augmentée chez les animaux recevant l'hémine en sus de l'AQ. Cette destruction tissulaire observée à 3 jours après la chirurgie nous montre que le modèle est trop drastique, à ce temps, pour réaliser une analyse des événements survenant dans le striatum ipsilatéral. Se placer à un temps plus précoce pourrait permettre de s'affranchir de cette destruction tissulaire. La dose d'AQ utilisée avait été validée au sein de notre équipe à 6 jours post-lésion (Arlicot et al., 2008).

Ces dommages tissulaires n'ont pas techniquement permis de quantifier la neuroinflammation et la perte neuronale dans le striatum, ce qui nous a amenés à réaliser ces mesures à distance de la lésion (bregma - 3 mm vs bregma + 0,7 mm en AP pour la chirurgie). Dans cette zone (cortex), aucune différence entre les groupes n'a été observée concernant la survie neuronale. En revanche, l'AQ y a induit de façon significative ($p < 0,01$) une activation microgliale. Cette activation a été très fortement augmentée chez les animaux ayant reçu le traitement par l'hémine et l'AQ.

A distance de la lésion, l'augmentation de l'activation microgliale observée chez les deux groupes d'animaux ayant reçu l'AQ ne s'accompagne donc pas d'une mort neuronale. Etant donné que l'activation microgliale est classiquement associée avec une mort neuronale causée par le relargage des cytokines pro-inflammatoires et des ROS par la microglie activée, ces résultats paraissent surprenants. Cependant un tel phénomène, soit une activation microgliale non associée avec une mort neuronale, a déjà été décrit dans le cortex, chez des animaux soumis à une ischémie cérébrale (Soltys et al., 2005). Il est également intéressant de noter que parmi les animaux ayant reçu le solvant de l'AQ, ceux traités par l'hémine ont un

niveau d'activation microgliale significativement ($p < 0,05$) plus élevé que les autres, ce qui suggère un effet pro-inflammatoire de l'activation de la HO-1.

L'anticorps utilisé pour détecter la microglie est l'OX-42, lequel reconnaît le CD11b, ou récepteur 3 du complément. Si le CD11b est surexprimé par la microglie activée, ce marqueur est également exprimé par les macrophages périphériques. Cependant, lors de l'analyse du marquage immunohistochimique, la morphologie hyper ramifiée des cellules observées au microscope optique (x200) dans la zone corticale (bregma – 3 mm) a fortement suggéré leur statut de cellules microgliales et permis de les différencier des éventuels macrophages infiltrants d'aspect amyboïde. En effet, la lésion induit une rupture de la BHE et va donc permettre aux cellules immunitaires périphériques d'infiltrer le site lésionnel. En utilisant l'anticorps OX-42, la discrimination morphologique était le seul moyen de différencier ces deux types cellulaires et cette analyse nous a permis de conclure à la nette prépondérance des cellules microgliales par rapport aux macrophages dans notre analyse.

La suite de cette étude s'est focalisée sur la compréhension des mécanismes impliqués dans l'effet délétère associé à l'induction de la HO-1. L'influence des ions Fe^{2+} a été étudiée en utilisant la déféroxamine (DFX), un chélateur du fer. Le traitement par la DFX (150 mg/kg ; i.p.) a permis de limiter les effets induits par l'hémine, aussi bien au niveau de la perte tissulaire dans le striatum lésé que de l'activation microgliale mesurée à distance de la lésion. Ces résultats nous montrent indirectement l'implication du fer dans le mécanisme délétère joué par le traitement par l'hémine dans notre modèle.

Le délai à l'issue duquel la destruction tissulaire a été constatée (3 jours), ainsi que l'importance de cette destruction, nous ont amenés à formuler l'hypothèse de l'implication des ROS. La détection des ROS est délicate en raison de leur courte durée de vie. Nous avons donc considéré un temps plus proche de la chirurgie intracérébrale pour les étudier : 1h post-lésion. La production des ROS a été mesurée grâce au dihydroéthidium (DHE), molécule qui pénètre dans les cellules et y est transformée en bromure d'éthidium sous l'action des ions superoxydes. Le bromure d'éthidium s'intercale dans l'ADN et émet une fluorescence dans le rouge (Zhao et al., 2005). Cette technique permet l'analyse des ROS uniquement en intracellulaire et donc dans les cellules dont l'intégrité a été préservée. Considérant la mort neuronale massive associée au modèle AQ, nous avons réalisé un double marquage Neurones-DHE dans le but d'étudier le ratio entre la quantité de fluorescence émise par le bromure d'éthidium et le nombre de neurones intacts (DHE/Neurones). Ce ratio a été significativement

augmenté chez les animaux traités par l'hémine et l'AQ par rapport à ceux ayant reçu l'AQ seul.

Une diminution de la production des ROS a été observée chez les animaux ayant reçu la DFX en sus de l'hémine, sans pour autant revenir au niveau d'expression observé chez les animaux ayant reçu l'AQ seul, démontrant l'implication du fer libre dans la production des ROS. En effet, le fer libre est connu pour catalyser des réactions générant des ROS et les effets délétères de la HO-1 ont déjà été associés à une accumulation intracellulaire de fer, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Schipper, 2000; Schipper et al., 2009). Nos résultats supportent cette hypothèse puisque la DFX a permis de diminuer tous les effets toxiques observés lors de l'induction de la HO-1 dans notre modèle, à savoir la destruction tissulaire, l'activation microgliale à distance de la lésion et l'augmentation de la production de ROS. Il est intéressant de noter que la DFX n'a pas eu d'effets chez les animaux ayant reçu l'AQ seul, montrant que le fer n'intervient pas significativement dans le phénomène d'excitotoxicité induite par l'AQ.

Afin de s'assurer de l'implication de la HO-1 dans les effets observés, un inhibiteur spécifique de l'activité de la HO-1, le Zinc Protoporphyrine IX (ZnPP), a été utilisé. Chez les animaux lésés par l'AQ et recevant à la fois l'hémine et le ZnPP, le ratio DHE/Neurones n'était pas différent de celui des animaux ayant reçu l'AQ seul. Ces données permettent de conclure que l'effet du traitement par l'hémine sur la production de ROS est bien dû à l'action de la HO-1 et non pas à un effet de l'hémine elle-même. Aucune différence n'a été observée entre les animaux hémine ou témoins ayant reçu le solvant de l'AQ en intrastriatal. L'induction de la HO-1 n'est donc délétère dans nos conditions expérimentales que chez les animaux ayant subi la lésion intracérébrale.

Ainsi, dans notre modèle d'excitotoxicité l'induction de la HO-1, la production des ROS et la destruction du tissu cérébral sont liées. Par ailleurs, la production des ROS est également associée à l'activation de la HO-1 puisque cette enzyme est induite par le stress oxydatif (Syapin, 2008). Or, l'action de la HO-1 entraînant une libération d'ions Fe^{2+} , l'un des trois produits de dégradation de l'hème, les ROS pourraient également entretenir la toxicité liée à l'induction de la HO-1.

L'injection intrastriatale d'AQ seul a induit une destruction tissulaire mais n'a pas été associée avec une modification significative de la production de ROS. Cependant l'hyperactivation des récepteurs NMDA entraîne une entrée massive d'ions Ca^{2+} dans la

cellule, dont l'accumulation provoque un déficit de l'énergie mitochondriale ainsi qu'une activation de l'oxyde nitrique synthase, deux événements pouvant induire la production de ROS (Estrada Sanchez et al., 2008). L'absence d'augmentation significative de la production de ROS dans notre modèle 1h après l'injection d'AQ était donc surprenante. Il est cependant tout à fait probable que la production de ROS liée au phénomène d'excitotoxicité seul, c'est-à-dire sans l'influence de la HO-1, ne soit pas détectable en raison de la sensibilité trop faible de la méthode de détection des ROS par la DHE ou de la fenêtre d'observation choisie.

L'isoforme constitutive de la HO-1, la HO-2, est également exprimée au niveau cérébral et est inhibée par le ZnPP (Wong et al., 2011). Son implication dans les effets observés dans cette étude ne peut donc pas être totalement écartée. La HO-2 est principalement décrite pour son rôle dans le maintien de l'homéostasie de l'hème au niveau cérébral et pourrait donc participer à la régulation de l'expression de la HO-1 (Kim et al., 2011; Sodhi et al., 2009). Nous n'avons cependant pas étudié le rôle de la HO-2 dans ce travail.

Enfin, il est possible que l'effet délétère induit par l'activation de la HO-1 soit pour partie dû à l'inducteur choisi. L'hémine est en effet à la fois l'inducteur et le substrat de la HO-1. L'hémine, en sus d'activer la HO-1 a donc également pu être dégradée par cette enzyme et participer ainsi indirectement à la libération de fer observée dans ce modèle. L'utilisation d'un autre inducteur de la HO-1 qui ne serait pas le substrat de l'enzyme, tel que le cobalt protoporphyrine pourrait éventuellement permettre de limiter les effets délétères de l'induction de la HO-1. L'association d'un autre inducteur de la HO-1 avec la DFX, un antioxydant, ou un chélateur des ROS permettrait peut-être d'optimiser les effets bénéfiques de l'induction de la HO-1. De plus, certains auteurs recommandent l'inhibition de la HO-1, notamment dans le traitement de la MA (Aztatzi-Santillan et al., 2010; Schipper et al., 2009; Zhang et al., 2012). Il serait donc également intéressant de voir l'effet d'un antagoniste de la HO-1 dans notre modèle, puisque nous n'avons utilisé le ZnPP qu'en sus de l'hémine.

Pour conclure cette partie, nous avons montré que dans notre modèle et dans ces conditions d'induction, l'activation de la HO-1 a un effet délétère et induit une augmentation de la perte tissulaire et de l'activation microgliale. Nous avons également montré que ces effets négatifs sont liés à une hyper production de ROS ainsi qu'à une accumulation de fer.

II. Inhibition de la protéine kinase activée par l'ARN dans le modèle de neuroinflammation

La seconde partie de ce travail de thèse a porté sur l'étude d'une autre molécule potentiellement neuroprotectrice et anti-inflammatoire dans le modèle AQ : le C16, un inhibiteur de la protéine kinase activée par l'ARN (PKR). La PKR est une protéine kinase dont l'activation nécessite la phosphorylation. L'action des caspases conduit au clivage de la PKR et à la libération d'un fragment catalytique (KD) qui est capable de s'auto phosphoryler et d'avoir la même activité que la forme totale de la PKR (Saelens et al., 2011). La PKR est associée avec la régulation de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et son inhibition diminue la production d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF- α en culture cellulaire mais également *in vivo* (Couturier et al., 2010a; Couturier et al., 2011; Lu et al., 2012), faisant de l'inhibition de cette protéine une cible de choix pour traiter la neuroinflammation. Le composé oxindole/imidazole C16, qui inhibe la phosphorylation et donc l'activation de la PKR a été choisi pour notre étude.

Etant donné la perte tissulaire massive observée 3 jours après l'injection d'AQ, nous sommes ici placés à un temps plus précoce soit 24h après la lésion. En effet, Ryu et al. (2005) ont rapporté dans un modèle AQ similaire une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF- α) dès 24h après l'injection d'AQ.

Nous avons mené une étude préliminaire dans le but d'observer l'influence de l'injection d'AQ sur l'expression et l'activation de la PKR. L'injection d'AQ a induit une forte diminution de l'expression de la PKR phosphorylée associée à une augmentation significative du KD phosphorylé dans le striatum ipsilatéral des animaux AQ. Ces résultats ont montré que l'injection d'AQ entraîne la mise en place d'un environnement apoptotique se traduisant par l'activation de caspases responsables du clivage de la PKR et de la libération de ce fragment KD. Le clivage de la PKR par les caspases libère le KD, fragment C-terminal de la PKR, mais également un fragment N-terminal ne possédant pas d'activité propre. Or, ces deux fragments distincts coopèrent pour participer à l'activation de la forme totale de la PKR. Plus précisément, le fragment N-terminal de la protéine va favoriser les interactions entre le fragment KD et la forme totale du PKR, induisant l'activation de cette kinase (Kalai et al.,

2007). Ainsi, le clivage de la PKR par les caspases participe à l'activation de cette protéine kinase.

L'impact du traitement par le C16 sur l'expression et l'activation de la PKR a ensuite été étudié dans ce modèle. Les premiers résultats ont permis de choisir une dose de C16 apte à inhiber significativement la PKR. En effet, si le C16 a déjà été utilisé *in vivo* dans un modèle de souris MA chez lesquelles il a induit une diminution de la neuroinflammation (Couturier et al., 2012) ou chez de jeunes rats (Ingrand et al., 2007), il n'y a pas de données disponibles concernant sa posologie optimale ou toxique chez le rat adulte. Dans un premier temps, deux doses de C16 ont donc été testées : 60 et 600 µg/kg. Les résultats les plus significatifs sur l'expression de la PKR ont été obtenus avec la plus forte dose de C16 qui a entraîné une diminution significative de l'expression du KD phosphorylé dans le striatum, montrant ainsi que le C16, à cette dose, prévient le clivage de la PKR médié par les caspases. Ainsi, pour la suite de cette étude, seule la dose de 600 µg/kg a été utilisée.

L'activité de la PKR a également été étudiée *via* son action sur le facteur de traduction eIF2 α . En effet, eIF2 α est un substrat connu de la PKR. Sa phosphorylation conduit à son inactivation et donc à une diminution de la synthèse des protéines *de novo* (Donnelly et al., 2013). Les résultats obtenus par western blotting ont montré une forte augmentation du *ratio* eIF2 α phosphorylé/eIF2 α total dans le striatum ipsilatéral des rats AQ, ce qui suggère un déficit important de la synthèse protéique. Le traitement par le C16 chez les animaux AQ s'est traduit par une diminution de ce *ratio* et donc une préservation de la synthèse protéique. Ces résultats ont été mis en parallèle avec l'intégrité tissulaire observée dans les différents groupes (coloration tissulaire hématoxyline/éosine). En effet, une forte perte tissulaire a été mesurée chez les animaux AQ, tandis que le traitement par le C16 a permis notamment la conservation des striosomes. Le C16 a inhibé la phosphorylation d'eIF2 α et l'activation de la PKR, exerçant ainsi une protection tissulaire au niveau cérébral après son injection systémique par voie intrapéritonéale.

Notre modèle de neuroinflammation excitotoxique induit une activation microgliale (Arlicot et al., 2008) et donc potentiellement une augmentation de la production de cytokines dans les structures cérébrales. Les concentrations des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α ainsi que les anti-inflammatoires IL-4 et IL-10 ont été quantifiées dans le striatum des animaux en utilisant la technique du Luminex™.

Une augmentation de l'IL-1 β a été retrouvée uniquement dans le striatum controlatéral des animaux AQ. Ces résultats s'expliquent par la sévérité de la lésion induite par l'AQ et la propagation du stress cellulaire subconséquent dans l'hémisphère controlatéral. La chirurgie induit également une rupture de la BHE, permettant la propagation de messagers pro-inflammatoires (radicaux libres, cytokines, enzymes protéolytiques) dans l'hémisphère controlatéral (Reynolds and Morton, 1998; Vezzani et al., 1989). De plus, l'AQ est un métabolite de la kynurénine qui est un intermédiaire dans la voie du métabolisme du tryptophane en acide nicotinique. La kynurénine peut être produite par les cellules endothéliales et les péricytes, puis être métabolisée en AQ par les macrophages périvasculaires et la microglie (Owe-Young et al., 2008). Les atteintes neuronales, aussi bien aiguës (AVC) que chroniques (MH) engendrent des dérégulations de la voie kynurénine, associées à une augmentation de la production d'AQ (Zadori et al., 2012). Dans cette situation de lésion cérébrale, l'AQ pourrait donc être retrouvé en concentration suffisamment élevée dans l'hémisphère controlatéral pour exercer son excitotoxicité.

Par ailleurs, l'absence d'augmentation de l'IL-1 β dans le striatum ipsilatéral peut s'expliquer par la perte tissulaire importante ainsi que par un probable déficit de synthèse protéique lié à la phosphorylation d'eIF2 α . En effet, dans ces conditions expérimentales, les cellules du striatum ipsilatéral pourraient être en incapacité de sécréter des cytokines.

L'augmentation de l'IL-1 β dans le striatum controlatéral a été significativement ($p < 0,05$) réduite chez les animaux ayant reçu le C16. Cependant ces résultats ne permettent pas d'affirmer que le C16 a exercé une action anti-inflammatoire. En effet, le C16 a limité les dégâts tissulaires causés par l'AQ ce qui a probablement pu, dans le même temps, diminuer la diffusion du stress cellulaire dans le striatum controlatéral. Il est donc possible que la neuroinflammation ne se soit pas propagée dans l'hémisphère controlatéral grâce à la préservation tissulaire induite par le C16. Par ailleurs, le dosage des cytokines TNF- α , IL-4 et IL-10 n'a pas montré de différence significative entre les hémisphères ni entre les groupes traités par le C16 ou non. Concernant le TNF- α , d'autres études ont montré que l'administration d'un antagoniste du récepteur à l'IL-1 induisait une diminution du TNF- α et limitait la mort des neurones dopaminergiques dans un modèle animal de la MP (Koprich et al., 2008). Le C16 ayant induit une diminution de l'IL-1 β dans notre modèle, un effet du traitement par le C16 sur le TNF- α était donc attendu. Cependant les mesures effectuées par le Luminex™ étaient extrêmement proches du seuil de détection de cette technique, ce qui ne

nous a pas permis de quantifier cette production de cytokines. D'autres auteurs utilisant la lésion par l'AQ ont montré un niveau extrêmement bas de plusieurs cytokines, dont le TNF- α , dans le cortex et l'hippocampe 18h post-lésion (Taupin et al., 1993). Ainsi, la question de la non détection du TNF- α peut être due au temps d'euthanasie choisi, trop éloigné dans le temps de la lésion pour permettre le dosage de cette cytokine dans de bonnes conditions. A 24h post-lésion, l'IL-1 β est donc la seule cytokine dont la concentration a été significativement modifiée dans notre modèle et sa production dans l'hémisphère controlatéral a été significativement réduite par le traitement avec le C16.

En sus de ces analyses biochimiques par western blot et Luminex™, des analyses par immunofluorescence ont été réalisées dans le but d'observer l'expression de la caspase-3 clivée parallèlement à la population neuronale dans les striatum ipsi- et contro-latéraux. La caspase-3 clivée est la forme active de la caspase-3 et son expression est synonyme d'apoptose. Dans notre étude, l'injection intracérébrale d'AQ est caractérisée par une forte destruction neuronale, associée à de l'apoptose 24h post-lésion. L'administration de C16 à la dose de 600 μ g/kg a diminué significativement la mort neuronale ainsi que le nombre de neurones exprimant la forme activée de la caspase-3 dans le striatum ipsilatéral. Ces résultats suggèrent que la protection neuronale induite par le traitement avec le C16 est notamment liée à un effet anti-apoptotique de ce composé.

Cette étude a montré pour la première fois l'implication de la PKR dans notre modèle *in vivo* d'excitotoxicité. Les résultats obtenus ont démontré, dans un premier temps, la capacité du C16 à traverser la BHE et la notion d'effet-dose qui semble caractériser le mode d'action de la molécule. Le résultat majeur de cette étude concerne la capacité du C16 à préserver les neurones de l'apoptose, mais également sa capacité à diminuer la production d'IL-1 β dans le striatum controlatéral des animaux ayant reçu l'AQ. Cependant, à 24h post-lésion, les dégâts cérébraux induits par l'AQ sont déjà importants et réduisent la pertinence du dosage des cytokines dans le striatum lésé. Il serait informatif de quantifier ces cytokines à des temps plus précoces, ou bien de réaliser une cinétique de leur production au cours du temps, dans les 24 ou 48 premières heures suivant l'injection intrastriatale d'AQ.

Le C16 pourrait donc être considéré comme un traitement potentiel des maladies neurodégénératives. Il est cependant important de mener d'autres études pré-cliniques afin d'établir le schéma d'administration optimal ainsi que la dose à utiliser. De plus, la

pharmacocinétique ainsi que la toxicité du produit doivent être étudiées avant d'envisager des essais chez l'homme.

III. Caractérisation cinétique du modèle de lésion intrastriatale

Le modèle d'injection intrastriatale d'AQ a jusqu'à présent été exploité par l'équipe pour analyser les conséquences de la neuroinflammation à des temps relativement proches de la lésion, de 24h à 7 jours après l'injection. Si ce modèle a déjà été étudié jusqu'à 60 jours après l'injection d'AQ, ces études n'ont pas toujours mis en relation la neuroinflammation et la mort neuronale. Il nous a semblé intéressant de suivre l'évolution de l'activation microgliale et astrocytaire ainsi que la survie neuronale au cours du temps dans ce modèle.

Etant donné l'intérêt croissant que suscite la neuroinflammation dans le diagnostic et le traitement des maladies neurodégénératives et des atteintes aiguës du SNC, de nombreux radiomarqueurs de la microglie ont été développés pour suivre son activation *in vivo*. Les marqueurs ciblent notamment la TSPO, soit la protéine translocatrice de 18 kDa, située au niveau de la membrane mitochondriale et qui est surexprimée par la microglie activée. En effet, la surexpression de la TSPO est associée à l'activation des cellules gliales après une atteinte cérébrale, faisant de la TSPO un marqueur sensible pour la visualisation et la quantification de la neuroinflammation (Ji et al., 2008).

Le radio ligand CLINDE, spécifique de la TSPO est utilisable pour l'imagerie par tomographie d'émission monophotonique (TEMP) lorsqu'il est couplé à l'iode 123 ($[^{123}\text{I}]$ -CLINDE). Il permet de suivre le degré de neuroinflammation dans notre modèle de lésion excitotoxique. Ainsi, une forte surexpression de la TSPO dans l'hémisphère ipsilatéral, proportionnelle à la quantité d'AQ injecté a été précédemment décrite (Arlicot et al., 2008).

Les résultats de la biodistribution, effectuée à 7 temps entre J1 et J90 post-lésion, ont montré une augmentation de la fixation du $[^{125}\text{I}]$ -CLINDE dans le striatum ipsilatéral dès le premier jour après l'injection d'AQ, avant d'atteindre un plateau entre 4 et 30 jours puis de diminuer progressivement jusqu'à 90 jours après la lésion, temps auquel l'expression de la

TSPO est similaire entre le striatum lésé et contrôle. Le profil de fixation du [125 I]-CLINDE est différent dans le cortex, où l'augmentation du côté ipsilatéral commence dès J1, atteint un pic à J4 puis diminue progressivement jusqu'à J90. La présence d'une activation microgliale dans le cortex peut s'expliquer par la lésion mécanique induite par le trajet de l'aiguille d'injection d'AQ mais également par la rupture de la BHE. En effet, cette rupture peut influencer la distribution du traceur et permettre sa diffusion dans le cortex. Cependant la rupture de la BHE est réversible et son intégrité est restaurée 7 jours après la chirurgie (Bolton and Perry, 1998). Des autoradiographies *ex vivo* utilisant le [125 I]-CLINDE permettent également de mettre en évidence les conséquences de la rupture de la BHE sur la diffusion du CLINDE, qui est retrouvé de façon diffuse dans tout l'hémisphère ipsilatéral à J1 et J4.

La fixation du CLINDE dans l'hippocampe n'a pas montré de variation en fonction du temps ou de la lésion. En revanche, la fixation du CLINDE dans le cervelet est significativement plus élevée que dans les structures prélevées du côté contrôle (striatum, cortex, hippocampe) et ce quel que soit le temps post-lésion considéré. Cependant, cette forte fixation du CLINDE dans cette zone n'était pas consécutive à la lésion. En effet, le niveau de fixation du CLINDE dans le cervelet est retrouvé chez des animaux témoins à 14 jours post-injection de PBS.

Afin de confirmer la spécificité du CLINDE dans ce travail, une étude de compétition a été réalisée en utilisant la forme froide du PK11195, le ligand de référence de la TSPO. Le prétraitement par une dose élevée de PK11195 à J14 a empêché la fixation du [125 I]-CLINDE et a entraîné une diminution de 75% du signal radioactif dans le striatum. Ces résultats sont similaires à ceux d'une étude précédemment menée dans le même modèle à 6 jours post-lésion (Arlicot et al., 2008), confirmant la spécificité du marquage de la TSPO par le CLINDE. La diminution de la fixation du CLINDE dans le cervelet après le pré-traitement au PK11195 froid a également montré que la fixation du CLINDE dans cette structure était bien liée à l'expression de la TSPO.

Les résultats obtenus dans le cervelet sont à mettre en relation avec certaines données de la littérature. En effet, plusieurs auteurs ont montré que le cervelet des rongeurs est une zone naturellement riche en TSPO (Gavish et al., 1999; Lacapere and Papadopoulos, 2003). Malgré cela, le cervelet est encore utilisé par nombre d'auteurs comme région de référence négative pour la quantification du signal radioactif dans des études d'imagerie moléculaire utilisant des radioligands de la TSPO (Kropholler et al., 2007; Moresco et al., 2008).

L'activation microgliale a également été étudiée par immunohistochimie, de même que l'activation astrocytaire et la mort neuronale. Les résultats obtenus ont montré une augmentation de l'activation des cellules gliales dans le striatum ipsilatéral *versus* controlatéral, à chaque temps de mesure. L'activation des astrocytes a été étudiée en utilisant un anticorps dirigé contre la GFAP, protéine surexprimée par les astrocytes lors de leur activation. L'astrogliose était maximale à J7 et J14. Ces résultats sont proches de ceux obtenus par Ryu et al. (2005) dans le modèle d'AQ. L'activation astrocytaire décroît ensuite jusqu'à J90 sans pour autant revenir à un niveau basal puisqu'une différence significative est retrouvée pour ces cellules entre les striatum ipsi- et contro-latéraux à ce temps. La quantité de cellules microgliales activées augmente progressivement jusqu'à atteindre un pic à J14, avant de décroître jusqu'à J90. Comme pour les astrocytes, il n'y a pas cependant de retour à la valeur basale à J90.

L'analyse des cellules microgliales activées a été faite en utilisant un anticorps dirigé contre le CD11b. Même si, comme cela a été dit précédemment, cet anticorps ne permet pas de discriminer les cellules microgliales et les macrophages, les cellules observées présentaient pour la grande majorité un phénotype ramifié correspondant aux cellules microgliales. Cependant quelques macrophages ont été observés à J1. Il est à noter que, pour les temps se situant après J7 la contamination des résultats par les macrophages périphériques est moins probable puisque ce temps est compatible avec la réparation de la BHE suite à une lésion de ce type (Bolton and Perry, 1998). Il est cependant envisageable que l'activation microgliale puisse entraîner le recrutement des macrophages périphériques.

Il est intéressant de noter la similarité entre l'évolution de la fixation du [¹²⁵I]-CLINDE au cours du temps observée par biodistribution *ex vivo* et par autoradiographie et les résultats obtenus par immunohistochimie concernant l'activation de la microglie et des astrocytes. Ces observations s'opposent aux résultats obtenus par Moresco et al. (2005) qui montraient chez des animaux lésés par l'AQ une diminution de l'expression du CD11b après 30 jours post-lésion tandis que l'expression de la TSPO quantifiée à l'aide du [¹¹C]-PK11195 était encore significativement augmentée à J60. Les auteurs de cette étude ont suggéré que cette différence pourrait être due à l'expression astrocytaire de la TSPO bien qu'aucun marquage GFAP ne vienne confirmer cette hypothèse. De plus, cette étude reposait sur un très faible nombre d'animaux.

L'expression de la TSPO à la fois par la microglie et les astrocytes est soumise à controverse et pourrait dépendre du modèle, de l'espèce et de la durée du processus inflammatoire (Venneti et al., 2006). C'est pour clarifier ce point que plusieurs techniques ont été combinées dans cette étude : l'autoradiographie et l'immunohistochimie. Les résultats obtenus suggèrent que la surexpression de la TSPO observée est la conséquence de l'activation microgiale et de l'astrogliose. En effet, la fixation striatale du CLINDE a atteint un plateau qui est corrélé au niveau temporel avec les différents pics d'expression maximale de la GFAP et du CD11b. De plus, les autoradiographies *ex vivo* ont mis en évidence la colocalisation de la fixation du CLINDE et de l'expression de marqueurs gliaux dans le striatum ipsilatéral. Cette expression cellulaire de la TSPO ne pourrait être confirmée que par un double marquage TSPO/GFAP et TSPO/CD11b.

Concernant la survie neuronale, le marquage des neurones par immunohistochimie a permis de calculer le taux de perte neuronale qui a atteint un maximum (85%) à J14 après l'injection d'AQ et a ensuite décru progressivement jusqu'à J90 sans toutefois restaurer totalement la population de neurones. Des résultats similaires sont décrits dans la littérature avec des modèles d'injection intrastriatale d'AQ mais les données disponibles ne vont pas au-delà de 6 semaines post-chirurgie, tandis que notre travail s'est poursuivi jusqu'à J90 (Collin et al., 2005; Gordon et al., 2007b; Moresco et al., 2008; Tattersfield et al., 2004).

Ce phénomène de régénération neuronale n'a pas été exploré dans cette étude mais des données publiées nous fournissent des éléments de compréhension. Ainsi, Tattersfield et al. (2004) ont montré une augmentation précoce des progéniteurs cellulaires dans la zone subventriculaire (ZSV) suite à l'injection d'AQ. Plus récemment, une autre étude a montré que les progéniteurs cellulaires issus de la ZSV et exprimant un marqueur des neuroblastes (la doublecortine) migraient dans le striatum dès les premiers jours suivant la lésion (Gordon et al., 2007). Collin et al. (2005) ont exploré la maturation des cellules prolifératives retrouvées dans le striatum suite à l'injection d'AQ. Eux aussi ont montré une prolifération des progéniteurs dans la ZSV suite à l'injection d'AQ. Ils ont également rapporté qu'à 6 semaines post-lésion, ces neurones exprimaient la protéine neuronale nucléaire (NeuN) spécifique des neurones matures et que le niveau de neurogénèse observé était proportionnel à la quantité d'AQ injecté.

A noter que lors de cette étude de l'évolution du niveau d'inflammation au cours du temps les marquages immunohistochimiques réalisés à J4 n'ont pu être analysés en raison de

la perte tissulaire massive au niveau du striatum lésé, comparable à celle observée à J3 post-lésion dans le premier volet de cette thèse.

Afin d'évaluer l'efficacité d'agents à visée thérapeutique sur la neuroinflammation, le recours à l'imagerie moléculaire utilisant des traceurs exploitables par la tomographie à émission de positions (TEP) de la TSPO apparaît comme une méthodologie prometteuse. De fait, plusieurs études *in vivo* suivant la progression de la neuroinflammation peuvent être réalisées à plusieurs temps sur le même animal. Le [^{11}C]PK11195 a été utilisé comme radioligand dans des études d'imagerie TEP, dans des modèles pré-cliniques de rongeurs lésés par injection d'AQ ou assimilé (acide kaïnique) et en clinique chez des patients MH (Belloli et al., 2004; Moresco et al., 2008; Pavese et al., 2006; Politis et al., 2008). Cependant ce traceur présente des limites et notamment un niveau de fixation non spécifique élevé, un mauvais ratio signal-sur-bruit et son couplage au carbone-11 dont la courte demi-vie (30 min) nécessite la présence d'un cyclotron à proximité du site clinique. D'autres radioligands de la TSPO ont donc été développés, comme le [^{18}F]DPA-714 qui a été notamment utilisé pour évaluer la neuroinflammation chez des animaux ayant reçu de l'AQ (James et al., 2008). Ce traceur a également été utilisé chez des patients sains ou atteints de sclérose latérale amyotrophique (Arlicot et al., 2012; Corcia et al., 2012).

Cependant, la quantification des traceurs de la TSPO chez l'homme pose des difficultés techniques. En effet, l'affinité des traceurs envers la TSPO est influencée par un polymorphisme de cette protéine. Dans l'exon 4, le polymorphisme d'un seul nucléotide se traduit par la substitution d'une alanine par la thréonine en position 147. En Europe, la forme prédominante ($\approx 70\%$) est celle comprenant l'alanine, laquelle possède une forte affinité (Hight, H) pour les traceurs de la TSPO tandis que la forme possédant la thréonine ($\approx 30\%$) a une faible affinité (Low, L) pour ces traceurs. Ce polymorphisme induit l'existence de trois niveaux d'affinité : 49% d'homozygotes de forte affinité (HH) ; 9% d'homozygotes de faible affinité (LL) et 42% d'hétérozygotes (HL). Tous les radioligands actuellement utilisés pour marquer la TSPO *in vivo* présentent une différence de fixation entre les individus HH et LL, fixation jusqu'à 50 fois plus élevée chez les HH (Owen et al., 2012). La fixation des traceurs chez les individus hétérozygotes est également très variable et plus difficile à prédire que pour les homozygotes.

Conclusions sur le travail de thèse

Ce travail de thèse a permis d'améliorer notre connaissance du modèle AQ utilisé comme modèle d'étude de la neuroinflammation. Une des limites imposée par le modèle tient à la sévérité des lésions provoquées par l'injection de 150 nmol d'AQ qui rend techniquement impossible certaines analyses au niveau du striatum ipsilatéral dans les premiers jours post-lésion. La dose de 75 nmol a précédemment été testée par l'équipe et a induit une augmentation significative de l'expression de la TSPO et du CD11b 6 jours post-lésion (Arlicot et al., 2008), bien que le niveau d'inflammation induite soit inférieur à celui obtenu avec la dose de 150 nmol. Cependant, cette dose plus faible pourrait permettre de conserver une intégrité tissulaire compatible avec l'analyse des conséquences de la lésion sur la survie neuronale ou la production de cytokines dans le striatum ipsilatéral.

L'étude cinétique a mis en évidence la persistance de la neuroinflammation au cours du temps dans ce modèle, jusqu'à 3 mois post-lésion avec la dose de 150 nmol. Ainsi, le modèle jusqu'à présent exploité pour étudier la neuroinflammation aiguë pourrait être utilisé comme modèle de neuroinflammation chronique et permettre l'évaluation des effets d'agents pharmacologiques dans ces conditions. Les résultats obtenus dans l'étude cinétique montrent que la cicatrisation tissulaire permet de réaliser des marquages dans le striatum lésé dès J7 post-lésion. Ainsi, l'évaluation de nouvelles molécules potentiellement neuroprotectrices et anti-inflammatoires pourrait intervenir entre 7 jours et trois mois post-lésion.

Comme évoqué précédemment, la microglie âgée peut réagir rapidement (microglie « réactive ») ou différemment (microglie sénescence) à un signal activateur. Les astrocytes, qui sont les seconds acteurs de la neuroinflammation, subissent eux aussi les effets du vieillissement et acquièrent également un phénotype « réactif » chez le rongeur âgé. Ainsi, l'utilisation d'animaux âgés dans le modèle AQ pourrait permettre d'étudier la réponse des effecteurs de la neuroinflammation au cours du vieillissement chez le rat et donc de se placer dans un contexte plus proche de celui observé en clinique dans les maladies neurodégénératives.

Les effets observés avec le C16 ont été obtenus à l'issue de 3 jours de traitement. Les conséquences de l'administration de cette molécule seraient intéressantes à étudier au long cours sur la neuroinflammation chronique. Le C16 a déjà été utilisée chez des souris transgéniques modèles de la MA et cela a permis de diminuer la neuroinflammation (Couturier et al., 2012). Nos résultats nous confortent dans l'idée de tester le C16 dans différents modèles de maladies neurodégénératives (Parkinson, SEP...).

Une étude complémentaire pourrait porter sur le phénomène de neurogénèse observé dans l'étude de suivi au cours du temps. Le C16 a montré au cours de notre second volet d'étude des effets neuroprotecteurs et anti-apoptotiques significatifs. Etant donné que cette molécule inhibe la PKR et que les implications et les différents rôles de cette protéine kinase restent à explorer, il serait intéressant d'étudier l'influence du C16 sur ce phénomène.

La TSPO est une protéine principalement impliquée dans le métabolisme du cholestérol. Cependant, d'autres rôles de la TSPO ont été décrits dont la plupart sont liés au fonctionnement mitochondrial tel que le transport d'ions et de la porphyrine, la synthèse de l'hème, la respiration cellulaire, les processus oxydatifs, l'apoptose ou la prolifération cellulaires (Girard et al., 2012). Cependant, les mécanismes à l'origine de la surexpression de la TSPO lors de la neuroinflammation demeurent inexpliqués. Deux études ont montré le rôle neuroprotecteur et anti-inflammatoire de l'injection *in situ* d'agonistes de la TSPO dans le modèle de lésion AQ (Leaver et al., 2012; Ryu et al., 2005). La TSPO pourrait-elle être une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de la neuroinflammation ? Il semble nécessaire de mieux caractériser les fonctions cérébrales de cette protéine mitochondriale avant d'envisager d'agir directement sur la TSPO pour diminuer la neuroinflammation.

Par ailleurs, si cette étude s'est penchée sur l'activation microgliale dans sa globalité, il est important de prendre en compte les différents phénotypes d'activation de la microglie. A l'heure actuelle, l'identification des différents types de cellules microgliales se fait principalement *in vitro*. Un des défis actuels est de caractériser les cellules M1 et M2 ainsi que les éléments menant à leur évolution dans l'un ou l'autre des phénotypes. Cela permettrait à terme leurs identification et différenciation *ex vivo* et *in vivo* mais également la mise au point de thérapeutiques ciblant uniquement les cellules M1 et permettant de conserver les effets neuroprotecteurs des cellules microgliales de type M2.

Références bibliographiques

Abramov, A.Y., Canevari, L., and Duchen, M.R. (2004). Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochimica et biophysica acta* 1742, 81-87.

Aguzzi, A., Barres, B.A., and Bennett, M.L. (2013). Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science* 339, 156-161.

Aid, S., Silva, A.C., Candelario-Jalil, E., Choi, S.H., Rosenberg, G.A., and Bosetti, F. (2010). Cyclooxygenase-1 and -2 differentially modulate lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption through matrix metalloproteinase activity. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30, 370-380.

Aisen, P.S., Schafer, K.A., Grundman, M., Pfeiffer, E., Sano, M., Davis, K.L., Farlow, M.R., Jin, S., Thomas, R.G., Thal, L.J., and Alzheimer's Disease Cooperative, S. (2003). Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 289, 2819-2826.

Ali, B.H. (2001). Dimethyl sulfoxide: recent pharmacological and toxicological research. *Vet Hum Toxicol* 43, 228-231.

Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N., and Murtagh, F.R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clinical anatomy* 8, 429-431.

Anderson, A.C., Anderson, D.E., Bregoli, L., Hastings, W.D., Kassam, N., Lei, C., Chandwaskar, R., Karman, J., Su, E.W., Hirashima, M., *et al.* (2007). Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science* 318, 1141-1143.

Angot, E., Steiner, J.A., Hansen, C., Li, J.Y., and Brundin, P. (2010). Are synucleinopathies prion-like disorders? *Lancet neurology* 9, 1128-1138.

Arlicot, N., Katsifis, A., Garreau, L., Mattner, F., Vergote, J., Duval, S., Kousignian, I., Bodard, S., Guilloteau, D., and Chalon, S. (2008). Evaluation of CLINDE as potent translocator protein (18 kDa) SPECT radiotracer reflecting the degree of neuroinflammation in a rat model of microglial activation. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 35, 2203-2211.

Arlicot, N., Petit, E., Katsifis, A., Toutain, J., Divoux, D., Bodard, S., Roussel, S., Guilloteau, D., Bernaudin, M., and Chalon, S. (2010). Detection and quantification of remote microglial activation in rodent models of focal ischaemia using the TSPO radioligand CLINDE. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 37, 2371-2380.

Arlicot, N., Vercouillie, J., Ribeiro, M.J., Tauber, C., Venel, Y., Baulieu, J.L., Maia, S., Corcia, P., Stabin, M.G., Reynolds, A., *et al.* (2012). Initial evaluation in healthy humans of [18F]DPA-714, a potential PET biomarker for neuroinflammation. *Nuclear medicine and biology* 39, 570-578.

Aztatzi-Santillan, E., Nares-Lopez, F.E., Marquez-Valadez, B., Aguilera, P., and Chanez-Cardenas, M.E. (2010). The protective role of heme oxygenase-1 in cerebral ischemia. *Central nervous system agents in medicinal chemistry* 10, 310-316.

Bachstetter, A.D., Norris, C.M., Sompol, P., Wilcock, D.M., Goulding, D., Neltner, J.H., St Clair, D., Watterson, D.M., and Van Eldik, L.J. (2012). Early stage drug treatment that normalizes proinflammatory cytokine production attenuates synaptic dysfunction in a mouse model that exhibits age-dependent progression of Alzheimer's disease-related pathology. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 10201-10210.

- Balachandran, S., Roberts, P.C., Brown, L.E., Truong, H., Pattnaik, A.K., Archer, D.R., and Barber, G.N. (2000). Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity* 13, 129-141.
- Balla, J., Jacob, H.S., Balla, G., Nath, K., and Vercellotti, G.M. (1992). Endothelial cell heme oxygenase and ferritin induction by heme proteins: a possible mechanism limiting shock damage. *Transactions of the Association of American Physicians* 105, 1-6.
- Baker, B.J., Akhtar, L.N., and Benveniste, E.N. (2009). SOCS1 and SOCS3 in the control of CNS immunity. *Trends in immunology* 30, 392-400.
- Banks, W.A., and Robinson, S.M. (2010). Minimal penetration of lipopolysaccharide across the murine blood-brain barrier. *Brain, behavior, and immunity* 24, 102-109.
- Barreto, G., White, R.E., Ouyang, Y., Xu, L., and Giffard, R.G. (2011). Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke. *Central nervous system agents in medicinal chemistry* 11, 164-173.
- Bartels, A.L., and Leenders, K.L. (2010). Cyclooxygenase and neuroinflammation in Parkinson's disease neurodegeneration. *Current neuropharmacology* 8, 62-68.
- Barzilai, A., and Melamed, E. (2003). Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *Trends in molecular medicine* 9, 126-132.
- Baum, L., Lam, C.W., Cheung, S.K., Kwok, T., Lui, V., Tsoh, J., Lam, L., Leung, V., Hui, E., Ng, C., *et al.* (2008). Six-month randomized, placebo-controlled, double-blind, pilot clinical trial of curcumin in patients with Alzheimer disease. *Journal of clinical psychopharmacology* 28, 110-113.
- Belloli, S., Moresco, R.M., Matarrese, M., Biella, G., Sanvito, F., Simonelli, P., Turolla, E., Olivieri, S., Cappelli, A., Vomero, S., *et al.* (2004). Evaluation of three quinoline-carboxamide derivatives as potential radioligands for the in vivo pet imaging of neurodegeneration. *Neurochemistry international* 44, 433-440.
- Benavides, J., Quarteronet, D., Imbault, F., Malgouris, C., Uzan, A., Renault, C., Dubroeuq, M.C., Gueremy, C., and Le Fur, G. (1983). Labelling of "peripheral-type" benzodiazepine binding sites in the rat brain by using [3H]PK 11195, an isoquinoline carboxamide derivative: kinetic studies and autoradiographic localization. *Journal of neurochemistry* 41, 1744-1750.
- Benner, E.J., Banerjee, R., Reynolds, A.D., Sherman, S., Pisarev, V.M., Tsiperson, V., Nemachek, C., Ciborowski, P., Przedborski, S., Mosley, R.L., and Gendelman, H.E. (2008). Nitrated alpha-synuclein immunity accelerates degeneration of nigral dopaminergic neurons. *PloS one* 3, e1376.
- Bjorkqvist, M., Wild, E.J., Thiele, J., Silvestroni, A., Andre, R., Lahiri, N., Raibon, E., Lee, R.V., Benn, C.L., Soulet, D., *et al.* (2008). A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *The Journal of experimental medicine* 205, 1869-1877.
- Blalock, J.E., Bost, K.L., and Smith, E.M. (1985). Neuroendocrine peptide hormones and their receptors in the immune system. Production, processing and action. *Journal of neuroimmunology* 10, 31-40.
- Block, M.L., Zecca, L., and Hong, J.S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature reviews. Neuroscience* 8, 57-69.
- Block, M.L., and Hong, J.S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in neurobiology* 76, 77-98.

- Boireau, A., Bordier, F., Dubedat, P., Peny, C., and Imperato, A. (1997). Thalidomide reduces MPTP-induced decrease in striatal dopamine levels in mice. *Neuroscience letters* 234, 123-126.
- Boje, K.M., and Arora, P.K. (1992). Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain research* 587, 250-256.
- Boka, G., Anglade, P., Wallach, D., Javoy-Agid, F., Agid, Y., and Hirsch, E.C. (1994). Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neuroscience letters* 172, 151-154.
- Bolton, S.J., and Perry, V.H. (1998). Differential blood-brain barrier breakdown and leucocyte recruitment following excitotoxic lesions in juvenile and adult rats. *Experimental neurology* 154, 231-240.
- Bonelli, R.M., Hodl, A.K., Hofmann, P., and Kapfhammer, H.P. (2004). Neuroprotection in Huntington's disease: a 2-year study on minocycline. *International clinical psychopharmacology* 19, 337-342.
- Broussard, G.J., Mytar, J., Li, R.C., and Klapstein, G.J. (2012). The role of inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology* 20, 109-126.
- Butovsky, O., Bukshpan, S., Kunis, G., Jung, S., and Schwartz, M. (2007). Microglia can be induced by IFN-gamma or IL-4 to express neural or dendritic-like markers. *Molecular and cellular neurosciences* 35, 490-500.
- Carson, M.J., Bilousova, T.V., Puntambekar, S.S., Melchior, B., Doose, J.M., and Ethell, I.M. (2007). A rose by any other name? The potential consequences of microglial heterogeneity during CNS health and disease. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 4, 571-579.
- Chan, W.Y., Kohsaka, S., and Rezaie, P. (2007). The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain research reviews* 53, 344-354.
- Charcot J.-M., Vulpian A. (1861) De la paralysie agitante. *Gazette Hebdomadaire de Médecine et de Chirurgie*, 8, pp. 765–767 816–820, and 1861; 9: 54–59.
- Chen, M., Ona, V.O., Li, M., Ferrante, R.J., Fink, K.B., Zhu, S., Bian, J., Guo, L., Farrell, L.A., Hersch, S.M., *et al.* (2000). Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nature medicine* 6, 797-801.
- Chew, L.J., Fusar-Poli, P., and Schmitz, T. (2013). Oligodendroglial alterations and the role of microglia in white matter injury: relevance to schizophrenia. *Developmental neuroscience* 35, 102-129.
- Chora, A.A., Fontoura, P., Cunha, A., Pais, T.F., Cardoso, S., Ho, P.P., Lee, L.Y., Sobel, R.A., Steinman, L., and Soares, M.P. (2007). Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *The Journal of clinical investigation* 117, 438-447.
- Collin, T., Arvidsson, A., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2005). Quantitative analysis of the generation of different striatal neuronal subtypes in the adult brain following excitotoxic injury. *Experimental neurology* 195, 71-80.
- Colton, C., and Wilcock, D.M. (2010). Assessing activation states in microglia. *CNS & neurological disorders drug targets* 9, 174-191.

Colton, C.A. (2009). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 4, 399-418.

Corcia, P., Tauber, C., Vercoullie, J., Arlicot, N., Prunier, C., Praline, J., Nicolas, G., Venel, Y., Hommet, C., Baulieu, J.L., *et al.* (2012). Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. *PloS one* 7, e52941.

Couturier, J., Morel, M., Pontcharraud, R., Gontier, V., Fauconneau, B., Paccalin, M., and Page, G. (2010a). Interaction of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) with the death receptor signaling pathway in amyloid beta (Abeta)-treated cells and in APPSLPS1 knock-in mice. *The Journal of biological chemistry* 285, 1272-1282.

Couturier, J., Paccalin, M., Lafay-Chebassier, C., Chalon, S., Ingrand, I., Pinguet, J., Pontcharraud, R., Guillard, O., Fauconneau, B., and Page, G. (2012). Pharmacological inhibition of PKR in APPswePS1dE9 mice transiently prevents inflammation at 12 months of age but increases Abeta42 levels in the late stages of the Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research* 9, 344-360.

Couturier, J., Paccalin, M., Morel, M., Terro, F., Milin, S., Pontcharraud, R., Fauconneau, B., and Page, G. (2011). Prevention of the beta-amyloid peptide-induced inflammatory process by inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase in primary murine mixed co-cultures. *Journal of neuroinflammation* 8, 72.

Couturier, J., Page, G., Morel, M., Gontier, C., Claude, J., Pontcharraud, R., Fauconneau, B., and Paccalin, M. (2010b). Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase strongly decreases cytokine production and release in peripheral blood mononuclear cells from patients with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 21, 1217-1231.

Crystal, S.C., Leonidas, J., Jakubowski, A., and Di Rocco, A. (2009). Thalidomide induced acute worsening of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 24, 1863-1864.

Czeh, M., Gressens, P., and Kaindl, A.M. (2011). The yin and yang of microglia. *Developmental neuroscience* 33, 199-209.

de Haas, A.H., Boddeke, H.W., and Biber, K. (2008). Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. *Glia* 56, 888-894.

Dedeurwaerdere, S., Callaghan, P.D., Pham, T., Rahardjo, G.L., Amhaoul, H., Berghofer, P., Quinlivan, M., Mattner, F., Loc'h, C., Katsifis, A., and Gregoire, M.C. (2012). PET imaging of brain inflammation during early epileptogenesis in a rat model of temporal lobe epilepsy. *EJNMMI research* 2, 60.

de Jong, D., Jansen, R., Hoefnagels, W., Jellesma-Eggenkamp, M., Verbeek, M., Borm, G., and Kremer, B. (2008). No effect of one-year treatment with indomethacin on Alzheimer's disease progression: a randomized controlled trial. *PloS one* 3, e1475.

Del Rio-Hortega P. (1932) Microglia. In: *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*, edited by Penfield W. New York: Hoeber, p. 482-1924-534.

Demuro, A., Parker, I., and Stutzmann, G.E. (2010). Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry* 285, 12463-12468.

Deng, W., Saxe, M.D., Gallina, I.S., and Gage, F.H. (2009). Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 13532-13542.

- Depboylu, C., Stricker, S., Ghobril, J.P., Oertel, W.H., Priller, J., and Hoglinger, G.U. (2012). Brain-resident microglia predominate over infiltrating myeloid cells in activation, phagocytosis and interaction with T-lymphocytes in the MPTP mouse model of Parkinson disease. *Experimental neurology* 238, 183-191.
- Desbuides, N., Rochefort, G.Y., Schlecht, D., Machet, M.C., Halimi, J.M., Eder, V., Hyvelin, J.M., and Antier, D. (2007). Heme oxygenase-1 inducer hemin prevents vascular thrombosis. *Thromb Haemost* 98, 614-620.
- Dey, M., Cao, C., Dar, A.C., Tamura, T., Ozato, K., Sicheri, F., and Dever, T.E. (2005). Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2 α substrate recognition. *Cell* 122, 901-913.
- Dodel, R., Spottke, A., Gerhard, A., Reuss, A., Reinecker, S., Schimke, N., Trenkwalder, C., Sixel-Doring, F., Herting, B., Kamm, C., *et al.* (2010). Minocycline 1-year therapy in multiple-system-atrophy: effect on clinical symptoms and [(11)C] (R)-PK11195 PET (MEMSA-trial). *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 25, 97-107.
- Donnelly, N., Gorman, A.M., Gupta, S., and Samali, A. (2013). The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70, 3493-3511.
- Esposito, E., Di Matteo, V., Benigno, A., Pierucci, M., Crescimanno, G., and Di Giovanni, G. (2007). Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. *Experimental neurology* 205, 295-312.
- Estrada Sanchez, A.M., Mejia-Toiber, J., and Massieu, L. (2008). Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Archives of medical research* 39, 265-276.
- Evans, M.C., Couch, Y., Sibson, N., and Turner, M.R. (2013). Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular and cellular neurosciences* 53, 34-41.
- Ferretti, M.T., Allard, S., Partridge, V., Ducatenzeiler, A., and Cuello, A.C. (2012). Minocycline corrects early, pre-plaque neuroinflammation and inhibits BACE-1 in a transgenic model of Alzheimer's disease-like amyloid pathology. *Journal of neuroinflammation* 9, 62.
- Field, R., Champion, S., Warren, C., Murray, C., and Cunningham, C. (2010). Systemic challenge with the TLR3 agonist poly I:C induces amplified IFN α /beta and IL-1beta responses in the diseased brain and exacerbates chronic neurodegeneration. *Brain, behavior, and immunity* 24, 996-1007.
- Fillit, H., Ding, W.H., Buee, L., Kalman, J., Altstiel, L., Lawlor, B., and Wolf-Klein, G. (1991). Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* 129, 318-320.
- Findeis, M.A. (2007). The role of amyloid beta peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacology & therapeutics* 116, 266-286.
- Ford, A.L., Goodsall, A.L., Hickey, W.F., and Sedgwick, J.D. (1995). Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4⁺ T cells compared. *Journal of immunology* 154, 4309-4321.
- Frautschy, S.A., Hu, W., Kim, P., Miller, S.A., Chu, T., Harris-White, M.E., and Cole, G.M. (2001). Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of A β -induced cognitive deficits and neuropathology. *Neurobiology of aging* 22, 993-1005.

Fujita, K.A., Ostaszewski, M., Matsuoka, Y., Ghosh, S., Glaab, E., Trefois, C., Crespo, I., Perumal, T.M., Jurkowski, W., Antony, P.M., *et al.* (2013). Integrating Pathways of Parkinson's Disease in a Molecular Interaction Map. *Molecular neurobiology*.

Gabbita, S.P., Srivastava, M.K., Eslami, P., Johnson, M.F., Kobritz, N.K., Tweedie, D., Greig, N.H., Zemlan, F.P., Sharma, S.P., and Harris-White, M.E. (2012). Early intervention with a small molecule inhibitor for tumor necrosis factor- α prevents cognitive deficits in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation* 9, 99.

Garcia-Bueno, B., Serrats, J., and Sawchenko, P.E. (2009). Cerebrovascular cyclooxygenase-1 expression, regulation, and role in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation by inflammatory stimuli. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 12970-12981.

Garcia-Matas, S., Gutierrez-Cuesta, J., Coto-Montes, A., Rubio-Acero, R., Diez-Vives, C., Camins, A., Pallas, M., Sanfeliu, C., and Cristofol, R. (2008). Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity. *Aging cell* 7, 630-640.

Gatson, J.W., Liu, M.M., Abdelfattah, K., Wigginton, J.G., Smith, S., Wolf, S., and Minei, J.P. (2013). Resveratrol decreases inflammation in the brain of mice with mild traumatic brain injury. *The journal of trauma and acute care surgery* 74, 470-474; discussion 474-475.

Gavish, M., Bachman, I., Shoukrun, R., Katz, Y., Veenman, L., Weisinger, G., and Weizman, A. (1999). Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacological reviews* 51, 629-650.

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

Gimenez-Llort, L., Blazquez, G., Canete, T., Johansson, B., Oddo, S., Tobena, A., LaFerla, F.M., and Fernandez-Teruel, A. (2007). Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 31, 125-147.

Ghosh, A., Roy, A., Liu, X., Kordower, J.H., Mufson, E.J., Hartley, D.M., Ghosh, S., Mosley, R.L., Gendelman, H.E., and Pahan, K. (2007). Selective inhibition of NF- κ B activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 18754-18759.

Giorgini, F., Moller, T., Kwan, W., Zwilling, D., Wacker, J.L., Hong, S., Tsai, L.C., Cheah, C.S., Schwarcz, R., Guidetti, P., and Muchowski, P.J. (2008). Histone deacetylase inhibition modulates kynurenine pathway activation in yeast, microglia, and mice expressing a mutant huntingtin fragment. *The Journal of biological chemistry* 283, 7390-7400.

Girard, C., Liu, S., Adams, D., Lacroix, C., Sineus, M., Boucher, C., Papadopoulos, V., Rupprecht, R., Schumacher, M., and Groyer, G. (2012). Axonal regeneration and neuroinflammation: roles for the translocator protein 18 kDa. *Journal of neuroendocrinology* 24, 71-81.

Goldstein, L., Teng, Z.P., Zeserson, E., Patel, M., and Regan, R.F. (2003). Hemin induces an iron-dependent, oxidative injury to human neuron-like cells. *J Neurosci Res* 73, 113-121.

Gong, C., Qin, Z., Betz, A.L., Liu, X.H., and Yang, G.Y. (1998). Cellular localization of tumor necrosis factor α following focal cerebral ischemia in mice. *Brain research* 801, 1-8.

Gordon, P.H., Moore, D.H., Miller, R.G., Florence, J.M., Verheijde, J.L., Doorish, C., Hilton, J.F., Spitalny, G.M., MacArthur, R.B., Mitsumoto, H., *et al.* (2007a). Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial. *Lancet neurology* 6, 1045-1053.

Gordon, R.J., Tattersfield, A.S., Vazey, E.M., Kells, A.P., McGregor, A.L., Hughes, S.M., and Connor, B. (2007b). Temporal profile of subventricular zone progenitor cell migration following quinolinic acid-induced striatal cell loss. *Neuroscience* 146, 1704-1718.

Gottfried-Blackmore, A., Kaunzner, U.W., Idoyaga, J., Felger, J.C., McEwen, B.S., and Bulloch, K. (2009). Acute in vivo exposure to interferon-gamma enables resident brain dendritic cells to become effective antigen presenting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 20918-20923.

Graeber, M.B., and Streit, W.J. (2010). Microglia: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119, 89-105.

Group, A.D.C., Bentham, P., Gray, R., Sellwood, E., Hills, R., Crome, P., and Raftery, J. (2008). Aspirin in Alzheimer's disease (AD2000): a randomised open-label trial. *Lancet neurology* 7, 41-49.

Guo, Y., Deng, L., Li, J., Guo, S., Wang, E., and Dong, S. (2011). Hemin-graphene hybrid nanosheets with intrinsic peroxidase-like activity for label-free colorimetric detection of single-nucleotide polymorphism. *ACS nano* 5, 1282-1290.

Haga, S., Akai, K., and Ishii, T. (1989). Demonstration of microglial cells in and around senile (neuritic) plaques in the Alzheimer brain. An immunohistochemical study using a novel monoclonal antibody. *Acta neuropathologica* 77, 569-575.

Halliday, G., Robinson, S.R., Shepherd, C., and Kril, J. (2000). Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 27, 1-8.

Halliday, G.M., and Stevens, C.H. (2011). Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 26, 6-17.

Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. (1997). Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *Journal of neurochemistry* 69, 1330-1331.

Hamby, M.E., and Sofroniew, M.V. (2010). Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 7, 494-506.

Hanisch, U.K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40, 140-155.

Hanisch, U.K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience* 10, 1387-1394.

Harry, G.J. (2013). Microglia during development and aging. *Pharmacology & therapeutics* 139, 313-326.

Hausler, K.G., Prinz, M., Nolte, C., Weber, J.R., Schumann, R.R., Kettenmann, H., and Hanisch, U.K. (2002). Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *The European journal of neuroscience* 16, 2113-2122.

Hayashi, S., Takamiya, R., Yamaguchi, T., Matsumoto, K., Tojo, S.J., Tamatani, T., Kitajima, M., Makino, N., Ishimura, Y., and Suematsu, M. (1999). Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circulation research* 85, 663-671.

Haynes, S.E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M.E., Gan, W.B., and Julius, D. (2006). The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nature neuroscience* 9, 1512-1519.

Heneka, M.T., and Feinstein, D.L. (2001). Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. *Journal of neuroimmunology* 114, 8-18.

Heneka, M.T., Loschmann, P.A., Gleichmann, M., Weller, M., Schulz, J.B., Wullner, U., and Klockgether, T. (1998). Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor- α /lipopolysaccharide. *Journal of neurochemistry* 71, 88-94.

Heneka, M.T., Rodriguez, J.J., and Verkhratsky, A. (2010). Neuroglia in neurodegeneration. *Brain research reviews* 63, 189-211.

Hickey, M.A., Zhu, C., Medvedeva, V., Lerner, R.P., Patassini, S., Franich, N.R., Maiti, P., Frautschy, S.A., Zeitlin, S., Levine, M.S., and Chesselet, M.F. (2012). Improvement of neuropathology and transcriptional deficits in CAG 140 knock-in mice supports a beneficial effect of dietary curcumin in Huntington's disease. *Molecular neurodegeneration* 7, 12.

Hirsch, E.C., Vyas, S., and Hunot, S. (2012). Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 18 Suppl 1, S210-212.

Hoozemans, J.J., Veerhuis, R., Janssen, I., van Elk, E.J., Rozemuller, A.J., and Eikelenboom, P. (2002). The role of cyclo-oxygenase 1 and 2 activity in prostaglandin E₂ secretion by cultured human adult microglia: implications for Alzheimer's disease. *Brain research* 951, 218-226.

Hoozemans, J.J., Veerhuis, R., Rozemuller, A.J., Arendt, T., and Eikelenboom, P. (2004). Neuronal COX-2 expression and phosphorylation of pRb precede p38 MAPK activation and neurofibrillary changes in AD temporal cortex. *Neurobiology of disease* 15, 492-499.

Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S., Tsukamoto, H., and Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 49, 1215-1228.

Hristova, M., Cuthill, D., Zbarsky, V., Acosta-Saltos, A., Wallace, A., Blight, K., Buckley, S.M., Peebles, D., Heuer, H., Waddington, S.N., and Raivich, G. (2010). Activation and deactivation of periventricular white matter phagocytes during postnatal mouse development. *Glia* 58, 11-28.

Hu, J., Van den Steen, P.E., Sang, Q.X., and Opdenakker, G. (2007). Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nature reviews. Drug discovery* 6, 480-498.

Huang, H.C., and Jiang, Z.F. (2009). Accumulated amyloid-beta peptide and hyperphosphorylated tau protein: relationship and links in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 16, 15-27.

Huntington, G. (2003). On chorea. George Huntington, M.D. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 15, 109-112.

Huntington Study Group, D.I. (2010). A futility study of minocycline in Huntington's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 25, 2219-2224.

Imbimbo, B.P. (2009). An update on the efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease. *Expert opinion on investigational drugs* 18, 1147-1168.

Ingrand, S., Barrier, L., Lafay-Chebassier, C., Fauconneau, B., Page, G., and Hugon, J. (2007). The oxindole/imidazole derivative C16 reduces in vivo brain PKR activation. *FEBS letters* 581, 4473-4478.

Investigators, N.N.-P. (2006). A randomized, double-blind, futility clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease. *Neurology* 66, 664-671.

Ishii, T., and Haga, S. (1992). Complements, microglial cells and amyloid fibril formation. *Research in immunology* 143, 614-616.

James, M.L., Fulton, R.R., Vercoullie, J., Henderson, D.J., Garreau, L., Chalon, S., Dolle, F., Costa, B., Guilloteau, D., and Kassiou, M. (2008). DPA-714, a new translocator protein-specific ligand: synthesis, radiofluorination, and pharmacologic characterization. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 49, 814-822.

Jamin, N., Neumann, J.M., Ostuni, M.A., Vu, T.K., Yao, Z.X., Murail, S., Robert, J.C., Giatzakis, C., Papadopoulos, V., and Lacapere, J.J. (2005). Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Molecular endocrinology* 19, 588-594.

Jammi, N.V., Whitby, L.R., and Beal, P.A. (2003). Small molecule inhibitors of the RNA-dependent protein kinase. *Biochemical and biophysical research communications* 308, 50-57.

Janssen, B.J., Huizinga, E.G., Raaijmakers, H.C., Roos, A., Daha, M.R., Nilsson-Ekdahl, K., Nilsson, B., and Gros, P. (2005). Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature* 437, 505-511.

Jantzen, P.T., Connor, K.E., DiCarlo, G., Wenk, G.L., Wallace, J.L., Rojiani, A.M., Coppola, D., Morgan, D., and Gordon, M.N. (2002). Microglial activation and beta -amyloid deposit reduction caused by a nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug in amyloid precursor protein plus presenilin-1 transgenic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 2246-2254.

Jarlestedt, K., Rousset, C.I., Faiz, M., Wilhelmsson, U., Stahlberg, A., Sourkova, H., Pekna, M., Mallard, C., Hagberg, H., and Pekny, M. (2010). Attenuation of reactive gliosis does not affect infarct volume in neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice. *PloS one* 5, e10397.

Jazwa, A., and Cuadrado, A. (2010). Targeting heme oxygenase-1 for neuroprotection and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Current drug targets* 11, 1517-1531.

Jeong, G.S., Lee, D.S., Kim, D.C., Jahng, Y., Son, J.K., Lee, S.H., and Kim, Y.C. (2011). Neuroprotective and anti-inflammatory effects of mollugin via up-regulation of heme oxygenase-1 in mouse hippocampal and microglial cells. *European journal of pharmacology* 654, 226-234.

Ji, B., Maeda, J., Sawada, M., Ono, M., Okauchi, T., Inaji, M., Zhang, M.R., Suzuki, K., Ando, K., Staufenbiel, M., *et al.* (2008). Imaging of peripheral benzodiazepine receptor expression as biomarkers of detrimental versus beneficial glial responses in mouse models of Alzheimer's and other CNS pathologies. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 12255-12267.

Kalai, M., Suin, V., Festjens, N., Meeus, A., Bernis, A., Wang, X.M., Saelens, X., and Vandenabeele, P. (2007). The caspase-generated fragments of PKR cooperate to activate full-length PKR and inhibit translation. *Cell death and differentiation* 14, 1050-1059.

Karimi-Abdolrezaee, S., and Billakanti, R. (2012). Reactive astrogliosis after spinal cord injury-beneficial and detrimental effects. *Molecular neurobiology* 46, 251-264.

Karlstetter, M., Lippe, E., Walczak, Y., Moehle, C., Aslanidis, A., Mirza, M., and Langmann, T. (2011). Curcumin is a potent modulator of microglial gene expression and migration. *Journal of neuroinflammation* 8, 125.

Kawahara, K., Suenobu, M., Yoshida, A., Koga, K., Hyodo, A., Ohtsuka, H., Kuniyasu, A., Tamamaki, N., Sugimoto, Y., and Nakayama, H. (2012). Intracerebral microinjection of interleukin-4/interleukin-13 reduces beta-amyloid accumulation in the ipsilateral side and improves cognitive deficits in young amyloid precursor protein 23 mice. *Neuroscience* 207, 243-260.

Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological reviews* 91, 461-553.

Kettenmann, H., Kirchhoff, F., and Verkhratsky, A. (2013). Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron* 77, 10-18.

Kiaei, M., Petri, S., Kipiani, K., Gardian, G., Choi, D.K., Chen, J., Calingasan, N.Y., Schafer, P., Muller, G.W., Stewart, C., *et al.* (2006). Thalidomide and lenalidomide extend survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 2467-2473.

Kim, B.G., Shin, D.H., Jeon, G.S., Seo, J.H., Kim, Y.W., Jeon, B.S., and Cho, S.S. (2000). Relative sparing of calretinin containing neurons in the substantia nigra of 6-OHDA treated rat parkinsonian model. *Brain research* 855, 162-165.

Kim, Y.M., Pae, H.O., Park, J.E., Lee, Y.C., Woo, J.M., Kim, N.H., Choi, Y.K., Lee, B.S., Kim, S.R., and Chung, H.T. (2011). Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling* 14, 137-167.

Kimelberg, H.K., and Nedergaard, M. (2010). Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 7, 338-353.

Kirkby, K.A., and Adin, C.A. (2006). Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F563-571.

Klausner, J.D., Freedman, V.H., and Kaplan, G. (1996). Thalidomide as an anti-TNF-alpha inhibitor: implications for clinical use. *Clinical immunology and immunopathology* 81, 219-223.

Kobayashi, K., Imagama, S., Ohgomori, T., Hirano, K., Uchimura, K., Sakamoto, K., Hirakawa, A., Takeuchi, H., Suzumura, A., Ishiguro, N., and Kadomatsu, K. (2013). Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell death & disease* 4, e525.

Koprich, J.B., Reske-Nielsen, C., Mithal, P., and Isacson, O. (2008). Neuroinflammation mediated by IL-1beta increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *Journal of neuroinflammation* 5, 8.

Kortekaas, R., Leenders, K.L., van Oostrom, J.C., Vaalburg, W., Bart, J., Willemsen, A.T., and Hendrikse, N.H. (2005). Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Annals of neurology* 57, 176-179.

Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences* 19, 312-318.

Kropholler, M.A., Boellaard, R., van Berckel, B.N., Schuitemaker, A., Kloet, R.W., Lubberink, M.J., Jonker, C., Scheltens, P., and Lammertsma, A.A. (2007). Evaluation of reference regions for (R)-[(11)C]PK11195 studies in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Journal of cerebral*

blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 27, 1965-1974.

Kuhn, A., Goldstein, D.R., Hodges, A., Strand, A.D., Sengstag, T., Kooperberg, C., Becanovic, K., Pouladi, M.A., Sathasivam, K., Cha, J.H., *et al.* (2007). Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Human molecular genetics* 16, 1845-1861.

Kumar, V., and Chhibber, S. (2011). Thalidomide: an old drug with new action. *Journal of chemotherapy* 23, 326-334.

Lacapere, J.J., and Papadopoulos, V. (2003). Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* 68, 569-585.

Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., and Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39, 151-170.

Leaver, K.R., Reynolds, A., Bodard, S., Guilloteau, D., Chalon, S., and Kassiou, M. (2012). Effects of translocator protein (18 kDa) ligands on microglial activation and neuronal death in the quinolinic-acid-injected rat striatum. *ACS chemical neuroscience* 3, 114-119.

Letiembre, M., Hao, W., Liu, Y., Walter, S., Mihaljevic, I., Rivest, S., Hartmann, T., and Fassbender, K. (2007). Innate immune receptor expression in normal brain aging. *Neuroscience* 146, 248-254.

Lettiero, B., Andersen, A.J., Hunter, A.C., and Moghimi, S.M. (2012). Complement system and the brain: selected pathologies and avenues toward engineering of neurological nanomedicines. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 161, 283-289.

Li, S., Peters, G.A., Ding, K., Zhang, X., Qin, J., and Sen, G.C. (2006). Molecular basis for PKR activation by PACT or dsRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 10005-10010.

Lim, G.P., Yang, F., Chu, T., Chen, P., Beech, W., Teter, B., Tran, T., Ubeda, O., Ashe, K.H., Frautschy, S.A., and Cole, G.M. (2000). Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 5709-5714.

Lim, G.P., Yang, F., Chu, T., Gahtan, E., Ubeda, O., Beech, W., Overmier, J.B., Hsiao-Ashec, K., Frautschy, S.A., and Cole, G.M. (2001). Ibuprofen effects on Alzheimer pathology and open field activity in APPsw transgenic mice. *Neurobiology of aging* 22, 983-991.

Lindberg, C., Chromek, M., Ahrengart, L., Brauner, A., Schultzberg, M., and Garlind, A. (2005). Soluble interleukin-1 receptor type II, IL-18 and caspase-1 in mild cognitive impairment and severe Alzheimer's disease. *Neurochemistry international* 46, 551-557.

Lopes, K.O., Sparks, D.L., and Streit, W.J. (2008). Microglial dystrophy in the aged and Alzheimer's disease brain is associated with ferritin immunoreactivity. *Glia* 56, 1048-1060.

Lu, B., Nakamura, T., Inouye, K., Li, J., Tang, Y., Lundback, P., Valdes-Ferrer, S.I., Olofsson, P.S., Kalb, T., Roth, J., *et al.* (2012). Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* 488, 670-674.

Lyons, A., Downer, E.J., Crotty, S., Nolan, Y.M., Mills, K.H., and Lynch, M.A. (2007). CD200 ligand receptor interaction modulates microglial activation in vivo and in vitro: a role for IL-4. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 8309-8313.

- Maeshima, N., and Fernandez, R.C. (2013). Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 3, 3.
- Magnus, T., Chan, A., Grauer, O., Toyka, K.V., and Gold, R. (2001). Microglial phagocytosis of apoptotic inflammatory T cells leads to down-regulation of microglial immune activation. *Journal of immunology* 167, 5004-5010.
- Maharaj, H., Maharaj, D.S., and Daya, S. (2006). Acetylsalicylic acid and acetaminophen protect against MPP⁺-induced mitochondrial damage and superoxide anion generation. *Life sciences* 78, 2438-2443.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Leach, H., Davies, S.W., and Bates, G.P. (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87, 493-506.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25, 677-686.
- Matsuoka, Y., Okazaki, M., and Kitamura, Y. (1999). Induction of inducible heme oxygenase (HO-1) in the central nervous system: is HO-1 helpful or harmful? *Neurotoxicity research* 1, 113-117.
- Mattner, F., Katsifis, A., Staykova, M., Ballantyne, P., and Willenborg, D.O. (2005). Evaluation of a radiolabelled peripheral benzodiazepine receptor ligand in the central nervous system inflammation of experimental autoimmune encephalomyelitis: a possible probe for imaging multiple sclerosis. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 32, 557-563.
- McEnery, M.W. (1992). The mitochondrial benzodiazepine receptor: evidence for association with the voltage-dependent anion channel (VDAC). *Journal of bioenergetics and biomembranes* 24, 63-69.
- McGeer, P.L., Rogers, J., and McGeer, E.G. (1994). Neuroimmune mechanisms in Alzheimer disease pathogenesis. *Alzheimer disease and associated disorders* 8, 149-158.
- Miklossy, J., Doudet, D.D., Schwab, C., Yu, S., McGeer, E.G., and McGeer, P.L. (2006). Role of ICAM-1 in persisting inflammation in Parkinson disease and MPTP monkeys. *Experimental neurology* 197, 275-283.
- Misonou, H., Morishima-Kawashima, M., and Ihara, Y. (2000). Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid beta-protein (A β) in human neuroblastoma cells. *Biochemistry* 39, 6951-6959.
- Mittelbronn, M., Dietz, K., Schluesener, H.J., and Meyermann, R. (2001). Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta neuropathologica* 101, 249-255.
- Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., Ichinose, H., and Nagatsu, T. (2000). Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *Journal of neural transmission* 107, 335-341.
- Moller, T. (2010). Neuroinflammation in Huntington's disease. *Journal of neural transmission* 117, 1001-1008.
- Monje, M.L., Toda, H., and Palmer, T.D. (2003). Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302, 1760-1765.

- Monroy, A., Lithgow, G.J., and Alavez, S. (2013). Curcumin and neurodegenerative diseases. *BioFactors* 39, 122-132.
- Morel, M., Couturier, J., Lafay-Chebassier, C., Paccalin, M., and Page, G. (2009). PKR, the double stranded RNA-dependent protein kinase as a critical target in Alzheimer's disease. *Journal of cellular and molecular medicine* 13, 1476-1488.
- Moresco, R.M., Lavazza, T., Belloli, S., Lecchi, M., Pezzola, A., Todde, S., Matarrese, M., Carpinelli, A., Turolla, E., Zimarino, V., *et al.* (2008). Quinolinic acid induced neurodegeneration in the striatum: a combined in vivo and in vitro analysis of receptor changes and microglia activation. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 35, 704-715.
- Murphy, J. B. (1926) *J Monogr.-Rockefeller Inst. med. Res.* no. 21.
- Murphy, P.G., Borthwick, L.S., Johnston, R.S., Kuchel, G., and Richardson, P.M. (1999). Nature of the retrograde signal from injured nerves that induces interleukin-6 mRNA in neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 3791-3800.
- Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., and Togari, A. (2000). Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission. Supplementum*, 277-290.
- Nath, K.A., Balla, G., Vercellotti, G.M., Balla, J., Jacob, H.S., Levitt, M.D., and Rosenberg, M.E. (1992). Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *The Journal of clinical investigation* 90, 267-270.
- Nayak, A., Ansar, R., Verma, S.K., Bonifati, D.M., and Kishore, U. (2011). Huntington's Disease: An Immune Perspective. *Neurology research international* 2011, 563784.
- Ng, T.P., Chiam, P.C., Lee, T., Chua, H.C., Lim, L., and Kua, E.H. (2006). Curry consumption and cognitive function in the elderly. *American journal of epidemiology* 164, 898-906.
- Nicholls, D.G. (2004). Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Current molecular medicine* 4, 149-177.
- Niimi, N., Kohyama, K., and Matsumoto, Y. (2013). Minocycline suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing tissue inhibitors of metalloproteinases. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314-1318.
- Nissl, F. (1899) Ueber einige Beziehungen zwischen Nervenzellerkrankungen und gliiSsen Erscheinungen bei verschiedenen Psychosen. *Arch. Psychiat.*, 32: 1-21.
- Noble, W., Garwood, C.J., and Hanger, D.P. (2009). Minocycline as a potential therapeutic agent in neurodegenerative disorders characterised by protein misfolding. *Prion* 3, 78-83.
- O'Banion, M.K. (1999). Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Critical reviews in neurobiology* 13, 45-82.
- Olah, M., Biber, K., Vinet, J., and Boddeke, H.W. (2011). Microglia phenotype diversity. *CNS & neurological disorders drug targets* 10, 108-118.
- Olson, J.K., and Miller, S.D. (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *Journal of immunology* 173, 3916-3924.

Orr, A.L., Li, S., Wang, C.E., Li, H., Wang, J., Rong, J., Xu, X., Mastroberardino, P.G., Greenamyre, J.T., and Li, X.J. (2008). N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 2783-2792.

Orr, S.K., Trepanier, M.O., and Bazinet, R.P. (2013). n-3 Polyunsaturated fatty acids in animal models with neuroinflammation. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 88, 97-103.

Owe-Young, R., Webster, N.L., Mukhtar, M., Pomerantz, R.J., Smythe, G., Walker, D., Armati, P.J., Crowe, S.M., and Brew, B.J. (2008). Kynurenine pathway metabolism in human blood-brain-barrier cells: implications for immune tolerance and neurotoxicity. *Journal of neurochemistry* 105, 1346-1357.

Owen, D.R., Yeo, A.J., Gunn, R.N., Song, K., Wadsworth, G., Lewis, A., Rhodes, C., Pulford, D.J., Bennacef, I., Parker, C.A., *et al.* (2012). An 18-kDa translocator protein (TSPO) polymorphism explains differences in binding affinity of the PET radioligand PBR28. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32, 1-5.

Paganelli, R., Di Iorio, A., Patricelli, L., Ripani, F., Sparvieri, E., Faricelli, R., Iarlori, C., Porreca, E., Di Gioacchino, M., and Abate, G. (2002). Proinflammatory cytokines in sera of elderly patients with dementia: levels in vascular injury are higher than those of mild-moderate Alzheimer's disease patients. *Experimental gerontology* 37, 257-263.

Palazuelos, J., Aguado, T., Pazos, M.R., Julien, B., Carrasco, C., Resel, E., Sagredo, O., Benito, C., Romero, J., Azcoitia, I., *et al.* (2009). Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain : a journal of neurology* 132, 3152-3164.

Pan, R., Qiu, S., Lu, D.X., and Dong, J. (2008). Curcumin improves learning and memory ability and its neuroprotective mechanism in mice. *Chinese medical journal* 121, 832-839.

Pandey, N., Strider, J., Nolan, W.C., Yan, S.X., and Galvin, J.E. (2008). Curcumin inhibits aggregation of alpha-synuclein. *Acta neuropathologica* 115, 479-489.

Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., *et al.* (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333, 1456-1458.

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

Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 14, 223-236; discussion 222.

Parpura, V., Grubisic, V., and Verkhratsky, A. (2011). Ca(2+) sources for the exocytotic release of glutamate from astrocytes. *Biochimica et biophysica acta* 1813, 984-991.

Pasqualetti, P., Bonomini, C., Dal Forno, G., Paulon, L., Sinforiani, E., Marra, C., Zanetti, O., and Rossini, P.M. (2009). A randomized controlled study on effects of ibuprofen on cognitive progression of Alzheimer's disease. *Aging clinical and experimental research* 21, 102-110.

Pavese, N., Gerhard, A., Tai, Y.F., Ho, A.K., Turkheimer, F., Barker, R.A., Brooks, D.J., and Piccini, P. (2006). Microglial activation correlates with severity in Huntington disease: a clinical and PET study. *Neurology* 66, 1638-1643.

- Paxinos, G., Watson, C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates 6th ed, New York, Academic Press, Elsevier.
- Peel, A.L., and Bredesen, D.E. (2003). Activation of the cell stress kinase PKR in Alzheimer's disease and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Neurobiology of disease* 14, 52-62.
- Penke, B., Toth, A.M., Foldi, I., Szucs, M., and Janaky, T. (2012). Intraneuronal beta-amyloid and its interactions with proteins and subcellular organelles. *Electrophoresis* 33, 3608-3616.
- Perry, V.H., Cunningham, C., and Holmes, C. (2007). Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nature reviews. Immunology* 7, 161-167.
- Perry, V.H., and Gordon, S. (1988). Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends in neurosciences* 11, 273-277.
- Peters, A. (2002). Structural changes in the normally aging cerebral cortex of primates. *Progress in brain research* 136, 455-465.
- Phani, S., Loike, J.D., and Przedborski, S. (2012). Neurodegeneration and inflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 18 Suppl 1, S207-209.
- Pintado, C., Revilla, E., Vizuite, M.L., Jimenez, S., Garcia-Cuervo, L., Vitorica, J., Ruano, D., and Castano, A. (2011). Regional difference in inflammatory response to LPS-injection in the brain: role of microglia cell density. *Journal of neuroimmunology* 238, 44-51.
- Pocock, J.M., and Kettenmann, H. (2007). Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends in neurosciences* 30, 527-535.
- Politis, M., Pavese, N., Tai, Y.F., Tabrizi, S.J., Barker, R.A., and Piccini, P. (2008). Hypothalamic involvement in Huntington's disease: an in vivo PET study. *Brain : a journal of neurology* 131, 2860-2869.
- Pringsheim, T., Wiltshire, K., Day, L., Dykeman, J., Steeves, T., and Jette, N. (2012). The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 27, 1083-1091.
- Prinz-Hadad, H., Mizrahi, T., Irony-Tur-Sinai, M., Prigozhina, T.B., Aronin, A., Brenner, T., and Dranitzki-Elhalel, M. (2013). Amelioration of autoimmune neuroinflammation by the fusion molecule Fn14.TRAIL. *Journal of neuroinflammation* 10, 36.
- Pugsley, M.K. (2001). Etanercept. Immunex. *Current opinion in investigational drugs* 2, 1725-1731.
- Qian, L., Flood, P.M., and Hong, J.S. (2010). Neuroinflammation is a key player in Parkinson's disease and a prime target for therapy. *Journal of neural transmission* 117, 971-979.
- Qin, L., Wu, X., Block, M.L., Liu, Y., Breese, G.R., Hong, J.S., Knapp, D.J., and Crews, F.T. (2007). Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55, 453-462.
- Quan, N., and Banks, W.A. (2007). Brain-immune communication pathways. *Brain, behavior, and immunity* 21, 727-735.
- Ransohoff, R.M., and Perry, V.H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual review of immunology* 27, 119-145.

Rappert, A., Bechmann, I., Pivneva, T., Mahlo, J., Biber, K., Nolte, C., Kovac, A.D., Gerard, C., Boddeke, H.W., Nitsch, R., and Kettenmann, H. (2004). CXCR3-dependent microglial recruitment is essential for dendrite loss after brain lesion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 8500-8509.

Reddy, P.H., and Shirendeb, U.P. (2012). Mutant huntingtin, abnormal mitochondrial dynamics, defective axonal transport of mitochondria, and selective synaptic degeneration in Huntington's disease. *Biochimica et biophysica acta* 1822, 101-110.

Reddy, P.H., Tripathi, R., Troung, Q., Tirumala, K., Reddy, T.P., Anekonda, V., Shirendeb, U.P., Calkins, M.J., Reddy, A.P., Mao, P., and Manczak, M. (2012). Abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration as early events in Alzheimer's disease: implications to mitochondria-targeted antioxidant therapeutics. *Biochimica et biophysica acta* 1822, 639-649.

Reiner, A., Dragatsis, I., Zeitlin, S., and Goldowitz, D. (2003). Wild-type huntingtin plays a role in brain development and neuronal survival. *Molecular neurobiology* 28, 259-276.

Reines, S.A., Block, G.A., Morris, J.C., Liu, G., Nessly, M.L., Lines, C.R., Norman, B.A., Baranak, C.C., and Rofecoxib Protocol 091 Study, G. (2004). Rofecoxib: no effect on Alzheimer's disease in a 1-year, randomized, blinded, controlled study. *Neurology* 62, 66-71.

Reitz, C., Brayne, C., and Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature reviews. Neurology* 7, 137-152.

Ren, L., Lubrich, B., Biber, K., and Gebicke-Haerter, P.J. (1999). Differential expression of inflammatory mediators in rat microglia cultured from different brain regions. *Brain research. Molecular brain research* 65, 198-205.

Reynolds, D.S., and Morton, A.J. (1998). Changes in blood-brain barrier permeability following neurotoxic lesions of rat brain can be visualised with trypan blue. *Journal of neuroscience methods* 79, 115-121.

Rogers, J., Kirby, L.C., Hempelman, S.R., Berry, D.L., McGeer, P.L., Kaszniak, A.W., Zalinski, J., Cofield, M., Mansukhani, L., Willson, P., and et al. (1993). Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1609-1611.

Romano, P.R., Garcia-Barrio, M.T., Zhang, X., Wang, Q., Taylor, D.R., Zhang, F., Herring, C., Mathews, M.B., Qin, J., and Hinnebusch, A.G. (1998). Autophosphorylation in the activation loop is required for full kinase activity in vivo of human and yeast eukaryotic initiation factor 2alpha kinases PKR and GCN2. *Molecular and cellular biology* 18, 2282-2297.

Rubio-Perez, J.M., and Morillas-Ruiz, J.M. (2012). A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *TheScientificWorldJournal* 2012, 756357.

Ryu, J.K., Choi, H.B., and McLarnon, J.G. (2005). Peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195 reduces microglial activation and neuronal death in quinolinic acid-injected rat striatum. *Neurobiology of disease* 20, 550-561.

Ryu, J.K., and McLarnon, J.G. (2006). Minocycline or iNOS inhibition block 3-nitrotyrosine increases and blood-brain barrier leakiness in amyloid beta-peptide-injected rat hippocampus. *Experimental neurology* 198, 552-557.

Saelens, X., Kalai, M., and Vandenabeele, P. (2001). Translation inhibition in apoptosis: caspase-dependent PKR activation and eIF2-alpha phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 276, 41620-41628.

Saijo, K., and Glass, C.K. (2011). Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nature reviews. Immunology* 11, 775-787.

Saiki, S., Sato, S., and Hattori, N. (2012). Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: update. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 83, 430-436.

Salminen, A., Ojala, J., Kaarniranta, K., Haapasalo, A., Hiltunen, M., and Soininen, H. (2011). Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. *The European journal of neuroscience* 34, 3-11.

Salminen, A., Ojala, J., Suuronen, T., Kaarniranta, K., and Kauppinen, A. (2008). Amyloid-beta oligomers set fire to inflammasomes and induce Alzheimer's pathology. *Journal of cellular and molecular medicine* 12, 2255-2262.

Sanchez-Guajardo, V., Febbraro, F., Kirik, D., and Romero-Ramos, M. (2010). Microglia acquire distinct activation profiles depending on the degree of alpha-synuclein neuropathology in a rAAV based model of Parkinson's disease. *PloS one* 5, e8784.

Sapp, E., Kegel, K.B., Aronin, N., Hashikawa, T., Uchiyama, Y., Tohyama, K., Bhide, P.G., Vonsattel, J.P., and DiFiglia, M. (2001). Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 60, 161-172.

Scharf, S., Mander, A., Ugoni, A., Vajda, F., and Christophidis, N. (1999). A double-blind, placebo-controlled trial of diclofenac/misoprostol in Alzheimer's disease. *Neurology* 53, 197-201.

Schipper, H.M. (2000). Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration. *Experimental gerontology* 35, 821-830.

Schipper, H.M., Gupta, A., and Szarek, W.A. (2009). Suppression of glial HO-1 activity as a potential neurotherapeutic intervention in AD. *Current Alzheimer research* 6, 424-430.

Schwarcz, R., and Kohler, C. (1983). Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid. *Neuroscience letters* 38, 85-90.

Sheng, W.S., Hu, S., Nettles, A.R., Lokensgard, J.R., Vercellotti, G.M., and Rock, R.B. (2010). Hemin inhibits NO production by IL-1beta-stimulated human astrocytes through induction of heme oxygenase-1 and reduction of p38 MAPK activation. *Journal of neuroinflammation* 7, 51.

Shimizu, S., Simon, R.P., and Graham, S.H. (1997). Dimethylsulfoxide (DMSO) treatment reduces infarction volume after permanent focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience letters* 239, 125-127.

Shirai. Y. (1921) *Jap. med. World*, 1. 14.

Sierra, A., Encinas, J.M., Deudero, J.J., Chancey, J.H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L.S., Tsirka, S.E., and Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell stem cell* 7, 483-495.

Sierra, A., Gottfried-Blackmore, A.C., McEwen, B.S., and Bulloch, K. (2007). Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. *Glia* 55, 412-424.

Simmons, D.A., Casale, M., Alcon, B., Pham, N., Narayan, N., and Lynch, G. (2007). Ferritin accumulation in dystrophic microglia is an early event in the development of Huntington's disease. *Glia* 55, 1074-1084.

Singh, A.K., and Jiang, Y. (2004). How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats? *Toxicology* 201, 197-207.

- Singh, M., and Patel, R.C. (2012). Increased interaction between PACT molecules in response to stress signals is required for PKR activation. *Journal of cellular biochemistry* 113, 2754-2764.
- Singhrao, S.K., Neal, J.W., Morgan, B.P., and Gasque, P. (1999). Increased complement biosynthesis by microglia and complement activation on neurons in Huntington's disease. *Experimental neurology* 159, 362-376.
- Smith, J.A., Das, A., Ray, S.K., and Banik, N.L. (2012). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain research bulletin* 87, 10-20.
- Sodhi, K., Inoue, K., Gotlinger, K.H., Canestraro, M., Vanella, L., Kim, D.H., Manthathi, V.L., Koduru, S.R., Falck, J.R., Schwartzman, M.L., and Abraham, N.G. (2009). Epoxyeicosatrienoic acid agonist rescues the metabolic syndrome phenotype of HO-2-null mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 331, 906-916.
- Soininen, H., West, C., Robbins, J., and Niculescu, L. (2007). Long-term efficacy and safety of celecoxib in Alzheimer's disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 23, 8-21.
- Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences* 32, 638-647.
- Soltys, Z., Orzylowska-Sliwinska, O., Zaremba, M., Orlowski, D., Piechota, M., Fiedorowicz, A., Janeczko, K., and Oderfeld-Nowak, B. (2005). Quantitative morphological study of microglial cells in the ischemic rat brain using principal component analysis. *Journal of neuroscience methods* 146, 50-60.
- Song, W., Zukor, H., Lin, S.H., Liberman, A., Tavitian, A., Mui, J., Vali, H., Fillebeen, C., Pantopoulos, K., Wu, T.D., *et al.* (2012). Unregulated brain iron deposition in transgenic mice over-expressing HMOX1 in the astrocytic compartment. *Journal of neurochemistry* 123, 325-336.
- Stellwagen, D., and Malenka, R.C. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature* 440, 1054-1059.
- Stirling, D.P., Koochesfahani, K.M., Steeves, J.D., and Tetzlaff, W. (2005). Minocycline as a neuroprotective agent. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 11, 308-322.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N., and Ames, B.N. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235, 1043-1046.
- Stommel, E.W., Cohen, J.A., Fadul, C.E., Cogbill, C.H., Graber, D.J., Kingman, L., Mackenzie, T., Channon Smith, J.Y., and Harris, B.T. (2009). Efficacy of thalidomide for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: a phase II open label clinical trial. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* 10, 393-404.
- Streit, W.J., Braak, H., Xue, Q.S., and Bechmann, I. (2009). Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica* 118, 475-485.
- Streit, W.J., Miller, K.R., Lopes, K.O., and Njie, E. (2008). Microglial degeneration in the aging brain- bad news for neurons? *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, 3423-3438.
- Streit, W.J., Sammons, N.W., Kuhns, A.J., and Sparks, D.L. (2004). Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia* 45, 208-212.

Sturrock, R.R. (1987). A morphological study of the neostriatum of aged mice with particular reference to neuroglia. *Journal fur Hirnforschung* 28, 505-515.

Suen, K.C., Yu, M.S., So, K.F., Chang, R.C., and Hugon, J. (2003). Upstream signaling pathways leading to the activation of double-stranded RNA-dependent serine/threonine protein kinase in beta-amyloid peptide neurotoxicity. *The Journal of biological chemistry* 278, 49819-49827.

Suh, H.S., Choi, S., Khattar, P., Choi, N., and Lee, S.C. (2010). Histone deacetylase inhibitors suppress the expression of inflammatory and innate immune response genes in human microglia and astrocytes. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 5, 521-532.

Sun, D., Lye-Barthel, M., Masland, R.H., and Jakobs, T.C. (2010). Structural remodeling of fibrous astrocytes after axonal injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 14008-14019.

Sutter, A.P., Maaser, K., Hopfner, M., Barthel, B., Grabowski, P., Faiss, S., Carayon, P., Zeitz, M., and Scherubl, H. (2002). Specific ligands of the peripheral benzodiazepine receptor induce apoptosis and cell cycle arrest in human esophageal cancer cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 102, 318-327.

Syapin, P.J. (2008). Regulation of haeme oxygenase-1 for treatment of neuroinflammation and brain disorders. *British journal of pharmacology* 155, 623-640.

Tai, Y.F., Pavese, N., Gerhard, A., Tabrizi, S.J., Barker, R.A., Brooks, D.J., and Piccini, P. (2007). Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Brain : a journal of neurology* 130, 1759-1766.

Tanaka, S., Ide, M., Shibutani, T., Ohtaki, H., Numazawa, S., Shioda, S., and Yoshida, T. (2006). Lipopolysaccharide-induced microglial activation induces learning and memory deficits without neuronal cell death in rats. *Journal of neuroscience research* 83, 557-566.

Tang, J.X., Eckenhoff, M.F., and Eckenhoff, R.G. (2011). Anesthetic modulation of neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Current opinion in anaesthesiology* 24, 389-394.

Tansey, M.G., and Goldberg, M.S. (2010). Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiology of disease* 37, 510-518.

Tanzi, R.E. (2013). A brief history of Alzheimer's disease gene discovery. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 33 Suppl 1, S5-13.

Tattersfield, A.S., Croon, R.J., Liu, Y.W., Kells, A.P., Faull, R.L., and Connor, B. (2004). Neurogenesis in the striatum of the quinolinic acid lesion model of Huntington's disease. *Neuroscience* 127, 319-332.

Taupin, V., Gogusev, J., Descamps-Latscha, B., and Zavala, F. (1993). Modulation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor expression in human monocytes by an endogenous anxiogenic benzodiazepine ligand, triakontatetrapeptide: evidence for a role of prostaglandins. *Molecular pharmacology* 43, 64-69.

Teismann, P., and Ferger, B. (2001). Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse* 39, 167-174.

The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. (1999). TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. *Neurology* 53, 457-465.

Thomas, E.A., Coppola, G., Desplats, P.A., Tang, B., Soragni, E., Burnett, R., Gao, F., Fitzgerald, K.M., Borok, J.F., Herman, D., *et al.* (2008). The HDAC inhibitor 4b ameliorates the disease phenotype and transcriptional abnormalities in Huntington's disease transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 15564-15569.

Tobinick, E., Gross, H., Weinberger, A., and Cohen, H. (2006). TNF-alpha modulation for treatment of Alzheimer's disease: a 6-month pilot study. *MedGenMed : Medscape general medicine* 8, 25.

Tobinick, E.L., and Gross, H. (2008). Rapid cognitive improvement in Alzheimer's disease following perispinal etanercept administration. *Journal of neuroinflammation* 5, 2.

Trepanier, C.H., and Milgram, N.W. (2010). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: are NSAIDs and selective COX-2 inhibitors the next line of therapy? *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 21, 1089-1099.

Tweedie, D., Ferguson, R.A., Fishman, K., Frankola, K.A., Van Praag, H., Holloway, H.W., Luo, W., Li, Y., Caracciolo, L., Russo, I., *et al.* (2012). Tumor necrosis factor-alpha synthesis inhibitor 3,6'-dithiothalidomide attenuates markers of inflammation, Alzheimer pathology and behavioral deficits in animal models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation* 9, 106.

Ung, T.L., Cao, C., Lu, J., Ozato, K., and Dever, T.E. (2001). Heterologous dimerization domains functionally substitute for the double-stranded RNA binding domains of the kinase PKR. *The EMBO journal* 20, 3728-3737.

Valente, E.M., Arena, G., Torosantucci, L., and Gelmetti, V. (2012). Molecular pathways in sporadic PD. *Parkinsonism & related disorders* 18 Suppl 1, S71-73.

van Oosten, B.W., Barkhof, F., Truyen, L., Boringa, J.B., Bertelsmann, F.W., von Blomberg, B.M., Woody, J.N., Hartung, H.P., and Polman, C.H. (1996). Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology* 47, 1531-1534.

Varnum, M.M., and Ikezu, T. (2012). The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 60, 251-266.

Venneti, S., Lopresti, B.J., and Wiley, C.A. (2006). The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein 18kDa) in microglia: from pathology to imaging. *Progress in neurobiology* 80, 308-322.

Vezzani, A., Stasi, M.A., Wu, H.Q., Castiglioni, M., Weckermann, B., and Samanin, R. (1989). Studies on the potential neurotoxic and convulsant effects of increased blood levels of quinolinic acid in rats with altered blood-brain barrier permeability. *Experimental neurology* 106, 90-98.

von Horsten, S., Schmitt, I., Nguyen, H.P., Holzmann, C., Schmidt, T., Walther, T., Bader, M., Pabst, R., Kobbe, P., Krotova, J., *et al.* (2003). Transgenic rat model of Huntington's disease. *Human molecular genetics* 12, 617-624.

Walton, N.M., Sutter, B.M., Laywell, E.D., Levkoff, L.H., Kearns, S.M., Marshall, G.P., 2nd, Scheffler, B., and Steindler, D.A. (2006). Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 54, 815-825.

Wang, J., and Dore, S. (2007). Heme oxygenase-1 exacerbates early brain injury after intracerebral haemorrhage. *Brain : a journal of neurology* 130, 1643-1652.

Wirths, O., Multhaup, G., and Bayer, T.A. (2004). A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide--the first step of a fatal cascade. *Journal of neurochemistry* 91, 513-520.

Wong, R.J., Vreman, H.J., Schulz, S., Kalish, F.S., Pierce, N.W., and Stevenson, D.K. (2011). In vitro inhibition of heme oxygenase isoenzymes by metalloporphyrins. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 31 Suppl 1, S35-41.

Wu, L., and Wang, R. (2005). Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacological reviews* 57, 585-630.

Yoshida, T., Biro, P., Cohen, T., Muller, R.M., and Shibahara, S. (1988). Human heme oxygenase cDNA and induction of its mRNA by hemin. *European journal of biochemistry / FEBS* 171, 457-461.

Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.M., Iwata, N., Saido, T.C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53, 337-351.

Zadori, D., Klivenyi, P., Szalardy, L., Fulop, F., Toldi, J., and Vecsei, L. (2012). Mitochondrial disturbances, excitotoxicity, neuroinflammation and kynurenines: novel therapeutic strategies for neurodegenerative disorders. *Journal of the neurological sciences* 322, 187-191.

Zhang, F., Wang, S., Zhang, M., Weng, Z., Li, P., Gan, Y., Zhang, L., Cao, G., Gao, Y., Leak, R.K., *et al.* (2012). Pharmacological induction of heme oxygenase-1 by a triterpenoid protects neurons against ischemic injury. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 43, 1390-1397.

Zhang, X.M., Cai, Y., Xiong, K., Cai, H., Luo, X.G., Feng, J.C., Clough, R.W., Struble, R.G., Patrylo, P.R., and Yan, X.X. (2009). Beta-secretase-1 elevation in transgenic mouse models of Alzheimer's disease is associated with synaptic/axonal pathology and amyloidogenesis: implications for neuritic plaque development. *The European journal of neuroscience* 30, 2271-2283.

Zhang, Y., Metz, L.M., Yong, V.W., Bell, R.B., Yeung, M., Patry, D.G., and Mitchell, J.R. (2008). Pilot study of minocycline in relapsing-remitting multiple sclerosis. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques* 35, 185-191.

Zhao, H., Joseph, J., Fales, H.M., Sokoloski, E.A., Levine, R.L., Vasquez-Vivar, J., and Kalyanaraman, B. (2005). Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 5727-5732.

**Evaluation des effets de molécules à
visée neuroprotectrice dans un modèle *in
vivo* de neuroinflammation chez le rat ;
étude mécanistique et caractérisation du
modèle au cours du temps.**

Résumé

La mise au point de médicaments ciblant la neuroinflammation, une composante importante de la physiopathologie des maladies neurodégénératives, fait l'objet de nombreuses recherches. Dans ce travail de thèse, nous avons étudié les effets de deux molécules potentiellement anti-inflammatoires et neuroprotectrices : l'hémine, un inducteur de l'hème oxygénase 1 (HO-1) et ; le C16, un inhibiteur de la protéine kinase activée par l'ARN (PKR) dans un modèle de neuroinflammation *in vivo* par injection intrastriale d'acide quinolinique (AQ) chez le rat. Nos résultats ont montré que l'induction de la HO-1 produit des effets délétères tandis que l'inhibition de la PKR induit des effets neuroprotecteurs et anti-apoptotiques. Ce travail a par ailleurs permis de décrire l'évolution cinétique de la neuroinflammation sur 90 jours dans le modèle AQ, la capacité du tissu cérébral à se régénérer après la lésion et l'intérêt de ce modèle dans l'étude des effets d'agents neuroprotecteurs administrés au long cours.

Mots clés : Neuroinflammation, Acide quinolinique, HO-1, PKR.

Résumé en anglais

Neuroinflammation is a key part of the physiopathology of neurodegenerative diseases and is an interesting target in their treatment. In this PhD work, we studied the effects of two potentially anti-inflammatory and neuroprotective molecules, hemin and C16, in an *in vivo* rat model of neuroinflammation by intrastriatal injection of quinolinic acid (QA). We showed that heme oxygenase 1 (HO-1) induction by hemin has deleterious effects whereas inhibition of the protein kinase RNA activated (PKR) by C16 treatment induced neuroprotective and anti-inflammatory effects. Concurrently, we evaluated longitudinal evolution of neuroinflammation in our model. Results showed the kinetic of the inflammatory phenomena; the ability of cerebral tissue to recover integrity and the capability of this model to evaluate potential neuroprotective and anti-inflammatory drugs in a long-time study.

Keywords: Neuroinflammation, Quinolinic acid, HO-1, PKR.