



UNIVERSITE DE STRASBOURG

THESE

Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg
Spécialité Neurosciences

Présentée par
Christophe MULLER

Régénération et restauration fonctionnelle après atteinte
cérébrale chez le Rat adulte : une approche préclinique
combinant plusieurs stratégies thérapeutiques.

Soutenue publiquement le 17 septembre 2009

Membres du Jury

Sarah SCHIMCHOWITSCH

Jean-Christophe CASSEL

Frédérique RENE

Cordula NITSCH

Philippe VAN DEN BOSCH DE AGUILAR

Jean-Louis MILLOT

Co-directrice de thèse

Co-directeur de thèse

Rapporteur interne

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Examineur

Remerciements . . .

Mes premiers remerciements vont tout naturellement au docteur Sarah Schimchowitsch, ma co-directrice de thèse, qui au cours des quatre dernières années, m'a encadré, aidé et soutenu. Un simple Merci semblerait bien insuffisant au regard de sa contribution à mon épanouissement, tant sur le plan scientifique que personnel.

Un grand merci au professeur Jean-Christophe Cassel, mon co-directeur de thèse, pour m'avoir fait confiance et soutenu lors de l'attribution de ma bourse de doctorat. Je le remercie également pour son enthousiasme et sa passion pour la recherche, qu'il a su me transmettre.

Je remercie le doyen Christian Kelche, directeur du Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie tout particulièrement le docteur Frédérique René, le professeur Cordula Nitsch, le professeur Jean-Louis Millot et le professeur Philippe van den Bosch de Aguilar, pour m'avoir fait l'honneur d'étudier et de juger mon travail. Je vous adresse mes plus sincères remerciements, et je vous prie d'accepter le témoignage de mon plus grand respect.

Un grand merci au professeur Edith Dellacherie, au docteur Michelle Léonard et au docteur Alain Durand pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe du Laboratoire de Physique Chimie Macromoléculaire de Nancy. Je remercie tout particulièrement le docteur Frédéric Vallée pour m'avoir initié aux joies de la chimie des polymères, pour m'avoir (un peu) réconcilié avec la chimie organique et pour son humour décapant.

Merci au professeur Denis Baritault et à la société OTR3 pour nous avoir fournis les agents de régénérations (RGTA).

Un énorme merci à Brigitte Cosquer et à Karin Geiger pour toute leur aide technique, toujours réalisée dans la bonne humeur. Merci pour tout.

Un grand Merci aux docteurs Rodrigue Galani, Alexandra Barbelivien et Monique Majchrzak pour leurs conseils scientifiques.

Je remercie Olivier Bildstein, Daniel Egesi et George Edomwonyi pour avoir pris soins de ceux sans qui vraiment rien n'aurait été possible : mes rats . . . parfois, il faut le dire, un peu ingrats . . .

Merci aux étudiants qui ont pu m'aider aux cours de certaines expériences : Robert Lim, Loïc Groh, Philippe Froelich, Christelle Meyer et Michaël Loureiro.

Un grand merci à Catherine pour toute sa bienveillance et son aide administrative et.

Je tiens à remercier particulièrement Sami et Pierre-Henri, mes deux compères, pour tous ces bons moments passés en leur compagnie, dont beaucoup resteront inoubliables.

Merci à Hayat, Marc-Antoine, Joëlle, Julie, Lucas, Michel, Sarah P, Elodie, Nicolas, Julien, Anne, Chantal, Virginia, Élise L, Philippe O, Bernadette, Élise O, Olivier, Hélène, Bruno, Christine, Patrick, Pour ainsi que tous les membres de l'équipe précédemment cités, pour leur bonne humeur et leur sympathie qui ont rempli ces quelques années passées de bons souvenirs.

Merci à Alexandre C, Aurélie, Aurore, Delphine, Domitille, Élise G, Étienne, Fanny, Frédéric G, Jenny, Laura, Malika et Matei, la joyeuse petite troupe théâtre pour toutes ces émotions partagées à la scène comme à la ville, en France comme en Estonie.

Je remercie également Cécile, Hervé, Sanda, Myrnat, El Schizo et Sandra pour leurs amitiés sincères qui ont su résister au temps et à la distance.

Je remercie ma famille, et plus particulièrement mes parents qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de ces années.

Et enfin, je remercie Anne-Sophie, qui m'a supporté, dans tous les sens du terme, chaque jour de ces années de thèse. . .

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
CONTEXTE SCIENTIFIQUE	5
I) EFFETS D'UNE LESION DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL	5
A) STRESS EXCITOTOXIQUE, OXYDATIF ET INFLAMMATOIRE	5
1) Déséquilibre ionique et excitotoxicité	5
2) La production de radicaux libres	6
3) Inflammation	8
B) REPONSE GLIALE ET ENVIRONNEMENT PERILESIONNEL	12
1) La réponse gliale	12
2) Environnement perilesionnel	14
Conclusion :	25
II) STRATEGIES DE RESTAURATION.....	27
A) LA SURVIE NEURONALE	27
B) RADICAUX LIBRES.....	28
C) DIMINUTION DE LA REACTION INFLAMMATOIRE POST-LESIONNELLE	31
D) STIMULATION DE LA PLASTICITE NEURONALE POST-LESIONNELLE	33
1) Blocage des molécules inhibitrices	33
2) Apport et protection des molécules stimulantes.....	41
E) BIOMATERIAUX EN TANT QUE PONTS DE REGENERATION	48
1) Les hydrogels d'origine synthétique	48
2) Les hydrogels d'origine biologique	50
III) SYSTEME SEPTO-HIPPOCAMPIQUE : MODELE DE LESION.....	55
A) LE SEPTUM	55
B) L'HIPPOCAMPE	57
C) LES PROJECTIONS SEPTO-HIPPOCAMPIQUES.....	59
D) AUTRES VOIES D'AFFERENCES ET EFFERENCES DU SEPTUM ET DE L'HIPPOCAMPE DORSAL.....	60
E) REPERCUSSION D'UNE LESION DES VOIES SEPTO-HIPPOCAMPIQUES DORSALES	62
1) Répercussions anatomiques	62
2) Répercussions fonctionnelles.....	63
MATERIELS ET METHODES	68

I) ANIMAUX.....	66
II) CONDITIONS D'ELEVAGE.....	66
A) ELEVAGE EN MILIEU STANDARD	67
B) ELEVAGE EN MILIEU ENRICHIS (EE)	67
III) OPERATION CHIRURGICALE ET TRAITEMENTS	68
A) PREPARATION DE L'ANIMAL ET ANESTHESIE.....	68
B) LESION PAR ASPIRATION DES VOIES SEPTO-HIPPOCAMPIQUES	68
C) SYNTHESSES, PREPARATION ET IMPLANTATION DES HYDROGELS D'ALGINATE	69
1) Préparation des biomatériaux	70
D) ADMINISTRATION DE RGTAS	73
E) ADMINISTRATION D'AMINOGLUCANES ET PUTRESCINE (TRAITEMENT A L'AGP)	73
IV) TESTS COMPORTEMENTAUX.....	73
A) ACTIVITE LOCOMOTRICE EN CAGE FAMILIERE	73
B) TEST DU FRANCHISSEMENT DE LA BARRE	74
1) Dispositif expérimental	74
2) Protocole.....	75
C) PISCINE DE MORRIS	75
1) Dispositif expérimental	76
2) Protocole.....	77
D) LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE.....	78
1) Dispositif expérimental	78
2) Protocole.....	79
E) LABYRINTHE EN T	80
F) CONDITIONNEMENT DE PEUR AU CONTEXTE	81
1) Dispositif expérimental	81
2) Protocole.....	82
V) DOSAGE DE LA CORTICOSTERONE PLASMATIQUE	83
A) PRELEVEMENTS D'ECHANTILLON SANGUIN	83
B) DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE.....	83
C) PROTOCOLE.....	84

VI) TECHNIQUES HISTOLOGIQUES ET IMMUNOCYTOCHIMIQUES.....	85
A) FIXATION DES TISSUS PAR PERFUSION	85
B) PREPARATION DES TISSUS SANS PERFUSION.....	86
C) COLORATION AU VIOLET DE CRESYL	86
D) REVELATION HISTOCHIMIQUE DE L'ACTIVITE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE (ACHE).....	87
1) Evaluation de la densité optique du produit de la révélation histochimique de l'AcHe	87
E) MARQUAGES IMMUNOHISTOCHIMIQUES.....	87
1) Comptage des neurones dans le complexe SM/vDB.....	89
VII) ANALYSES STATISTIQUES	89
RESULTATS.....	91
PARTIE I: RECUPERATION FONCTIONNELLE ET STRUCTURALE APRES TRAITEMENT COMBINE D'AMINO GUANIDINE ET DE PUTRESCINE.....	91
I) ANALYSE COMPORTEMENTALE.....	91
A) ATTENUATION DE L'HYPERACTIVITE LOCOMOTRICE APRES TRAITEMENT A L'AGP	91
B) ATTENUATION DES DEFICITS SENSORIMOTEURS APRES TRAITEMENT A L'AGP.....	92
C) AMELIORATION PARTIELLE DES PERFORMANCES DES RATS LESES DANS LA PISCINE DE MORRIS APRES TRAITEMENT A L'AGP	93
1) Distances parcourues.....	93
2) Latence d'accès à la plate-forme.	95
3) Thigmotaxie	95
4) Test de rétention.....	96
II) ANALYSE MORPHOLOGIQUE.....	98
A) AIRE LESIONNELLE	98
B) EFFETS BENEFIQUES DU TRAITEMENT A L'AGP SUR LES NEURONES CHOLINERGIQUES DU SEPTUM MEDIAN..	99
C) AUGMENTATION DU NOMBRE DE FIBRES CHOLINERGIQUES DANS L'HIPPOCAMPE DORSAL DESAFFERENTE...	100
D) DIMINUTION DU BOURGEONNEMENT SYMPATHIQUE DANS L'HIPPOCAMPE DORSAL DESAFFERENTE.....	101

PARTIE II: RECUPERATION FONCTIONNELLE ET STRUCTURALE APRES IMPLANTATION D'UN HYDROGEL D'ALGINATE, EN ASSOCIATION AVEC LE TRAITEMENT COMBINE D'AMINOGUANIDINE ET DE PUTRESCINE..... 103

I) ANALYSE COMPORTEMENTALE..... 105

A) ACTIVITE LOCOMOTRICE	105
B) EVOLUTION PONDERALE	107
C) COORDINATION SENSORIMOTRICE	108
D) TEST DE MEMOIRE SPATIALE	109
1) Distances parcourues.....	110
2) Latence d'accès à la plate-forme	111
3) Temps passé dans la zone de thigmotaxie.....	112
4) Test de rétention.....	113
E) TEST D'ANXIETE : LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE	115

II) ANALYSE MORPHOLOGIQUE..... 117

A) TAILLE DE LA CAVITE LESIONNELLE	117
B) ACTIVITE CHOLINERGIQUE DANS L'HIPPOCAMPE	118
C) COLONISATION CELLULAIRE DE L'HYDROGEL	119

PARTIE III: RECUPERATION FONCTIONNELLE ET STRUCTURALE APRES TRAITEMENT COMBINE D'AGP, DE MATRIGEL ET DE FACTEURS DE REGENERATION (RGTAS), EN FONCTION DES CONDITIONS D'ELEVAGE EN ENVIRONNEMENT STANDARD OU ENRICHIS. 122

I) ANALYSE COMPORTEMENTALE..... 123

A) MESURE DE L'ACTIVITE LOCOMOTRICE	123
B) L'EVOLUTION PONDERALE	125
C) COORDINATION SENSORIMOTRICE	125
D) EVALUATION DU NIVEAU D'ANXIETE	126
E) TEST DE MEMOIRE SPATIALE	130
1) Distances parcourues.....	130
2) Latence d'accès à la plate-forme	131
3) Thigmotaxie	133
4) Test de rétention.....	134

F) LABYRINTHE EN T: TEST D'ALTERNANCE SPONTANEE	137
G) CONDITIONNEMENT DE PEUR.....	139
H) DOSAGE DE LA CORTICOSTERONE	140

II) ANALYSE MORPHOLOGIQUE 142

A) TAILLE DE LA CAVITE LESIONNELLE	142
B) ACTIVITE CHOLINERGIQUE DANS L'HIPPOCAMPE DORSAL.....	142
C) INTERACTION MATRIGEL TISSU HOTE	147

DISCUSSION GENERALE 149

CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... 165

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 171

Introduction générale

Mon travail de thèse porte sur la mise au point, l'utilisation et le développement de traitements susceptibles de promouvoir la régénération et la restauration fonctionnelle dans le Système Nerveux Central (SNC) de mammifère adulte à la suite d'une lésion.

Chez l'Homme, les lésions du SNC peuvent avoir des conséquences dramatiques, provoquant des handicaps divers, tels que, sur le plan moteur, des hémi-, para- ou tétraplégies selon la zone d'atteinte, ou, sur d'autres plans, des déficits comportementaux et des troubles cognitifs marqués pouvant aller jusqu'à une perte totale d'autonomie. Invasives ou violentes, les causes de telles atteintes sont multiples et majoritairement attribuées à des accidents de la circulation routière (48,3%) ou des chutes (41,8%), mais également à des accidents de travail ou de sport, des accidents domestiques, des actes chirurgicaux ou encore des agressions. On dénombre actuellement en France 155 000 victimes d'une atteinte cérébrale, auxquelles se rajoutent, chaque année, 10 000 nouveaux cas de lésion grave (Source: IRME).

La recherche de nouvelles voies thérapeutiques est aujourd'hui en plein essor. Des avancées encourageantes ont été obtenues, ces dernières années, à partir de différents modèles de lésion médullaire. Cependant, très peu de travaux concernent l'univers beaucoup plus complexe du cerveau endommagé et de sa réparation, ce qui est problématique puisque pour un nouveau cas de lésion médullaire en France, on compte dix nouveaux cas de lésion cérébrale. Compte tenu des conséquences sur la qualité de vie des victimes (perte d'autonomie, augmentation du risque de développement de pathologies secondaires...) et des coûts pour la société (nécessité de soins palliatifs quotidiens...), la recherche de stratégies thérapeutiques efficaces est indispensable.

Jusqu'aux années 1970, les espoirs de pouvoir réparer le cerveau endommagé se heurtaient à un dogme, bien établi par Santiago Ramon Y Cajal (1928), stipulant que "*dans le cerveau adulte, les voies nerveuses étaient fixées et immuables : tout pouvait mourir, rien ne pouvait régénérer*". Pourtant, ce chercheur fut le premier à démontrer que l'absence de régénération, loin d'être due à une propriété intrinsèque des neurones centraux, s'expliquait plutôt par la présence de facteurs inhibiteurs et/ou l'absence de facteurs stimulants dans l'environnement de la lésion. En 1980, Albert Aguayo et ses collaborateurs purent confirmer, à l'aide de techniques de traçage, que plusieurs populations neuronales du SNC étaient, après lésion,

capables de développer de nouveaux axones à condition de leur fournir un environnement permissif, tel qu'un greffon de nerf périphérique (Richardson et coll., 1980; David et Aguayo, 1981; David et Aguayo, 1985; So et Aguayo, 1985). En 2002, Martin Schwab et ses collaborateurs ont confirmé l'existence d'une poussée régénérative axonale suite à une lésion de la moelle épinière. Les mécanismes en jeu, soutenus dans le système nerveux périphérique (SNP) où ils aboutissent à la restauration des voies nerveuses, ne sont cependant que transitoires dans le SNC, où divers obstacles majeurs s'opposent aux processus de régénération.

Ainsi, l'ischémie locale induite par la lésion entraîne, par les cellules microgliales activées dans la zone endommagée, une libération massive de glutamate, et la production de radicaux libres oxygénés (ROS) et de peroxy-nitrates. Ces composés provoquent la mort des cellules nerveuses avoisinantes, aboutissant ainsi à la formation d'une cavité lésionnelle. Celle-ci sera au moins partiellement comblée par une réaction cicatricelle issue des astrocytes réactifs, qui va constituer une barrière infranchissable pour tout neurite en voie d'élongation.

Certaines des molécules de la cicatrice gliale et d'autres molécules présentes dans la myéline vont inhiber la croissance axonale (McKerracher et coll., 1994; Mukhopadhyay et coll., 1994; GrandPre et coll., 2000; Prinjha et coll., 2000; Chen et coll., 2000; Wang et coll., 2002a; Wang et coll., 2002b). *In fine*, toutes ces molécules activent la voie de signalisation intracellulaire d'une petite GTPase, la RhoA (Niederost et coll., 2002; Fournier et coll., 2003), impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine. L'activation de cette voie conduit le cône de croissance axonal au collapsus.

Ces mécanismes inhibiteurs, présents aussi bien dans la moelle épinière que dans le cerveau, n'ont été élucidés que récemment. Ils représentent aujourd'hui des cibles privilégiées dans la recherche de nouvelles voies thérapeutiques favorisant la régénération.

Mon travail de thèse s'inscrit dans ce cadre. Il a pour but de mettre au point et d'étudier les effets de nouveaux traitements, testés d'abord individuellement, puis en combinaison, en vue de contrer les différents obstacles s'opposant à la régénération neuronale au sein du cerveau adulte.

Nous avons choisi de bloquer la voie de signalisation de la protéine Rho à l'aide d'une polyamine, la Putrescine (P), molécule dont l'expression augmente dans le système nerveux après lésion, et dont on sait qu'elle soutient les processus de

régénération dans le SNP. Possédant un spectre d'action très large, les polyamines s'opposent également à la formation de radicaux libres et à la peroxydation des lipides (Ohmori et coll., 1988), ainsi qu'à la perturbation de la concentration du calcium intracellulaire (Jensen et coll., 1987). Elles sont aussi capables de moduler les récepteurs NMDA du glutamate (Williams, 1997) et de stimuler la synthèse de facteurs neurotrophiques (Gilad et Gilad, 1999). Cependant leur dégradation *in vivo* entraîne la formation de dérivés toxiques. Nous avons ainsi associé à la Putrescine un inhibiteur de ses enzymes de dégradation, l'Aminoguanidine (A), composé également susceptible de limiter les processus de dégénérescence secondaire en inhibant la synthèse inductible du monoxyde d'azote (iNOS). Ce traitement combiné, utilisé pour la première fois dans un modèle de SNP (Gilad et coll., 1996) n'avait encore jamais été testé dans le cadre d'une lésion du SNC.

Pour combler la cavité lésionnelle d'une matrice permissive et biocompatible, nous avons collaboré avec le laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM) de Nancy pour développer des biomatériaux rhéofluidifiants (devenant liquide sous contrainte mécanique) et thixotropes (retrouvant au repos leur consistance de gel). Nous avons ainsi pu implanter, par injection intracavitaire, des hydrogels d'alginate modifiés (Vallee et coll., 2009) présentant une très bonne biocompatibilité et des propriétés physiques leur permettant notamment d'épouser parfaitement les parois de la cavité lésionnelle. Nous avons également testé une autre matrice protéique injectable, utilisée en culture cellulaire, présentant la propriété d'être liquide à 4°C et solide au dessus de 20°C : le Matrigel (BD Matrigel™).

Enfin nous avons essayé de favoriser au maximum la survie et la croissance des neurones en ciblant l'activation de facteurs neurotrophiques endogènes. Deux traitements ont ainsi été utilisés. Le premier concerne l'élevage des animaux en environnement enrichi (EE), connu pour stimuler la production de facteurs neurotrophiques. Le second, pharmacologique (ReGeneTating Agent, RGTA, produit par OTR3, Paris), est un analogue de l'héparine. Ce composé est sélectif pour les zones endommagées, au niveau desquelles, une fois fixé, il prolonge la durée d'action des facteurs neurotrophiques en limitant notamment leur dégradation (Barritault et Caruelle, 2006).

Nous avons choisi un modèle de lésion par aspiration dans le cerveau de rat

adulte, permettant l'interruption des voies septo-hippocampiques dorsales par création d'une cavité lésionnelle. Ce modèle s'accompagne d'altérations comportementales durables et bien caractérisées au sein de mon laboratoire d'accueil (augmentation de l'activité locomotrice, déficits dans les performances mnésiques, diminution de l'anxiété...). J'ai ainsi pu étudier l'efficacité des traitements susmentionnés non seulement sur le plan structurel par des approches histologiques, mais aussi sur le plan fonctionnel par des approches comportementales.

La partie introductive de ma thèse présentera les données de la littérature concernant les perturbations, à l'échelle cellulaire et moléculaire, induites par une lésion du SNC et bloquant les processus de régénération. J'aborderai ensuite les traitements pharmacologiques ciblés développés actuellement pour essayer de les contrer. Dans cette ligne, je détaillerai les stratégies de traitement sur lesquelles nous avons misé, dont certaines sont novatrices, et présenterai le modèle de lésion utilisé. La deuxième partie de cette thèse détaillera la méthodologie générale utilisée pour la réalisation des expériences, dont les résultats seront présentés dans la troisième partie. Enfin la dernière partie sera consacrée à la discussion générale des résultats obtenus.

Contexte Scientifique

I) Effets d'une lésion dans le Système Nerveux Central

Une lésion du SNC, qu'elle soit d'origine traumatique, chirurgicale ou ischémique, provoque différentes cascades d'évènements cellulaires et subcellulaires. Dans un premier temps, des perturbations métaboliques et ioniques, le déclenchement d'une réaction inflammatoire et la synthèse de radicaux libres conduisent à une mort cellulaire importante au voisinage de la lésion et qui peut s'étendre à d'autres territoires. Plus tardivement, les modifications de l'environnement cellulaire vont tenter de limiter ces processus et une cicatrice gliale va stabiliser la progression de la cavité lésionnelle. Cependant, ces phénomènes vont en même temps s'opposer aux tentatives de régénération neuronale.

A) *Stress excitotoxique, oxydatif et inflammatoire*

1) Déséquilibre ionique et excitotoxicité

Toute lésion du SNC produit une ischémie locale ou plus généralisée, responsable de la chute des apports cellulaires en oxygène, ce qui entraîne l'inhibition de la synthèse mitochondriale d'adénosine triphosphate (ATP). Ce déficit en ATP va se répercuter sur deux mécanismes principaux.

D'une part, environ 70% de l'énergie cérébrale (Edvinsson et Krause, 2002) sert à alimenter une pompe ionique localisée dans la membrane plasmique des neurones, la Na^+/K^+ ATPase, qui maintient les concentrations intracellulaires fortes en potassium et faibles en sodium nécessaires à la propagation du potentiel d'action. En l'absence d'ATP, l'équilibre ionique n'est plus maintenu, la membrane neuronale se dépolarise (Caplan, 2000) et permet, via les canaux Ca^{2+} voltage dépendants, une entrée massive de calcium. Ce calcium activera la libération des neurotransmetteurs dont le principal, dans le SNC, est le glutamate (Fonnum, 1984). Celui-ci active dans un premier temps ses récepteurs ionotropiques α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazole-4-propionate (AMPA) perméables au sodium, entraînant la dépolarisation de la membrane plasmique post-synaptique et l'activation consécutive des récepteurs ionotropiques N-méthyl-D-aspartate (NMDA) perméables au calcium. La concentration calcique augmente ainsi dans le cytoplasme des neurones post-synaptiques et en l'absence d'ATP, ne peut être régulée par la pompe Ca^{2+} ATPase. Ce sont les mitochondries neuronales qui, dans un premier temps, vont essayer de la

neutraliser (Nicholls et Scott, 1980; Friel et Tsien, 1994; Werth et Thayer, 1994; Budd et Nicholls, 1996a; Budd et Nicholls, 1996b; White et Reynolds, 1997; Nicholls et Budd, 2000), jusqu'à ce que l'augmentation de calcium finisse par dépolariser leurs membranes. Il se forme alors un pore de transition de perméabilité (Chalmers et Nicholls, 2003), qui déclenche le collapsus des mitochondries (White et Reynolds, 1996). Après rupture de leur membrane externe et hydrolyse des réserves d'ATP (Gunter, 1994), les mitochondries endommagées libèrent massivement le calcium accumulé (Zoratti et Szabo, 1995; Bernardi et Petronilli, 1996), provoquant ainsi l'activation de l'ensemble des enzymes Ca^{2+} -dépendantes (protéases, lipases, DNases) qui entraînent la nécrose des neurones.

D'autre part, l'inhibition de la synthèse mitochondriale d'ATP influence le métabolisme cellulaire, qui, aérobique en conditions normales, devient anaérobique, produisant *in fine* l'accumulation de lactate et l'acidification des milieux intracellulaires et extracellulaires (Goodman et coll., 1999; Verweij et coll., 2000; Zauner et coll., 2002). Cette acidose est délétère pour le tissu cérébral, potentialisant les dommages orchestrés par les enzymes intracellulaires Ca^{2+} -dépendantes précédemment évoquées, et interférant avec la fonction des canaux ioniques (Siesjo, 1992).

2) La production de radicaux libres

De hauts niveaux intracellulaires de Ca^{2+} , Na^+ , et adénosine di-phosphate (ADP) déclenchent la synthèse mitochondriale de ROS (Reynolds et Hastings, 1995; Urushitani et coll., 2001). Le tissu cérébral est particulièrement vulnérable aux ROS, puisqu'il présente, contrairement aux autres organes, un faible taux d'antioxydants endogènes (Coyle et Puttfarcken, 1993). Une abondance excessive de ROS détruit les macromolécules et participe au mécanisme de signalisation intracellulaire conduisant à la mort cellulaire par apoptose (Halliwell, 1994; Sugawara et Chan, 2003).

L'ischémie induite par la lésion active différentes isoformes de la synthase d'oxyde nitrique : la NOS neuronale (nNOS), la NOS inductible (iNOS) dans les astrocytes et les cellules microgliales, et la NOS endothéliale (eNOS). Les fortes concentrations de monoxyde d'azote (NO) ainsi formées vont interagir avec les ions

superoxydes pour générer des peroxy-nitrates à fort pouvoir oxydant. Les ROS et les peroxy-nitrates activent les métalloprotéases de la matrice extracellulaire, dont nous verrons plus loin les effets délétères, et participent au recrutement de neutrophiles et autres leucocytes présents dans la circulation. Ces deux phénomènes participent à la dégradation des collagènes et des laminines de la lame basale, ce qui nuit à l'intégrité de la paroi des vaisseaux et augmente la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (Crack et Taylor, 2005).

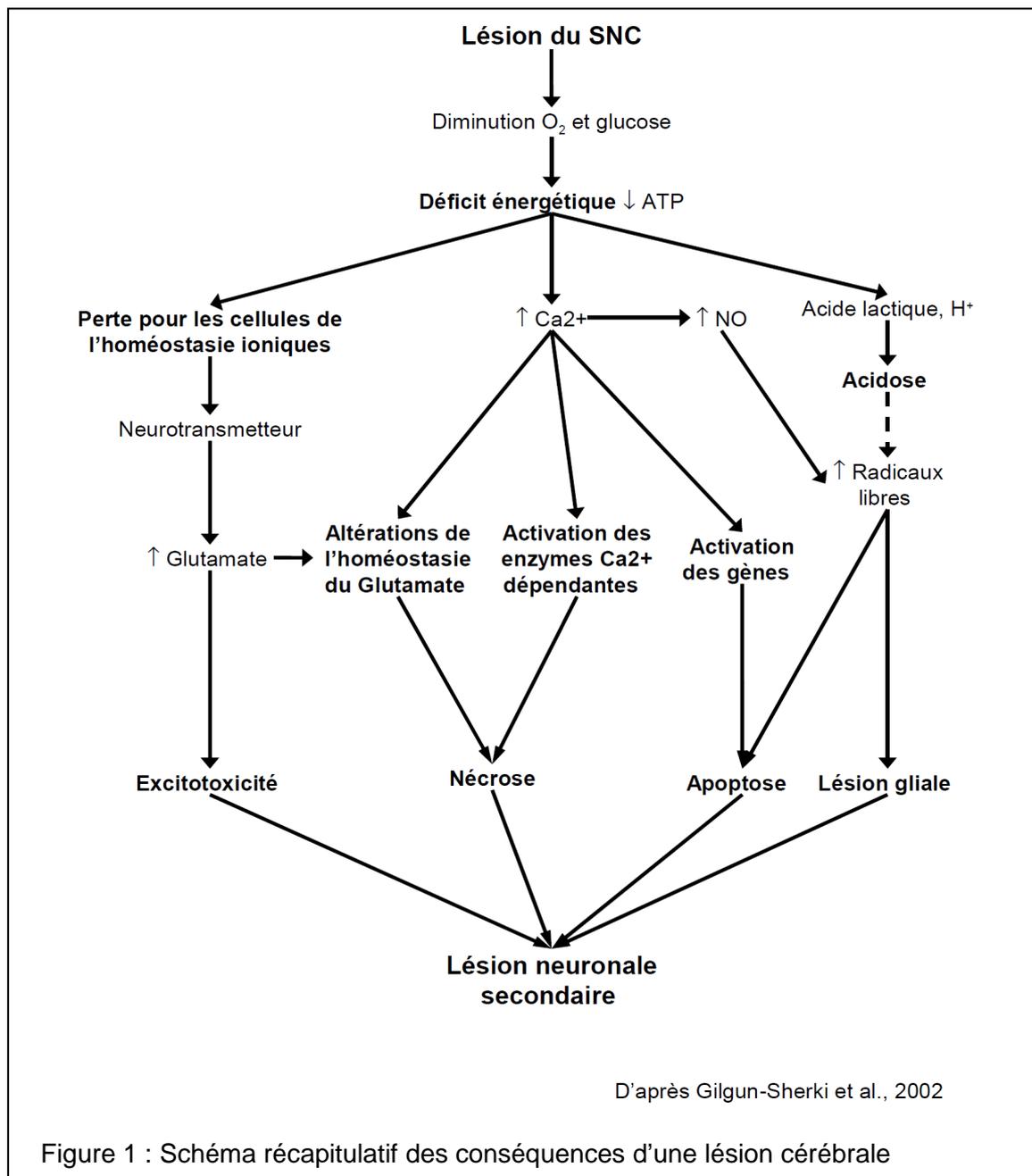


Figure 1 : Schéma récapitulatif des conséquences d'une lésion cérébrale

La production de NO et le stress oxydatif provoquent également la dégradation du beta-nucléotide adénine beta-nicotinamide (NAD⁺), facteur impliqué notamment dans la glycolyse anaérobie et la respiration mitochondriale (Gonzalez, 2006). La perturbation de ces mécanismes conduit à la mort cellulaire, comme décrit dans le paragraphe 1.1.1.

Ainsi, la lésion du SNC provoque une altération de la perfusion sanguine, des défaillances métaboliques et des altérations biochimiques qui conduisent à une mort cellulaire localisée. Le glutamate et l'ATP, libérés massivement, vont alors déclencher une réaction inflammatoire impliquant l'activation des cellules immunitaires du SNC, les cellules microgliales, et le recrutement des cellules immunitaires périphériques.

3) Inflammation

L'inflammation est une réaction stéréotypée du système immunitaire qui se déclenche après une atteinte tissulaire. Dans le SNC, ces processus sont assurés par les cellules microgliales, qui représentent la première ligne de défense contre les atteintes cérébrales, et dont l'intensité de réponse sera proportionnelle à la dégénérescence neuronale (Morioka et coll., 1991; Finsen et coll., 1993; Streit et coll., 1999). Activées au niveau du site de lésion, les cellules microgliales subissent des transformations qui peuvent être observées au cours des premières heures post-lésionnelles. Passant par différents stades (Figure 2), elles formeront la microglie hyperactive et des macrophages cérébraux (Morioka et coll., 1991; Finsen et coll., 1993; Streit et coll., 1999).

La prolifération des cellules microgliales, situées à proximité du site de lésion, est déclenchée par l'ATP et l'ADP libérés lors de la lésion (Bianco et coll., 2006). En réponse à l'activation des récepteurs purinergiques, la microglie va sécréter des facteurs neurotrophiques tels que BDNF et NT-3, qui stimulent en retour sa prolifération en agissant de façon paracrine (Elkabes et coll., 1996). Les cellules microgliales synthétisent également des cytokines stimulant leur division cellulaire, comme les interleukines (IL)-1 β et -4, l'interféron gamma et un agent mitogène, le facteur de stimulation des colonies (Kim et de Vellis, 2005). Elles sécrètent également du TNF- α , capable de modifier localement la matrice extracellulaire (MEC) en inhibant l'expression oligodendrocytaire de ténascine-R, une protéine aux propriétés antiadhésives pour les cellules microgliales (Angelov et coll., 1998). La

migration d'autres cellules microgliales recrutées dans les tissus voisins sera ainsi facilitée, selon un gradient de concentration de facteurs chimiotactiques (Cartier et coll., 2005). Ces facteurs, dits pro-migratoires, appartiennent le plus souvent à la famille des chémokines. Cependant, l'ATP et l'ADP extracellulaires peuvent également intervenir (Honda et coll., 2001), tout comme certains facteurs trophiques tels que le VEGF (Forstreuter et coll., 2002).

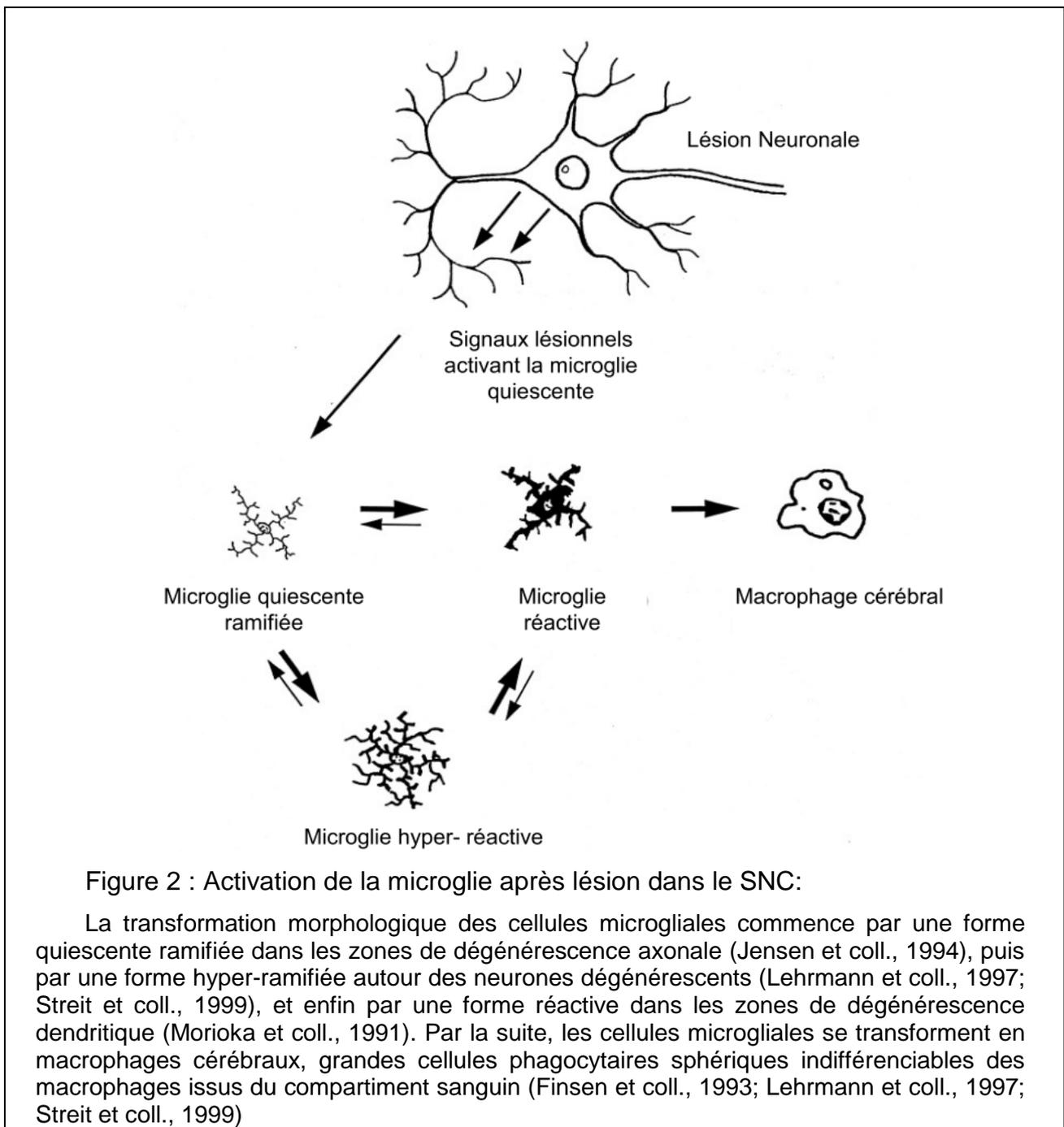
L'activation des récepteurs glutamatergiques AMPA et des récepteurs purinergiques des cellules microgliales va également déclencher une cascade d'évènements intracellulaires permettant l'activation du principal facteur de transcription impliqué dans la réaction immunitaire, le facteur nucléaire kappa B (NF-KappaB) (O'Neill et Kaltschmidt, 1997).

Transloqué dans le noyau, NF-KappaB induit la synthèse et l'activation d'enzymes pro-oxydantes. Les cellules microgliales vont ainsi produire des ROS toxiques via l'enzyme NADPH oxydase (Sankarapandi et coll., 1998; Green et coll., 2001), et du NO via l'iNOS.

L'activation de NF-KappaB induit l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2), une enzyme proinflammatoire qui synthétise la prostaglandine E2, stimule l'expression et la sécrétion de cytokines (notamment le TNF-alpha et les IL-1beta et -6), et favorise l'activation de différentes protéases, en particulier les métalloprotéases (Nelson et coll., 2000)

L'ensemble des facteurs dérivant de l'activation de NF-KappaB va contribuer à la formation d'un œdème, ainsi qu'à la dégradation des jonctions entre les cellules endothéliales, ce qui aboutit à la rupture de la barrière hémato-encéphalique, ou BHE (Pober et Cotran, 1990a; Pober et Cotran, 1990b; Walter et Stella, 2004). Lors de la formation de l'œdème, l'expression des protéines d'adhérence est augmentée, permettant ainsi aux leucocytes d'atteindre le site de lésion et de recruter d'autres types cellulaires tels que macrophages, lymphocytes, plaquettes sanguines et monocytes (Rhodes et coll., 2006). Ces cellules immunitaires périphériques sécrètent des enzymes, qui vont dégrader la matrice extracellulaire et favoriser leur migration : des métalloprotéases, et des héparanases dont la cible d'action concerne les héparanes sulfate protéoglycanes (HSPGs). La dégradation de ces derniers va entraîner la libération de nombreuses molécules de communication cellulaire (cytokines, facteurs de croissance), habituellement piégées par les HSPGs, qui vont

participer à l'amplification de la réaction inflammatoire (pour revue Vaday et Lider, 2000; Bame, 2001).



Délétère pour les cellules au niveau du site de lésion, la réaction inflammatoire est également un point clé dans les processus de dégénérescence secondaire des tissus avoisinants. En effet, en l'absence d'agent pathogène cible, les produits de la réaction chimique entre le NO et les ROS, libérés par les cellules microgliales, vont provoquer une dégénérescence oxydative des tissus aux alentours de la lésion.

D'autre part, divers facteurs libérés par les cellules microgliales vont affecter préférentiellement certains types cellulaires et provoquer leur destruction massive : le TNF-alpha pour les oligodendrocytes (Nakazawa et coll., 2006) et l'IL-1beta pour les cellules neuronales (Touzani et coll., 2002; Allan et coll., 2005). Ces processus seront cependant limités par les astrocytes, plus résistants (Chen et coll., 2001), qui vont essayer de rétablir l'homéostasie aux alentours du site de lésion et stopper, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, la progression de la dégénérescence secondaire par la mise en place d'un tissu cicatriciel (McGraw et coll., 2001).

Toutefois, les cellules microgliales sont elles-mêmes capables d'exercer des effets neuroprotecteurs, en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires. L'IL-10 est ainsi susceptible de réduire la sécrétion de TNF-alpha et d'IL-1beta (Benveniste et coll., 1998; Knobloch et coll., 1999; Morganti-Kossmann et coll., 2001; Kremlev et Palmer, 2005). D'autres cytokines, comme l'IL-6, ont des propriétés ambivalentes, à la fois pro-inflammatoires comme nous l'avons vu précédemment, mais aussi anti-inflammatoires, inhibant notamment la sécrétion de TNF-alpha, stimulant la production d'antagonistes des récepteurs de l'IL-1, et déclenchant la production de facteurs neuroprotecteurs tels que le NGF (Kossmann et coll., 1996). L'IL-6 renforce également les mécanismes de protection contre l'excitotoxicité liée au glutamate (Penkowa et Hidalgo, 2000) et le stress oxydatif, et facilite la revascularisation (Swartz et coll., 2001).

Enfin, un rôle bénéfique de l'inflammation elle-même a été mis en évidence sur les processus de régénération neuronale. Ainsi, la greffe de macrophages cérébraux au niveau d'un site de lésion médullaire chez le Rat a pu favoriser la restauration partielle de la motricité (Rapalino et coll., 1998). De même, dans un modèle de lésion du nerf optique, Yin et coll. ont montré qu'une protéine, l'oncomoduline, sécrétée par les macrophages cérébraux, est capable de potentialiser l'effet neurotrophique de l'AMPC¹ (Yin et coll., 2003; Yin et coll., 2006).

¹ Les effets de l'AMPC seront détaillés dans la partie stratégie de restauration

B) Réponse gliale et environnement périlesionnel

1) La réponse gliale

Les lésions dans le SNC entraînent, comme dans tous les autres organes, la formation d'une cicatrice localisée au niveau du site endommagé. Cette gliose réactionnelle, orchestrée par les astrocytes, serait déclenchée, entre autre, par des cytokines comme le TNF-alpha (Rostworowski et coll., 1997), l'IL-1 (Giulian et Lachman, 1985; Lin et coll., 2006), l'IL-6 (Chiang et coll., 1994), mais aussi par l'adénosine extracellulaire dérivant de l'ATP et l'ADP (Dare et coll., 2007).

L'activation des astrocytes se traduit par leur hypertrophie et l'augmentation de leur activité de synthèse pour différentes protéines telles que protéine gliale fibrillaire acide (GFAP), vimentine et nestine. Elle s'étend bien au delà du site de lésion, dans un périmètre pouvant atteindre jusqu'à 1cm, par exemple, dans le cerveau de rat (McGraw et coll., 2001). Dans cette zone, les astrocytes activés, appelés isomorphiques (Figure 3-C), essaient de rétablir l'homéostasie des tissus par recapture du glutamate, du potassium et l'élimination des radicaux libres (pour revue Liberto et coll., 2004).

Au niveau du site lésionnel, les astrocytes réactifs sont dits anisomorphiques. Ils vont former un réseau dense interdigité appelé astrogliose, qui va envahir l'espace du tissu détruit ou en voie de destruction (Figure 3-B) pour tenter de confiner la réaction inflammatoire et protéger les tissus de la mort cellulaire (Myer et coll., 2006).

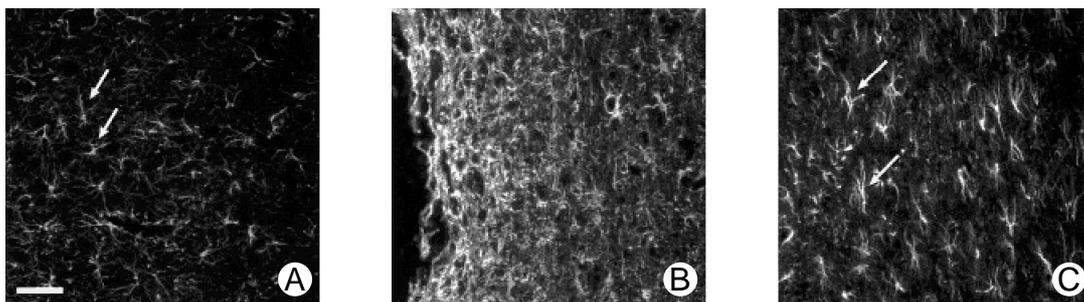


Figure 3: Immunomarquage (McGraw et coll., 2001) des astrocytes par la GFAP sur des coupes de moelle épinière de rat. (A) Animal témoin, (B) astrocytes anisomorphiques au voisinage de la lésion, (C) astrocytes isomorphiques à distance de la cavité lésionnelle. Barre d'échelle=20µm

Entre les mailles, formées par les processus astrocytaires liés par des jonctions étroites et communicantes, vont s'intercaler d'autres types cellulaires comme la

microglie, les cellules immunitaires périphériques et les oligodendrocytes, pour former la cicatrice gliale.

Des cytokines (notamment le TNF-alpha et l'IL-1B), libérées majoritairement par la microglie, mais aussi, bien que dans une moindre mesure, par les astrocytes (Malipiero et coll., 1990), vont exercer des effets contradictoires. Tout en induisant la destruction des oligodendrocytes (Selmaj et Raine, 1988; Vartanian et coll., 1995; Hisahara et coll., 1997; Curatolo et coll., 1997), elles vont également stimuler la prolifération de leurs progéniteurs (Arnett et coll., 2001; Rhodes et coll., 2006).

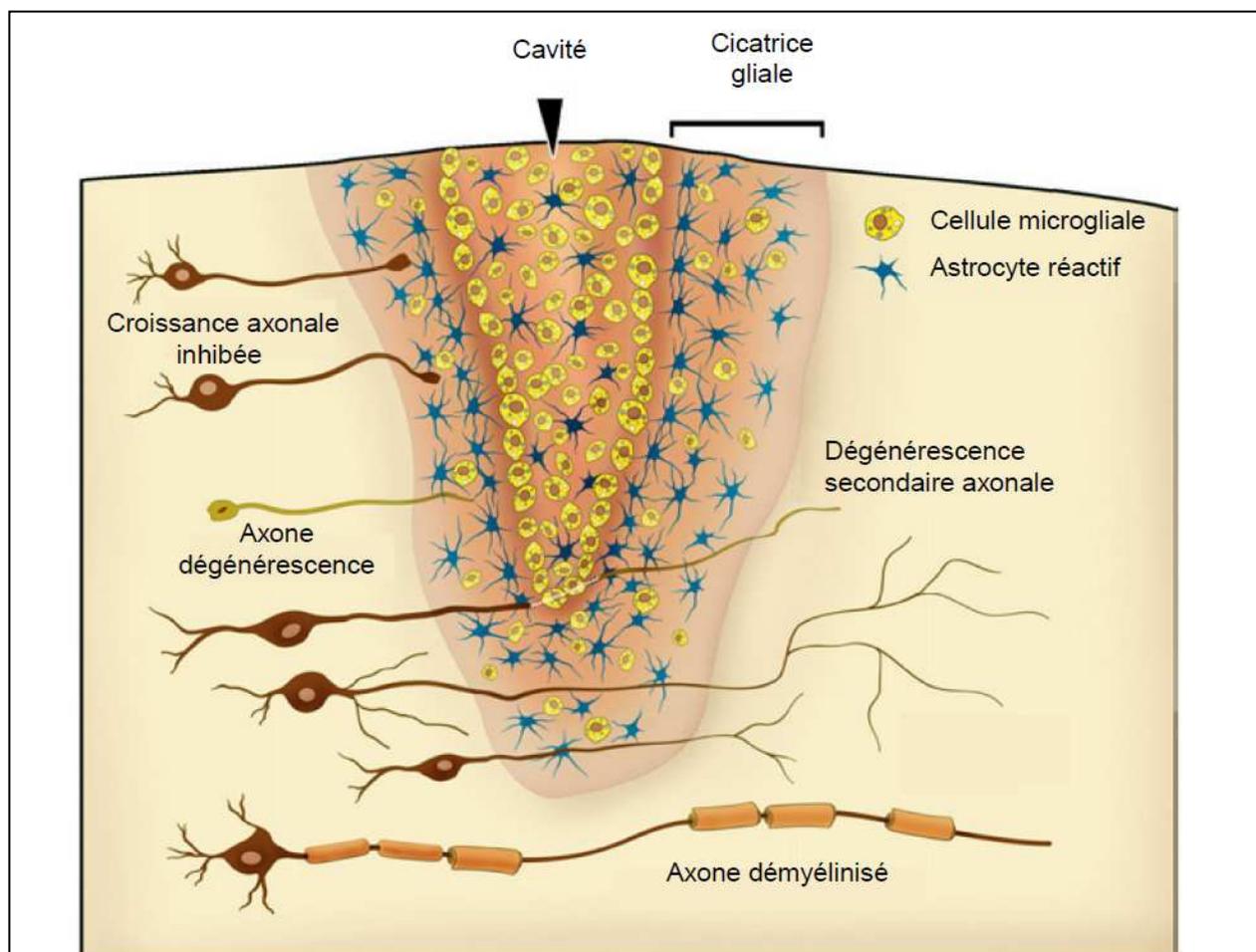


Figure 4 : Représentation schématique de la cicatrice gliale. Les cellules immunitaires envahissent le site de lésion et interagissent avec les cellules microgliales et les astrocytes réactifs pour former la cicatrice gliale. La réponse inflammatoire conduit à la démyélinisation de certains axones et à la dégénérescence secondaire neuronale. (D'après Fitch et Silver 2008)

2) Environnement périlésionnel

Les astrocytes réactifs, les oligodendrocytes et leurs progéniteurs, et certaines cellules du système immunitaire synthétisent ou dispersent des molécules dans l'environnement périlésionnel. Ces molécules vont, à leur manière, s'opposer à la régénération des neurones centraux, soit en induisant des signaux inhibiteurs envers la croissance neuritique, soit en dégradant des molécules favorables à la régénération.

a) Les signaux inhibiteurs de la croissance axonale

(1) Les sémaphorines

Molécules de guidage axonal, les sémaphorines exercent une action répulsive sur les cônes de croissance au cours du développement. Ainsi la sémaphorine-3A (Séma-3A), sécrétée dans l'espace extracellulaire, et la sémaphorine-4D (Séma-4D) exprimée à la surface des oligodendrocytes, empêchent les neurites de s'orienter vers une structure inadéquate (pour revue Hou et coll., 2008). Après lésion dans le SNC adulte, l'expression de ces molécules est à nouveau fortement augmentée : dans les neurones, la cicatrice gliale et les cellules méningées en ce qui concerne la Séma-3A (Fujita et coll., 2001; Zhang et coll., 2001; De Winter et coll., 2002; Beck et coll., 2002) et dans les oligodendrocytes pour la Séma-4D (Moreau-Fauvarque et coll., 2003). Ces molécules vont alors, comme au cours du développement, contribuer à repousser les cônes de croissance, via l'activation de leurs récepteurs spécifiques, à savoir la neuropiline-1 et les plexines (He et Tessier-Lavigne, 1997; Kolodkin et coll., 1997; Pasterkamp et coll., 1998a; Pasterkamp et coll., 1998b; Nakamura et coll., 2000; Fujii et coll., 2002; Moreau-Fauvarque et coll., 2003). Ces dernières vont activer la voie de la protéine Rho (Kruger et coll., 2005), et nous verrons plus loin que cette voie représente un carrefour clé dans les processus bloquant la régénération neuronale.

(2) Les Ténacines

L'expression des ténacines, glycoprotéines de la matrice extracellulaire sécrétées par les oligodendrocytes et les astrocytes et impliquées dans leurs processus d'adhérence, de migration et de prolifération (Pesheva et Probstmeier, 2000; Nishio et coll., 2005), est modulée par le TNF-alpha et divers facteurs de croissance libérés à la suite d'une lésion.

Les isoformes C et R, majoritairement exprimées dans le SNC, peuvent interagir avec des protéoglycanes de la matrice extracellulaire et des récepteurs impliqués dans l'adhérence cellulaire comme les intégrines (Probstmeier et coll., 2000) et sont fortement inhibitrices pour la croissance axonale (Brodkey et coll., 1995; Faissner et Steindler, 1995; Meiners et coll., 1995). Bien que la voie de signalisation impliquée dans cette inhibition ne soit pas encore connue au sein du SNC adulte, des études *in vitro* semblent impliquer également la voie de la protéine Rho (Midwood et Schwarzbauer, 2002).

Une lésion dans le SNC entraîne à la fois une augmentation de l'expression de la ténascine-C (Jung et coll., 1993; Wintergerst et coll., 1993; Probstmeier et Pesheva, 1999; Probstmeier et coll., 2000), qui va participer à la réaction inflammatoire en stimulant la sécrétion d'IL-1beta et de TNF-alpha (Ikeshima-Kataoka et coll., 2008), et une inhibition de celle de la ténascine-R, processus qui facilitera la migration des cellules microgliales vers le site de lésion (Angelov et coll., 1998).

(3) Les chondroïtines sulfates protéoglycanes

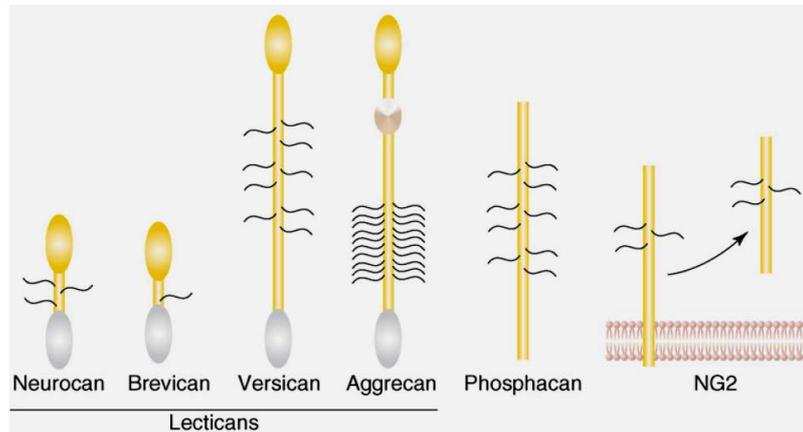
Ces molécules de la matrice extracellulaire sont formées d'un squelette protéique (dont une liste non-exhaustive est donnée en figure 5 (Bandtlow et Zimmermann, 2000), transmembranaire ou relié à la membrane via un groupement GPI, sur lequel sont fixés des chondroïtines sulfates glycosaminoglycanes (CS-GAGs).

Dès 5 heures après lésion cérébrale, les chondroïtines sulfates protéoglycanes (CSPGs) sont surexprimés massivement par les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules méningées (Asher et coll., 2001).

Dans la cicatrice gliale, les CSPGs contribuent au blocage des processus de régénération des fibres nerveuses (Asher et coll., 2001) malgré la présence de molécules favorisant la croissance axonale telles que les laminines (Dou et Levine, 1994; Jain et coll., 2004). Cet effet, direct ou indirect, semble également passer par la voie Rho (Schweigreiter et coll., 2004; Chan et coll., 2007; Friese et coll., 2007; Gopalakrishnan et coll., 2008).

Cet effet inhibiteur semble surtout impliquer les CS-GAGs. En effet, en les décrochant du squelette protéique à l'aide de chondroïtinases ou en empêchant leur sulfatation par du chlorate, il est possible de promouvoir les processus d'élongation

neuritique (Bradbury et coll., 2002). Cependant, certains squelettes protéiques peuvent aussi inhiber directement la croissance axonale, notamment en ce qui concerne le NG2, le phosphacan, le neurocane, et le versicane-2 (Bandtlow et Zimmermann, 2000; Inatani et coll., 2001; Ughrin et coll., 2003).



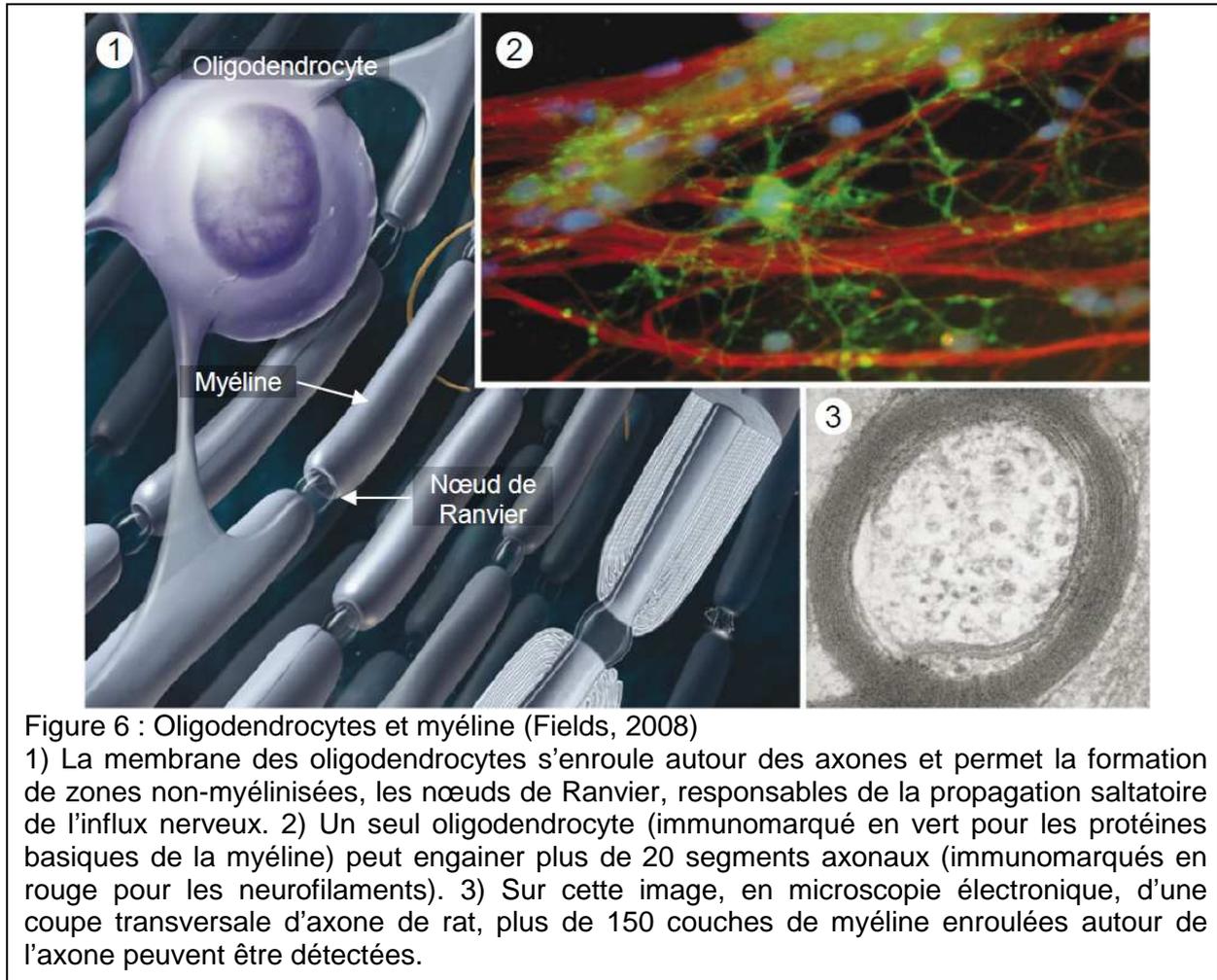
D'après Sherman et Back 2007

Figure 5 : différentes familles des chondroïtines sulfate protéoglycanes

(4) Molécules inhibitrices de la myéline

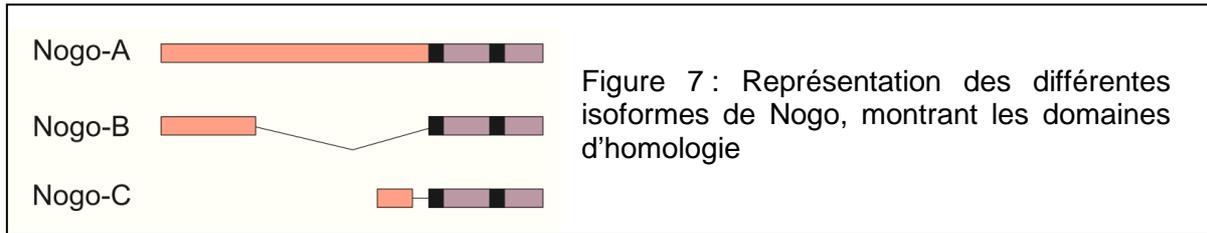
Nous avons pu voir précédemment que divers facteurs libérés après lésion, tels que le glutamate (Matute et coll., 2007), le NO (Boullerne et Benjamins, 2006), le TNF-alpha et l'IL-beta, vont provoquer la mort des oligodendrocytes, entraînant la dégradation des manchons de myéline autour des axones (Figure 6) et la dispersion de leurs fragments dans l'environnement extracellulaire (Tang et coll., 2001).

Depuis le milieu des années 1980, de nombreuses études ont montré que des protéines de la myéline étaient responsables de l'inhibition de la croissance axonale dans le SNC (Schwab et Thoenen, 1985; Schwab et Caroni, 1988; Caroni et Schwab, 1988b). Trois types de molécules ont été découvertes (pour revue Xie et Zheng, 2008) : la famille des Nogo, (GrandPre et coll., 2000; Prinjha et coll., 2000; Chen et coll., 2000), la glycoprotéine associée à la myéline ou MAG (McKerracher et coll., 1994; Mukhopadhyay et coll., 1994) et la glycoprotéine myélinique oligodendrocytaire ou OMgp (Wang et coll., 2002a; Wang et coll., 2002b).



Caroni et Schwab isolèrent, à partir de la myéline de rat, deux variants d'une même protéine, de 35 et 220 kDa (NI-35 et NI-220) respectivement, identifiés en 2000 comme étant deux des trois isoformes d'une protéine nommée Nogo (GrandPre et coll., 2000; Prinjha et coll., 2000; Chen et coll., 2000). L'isoforme la mieux caractérisée est Nogo-A (NI-220), une protéine exprimée dans le SNC par les oligodendrocytes et par de nombreux neurones (Huber et coll., 2002). Cette protéine possède 2 à 3 domaines inhibiteurs (GrandPre et coll., 2000; Chen et coll., 2000; Oertle et coll., 2003). L'un de ces domaines, constitué des 66 acides aminés de la queue C-terminale de Nogo-A, s'est révélé présenter une forte affinité pour un récepteur extracellulaire alors inconnu et baptisé NgR pour Nogo récepteur (Fournier et coll., 2001).

Nogo-B est exprimée dans tout le système nerveux, central et périphérique, où elle est impliquée dans la réorganisation vasculaire (Acevedo et coll., 2004). Nogo-C (NI-35) est exprimée dans le cerveau, et son rôle dans l'inhibition des processus de régénération neuronale est bien établi (Kim et coll., 2003).



La MAG est une protéine transmembranaire de la myéline, présentant un grand fragment extracellulaire contenant cinq domaines immunoglobuline (McKerracher et coll., 1994; Mukhopadhyay et coll., 1994). Elle est exprimée dans tout le SNC par les oligodendrocytes et, à un degré moindre, par les cellules de Schwann dans le SNP (Trapp, 1990). Bien qu'elle stimule la croissance neuronale au cours des stades précoces de développement (embryonnaire à néonatal), elle devient inhibitrice dans le SNC plus mature (McKerracher et coll., 1994; Mukhopadhyay et coll., 1994; Domeniconi et coll., 2002; Hasegawa et coll., 2004). La MAG se lie aux cellules exprimant le NgR et a été largement utilisée pour mimer les effets inhibiteurs de la myéline du SNC sur la croissance neuritique *in vitro* (Filbin, 2003)

L'OMgp, découverte en 2002, est reliée à la membrane oligodendrocytaire par un groupement GPI (Wang et coll., 2002a). Elle est exprimée à proximité des nœuds de Ranvier, où son rôle physiologique serait d'inhiber le bourgeonnement axonal collatéral (Huang et coll., 2005). Bien que liant le NgR comme le Nogo et la MAG (Liu et coll., 2002; Domeniconi et coll., 2002; Wang et coll., 2002a), son rôle dans l'inhibition de la croissance axonale après lésion du SNC n'a été que récemment démontré (Ji et coll., 2008).

Ces différents types de molécules vont se fixer sur le même récepteur : le récepteur NgR. Ne possédant pas de domaine intracellulaire lui permettant d'activer une voie de signalisation, le NgR va s'associer à deux autres corécepteurs.

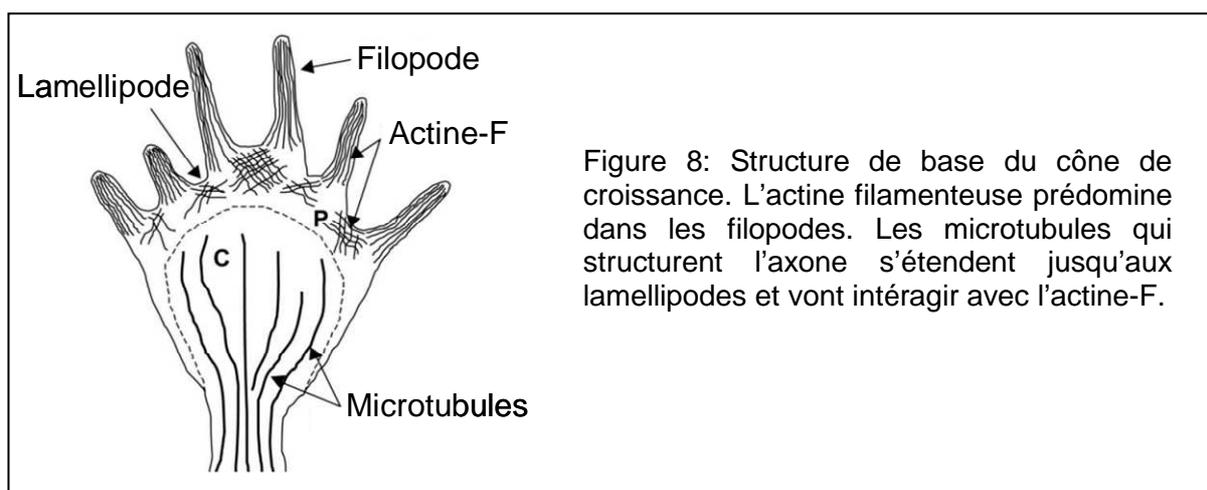
Le premier à être identifié fut le p75^{NTR}, récepteur à basse affinité du NGF, et appartenant à la famille des récepteurs du TNF-alpha (Wang et coll., 2002a; Mi et coll., 2004). Présentant une répartition cérébrale relativement limitée, notamment sur les neurones cholinergiques de la base du cerveau antérieur et les cellules de Purkinje dans le cervelet, il est remplacé dans d'autres types neuronaux par un récepteur de la même famille nommé Taj, Troy ou TNFRSF19 (pour revue voir Mi, 2008).

Le deuxième corécepteur, LINGO-1 (Leuclin rich repeat and Immunoglobulin domain containing Nogo Receptor-interaction protein), découvert par Mi et ses collaborateurs en 2004, est une protéine transmembranaire interagissant avec le NgR, et dont l'expression est augmentée après une lésion dans le SNC (Mi et coll., 2004; Mi et coll., 2008).

Le complexe moléculaire, formé par NgR - LINGO-1 - p75^{NTR} ou Taj, va activer au niveau intracellulaire une voie de signalisation impliquant une petite GTPase, la protéine RhoA (Niederost et coll., 2002; Fournier et coll., 2003).

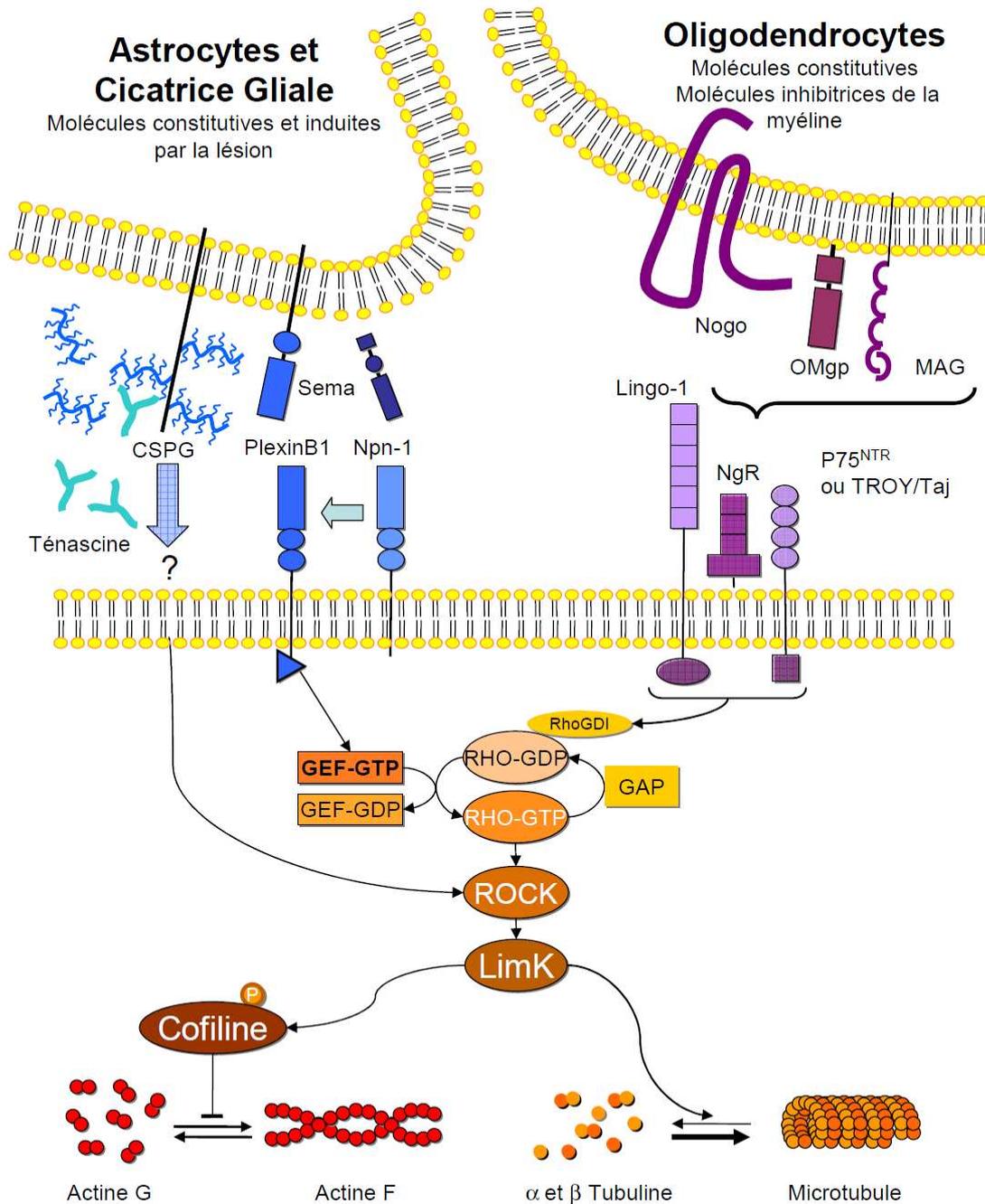
(5) Le point de convergence des signaux inhibiteurs : la voie Rho

La famille des GTPases Rho joue un rôle clé dans la transduction des signaux extracellulaires susceptibles de moduler le cytosquelette d'actine, participant ainsi dans le SNC à la mobilité du cône de croissance, à la migration axonale et à la morphogénèse dendritique (Linseman et Loucks, 2008). Sous le contrôle de signaux attractifs de la matrice extracellulaire, deux membres de la famille, les protéines Rac et Cdc4, vont permettre la formation et l'élongation des cônes de croissance, en régulant l'organisation du cytosquelette d'actine dans les lamellipodes et les filopodes respectivement (figure 8). Sous le contrôle de signaux inhibiteurs, la protéine RhoA, au contraire, va bloquer la dynamique du cytosquelette d'actine, rendant toute élongation du cône de croissance impossible (Gungabissoon et Bamberg, 2003).



Toutes ces petites GTPases sont sous forme inactive et doivent être activées. Ainsi, la phosphorylation de Rho-GDP en Rho-GTP (Quilliam et coll., 1995) va déclencher une cascade d'activation intracellulaire impliquant en premier lieu la Rho

Kinase (ROCK), l'effectrice de Rho (Nakagawa et coll., 1996), qui, à son tour, va activer la Lim Kinase (LIMK). LIMK exerce deux types d'actions sur le cytosquelette, qui vont aboutir au collapsus des cônes de croissance, bloquant ainsi toute tentative de régénération (Davis et coll., 1993; Ng et Luo, 2004): d'une part elle induit, par voie directe, la dépolymérisation des microtubules, et d'autre part elle stoppe la dynamique d'élongation des filaments d'actine par l'intermédiaire de la cofiline (Yamashita et Tohyama, 2003; Hsieh et coll., 2006; Bernard, 2007).



Désorganisation du cytosquelette empêchant de la croissance axonale

Figure 9 : Signalisation de la voie Rho

Rho GTPase est maintenue inactivée par un inhibiteur de dissociation de nucléotide guanine (Rho-GDI) en sa forme liée au GDP : Rho-GDP. L'activation de Rho-GDP est rendue possible par l'intervention de la partie intracellulaire du récepteur p75^{NTR}/Taj activé, qui sépare Rho-GDP de Rho-GDI (Yamashita et Tohyama, 2003). Rho-GDP devient alors activable et peut être phosphorylée par Rho-GEF (Quilliam et coll., 1995). Rho-GTP phosphoryle alors sa kinase effectrice, la Rho Kinase (ROCK) (Nakagawa et coll., 1996), qui, à son tour va phosphoryler Lim Kinase (LIMK). LIMK provoque la dépolymérisation des microtubules en tubuline, et par l'intermédiaire de la cofiline entraîne la polymérisation de l'actine F.

b) Dégradation des molécules favorables à la régénération

Une lésion au sein du SNC va également induire la synthèse et l'activation d'enzymes dégradant des facteurs promoteurs de la croissance axonale.

(1) Actions des métalloprotéases

Les métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMPs), synthétisées par les astrocytes, les cellules microgliales (Cuzner et coll., 1996) et les neurones (Anthony et coll., 1998) contribuent au renouvellement de la MEC (Mott et Werb, 2004) ainsi qu'à la régulation des facteurs de croissance et de l'inflammation (Sternlicht et Werb, 2001; Parks et coll., 2004).

Après lésion dans le SNC, les MMPs sont suractivées par les cytokines pro-inflammatoires, les ROS, et les MMPs déjà activées (Yong et coll., 2001). Elles interviennent alors dans différents processus. Elles participent à la réaction inflammatoire en activant le TNF-alpha (Black et coll., 1997; English et coll., 2000) ou en dégradant la lame basale des vaisseaux sanguins, contribuant ainsi la rupture de la BHE (Nelson et coll., 2000; Rosenberg, 2002).

La MMP-9, sécrétée par les neutrophiles et autres cellules du système immunitaire infiltrées au niveau du site de lésion, bloque la croissance axonale et induit la mort neuronale en dégradant des protéines de la MEC. La déstructuration du collagène de type IV et V, de la fibronectine et de la laminine (Yong et coll., 2001) les empêche d'interagir avec les intégrines, récepteurs de la surface neuronale impliqués dans la survie cellulaire et la croissance des neurites (Manthorpe et coll., 1983; Edgar et coll., 1984; Sakai et coll., 2001).

Les MMPs vont agir sur les oligodendrocytes, en démyélinisant des axones (Anthony et coll., 1998; Newman et coll., 2001; Yong et coll., 2001), contribuant ainsi à la dissémination des molécules inhibitrices de la myéline.

Leur activation est initiée par des cytokines telle que l'IL-1beta (Rosenberg, 2002) et des protéases comme la plasmine ou d'autres démyélinisant des axones (Anthony et coll., 1998; Newman et coll., 2001; Yong et coll., 2001) et contribuant ainsi à la dissémination des molécules inhibitrices de la myéline.

Cependant, les MMPs ont également certains effets bénéfiques sur la survie et la croissance des neurones (pour revue Agrawal et coll., 2008). Elles dégradent des molécules proinflammatoires et notamment comme l'IL-1beta (Ito et coll., 1996),

facilitent les phénomènes de plasticité neuronale (Oh et coll., 1999; Larsen et coll., 2003) et de remyélinisation des axones en dégradant différentes molécules inhibitrices, dont les CSPGs (Zuo et coll., 1998a; Pizzi et Crowe, 2006), le NgR (Walmsley et coll., 2005), la MAG (Milward et coll., 2008) et le récepteur p75^{NTR} (Bronfman, 2007).

(2) Action des héparanases

Après lésion, les héparanases sont libérées par les astrocytes réactifs (Takahashi et coll., 2007) et par différents types cellulaires du système immunitaire tels que les macrophages, les neutrophiles, les mastocytes et les plaquettes sanguines (pour revue Vaday et Lider, 2000 ; Parish, 2006). Ces enzymes dégradent les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPGs), glycoprotéines extracellulaires composées de glycoaminoglycanes à héparane sulfate (HS-GAGS) greffés sur un squelette de protéoglycane (pour revue Bernfield et coll., 1999).

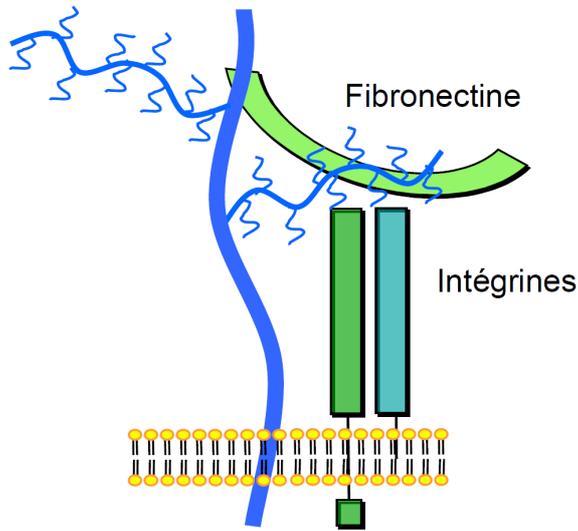
Les HSPGs sont connus pour interagir avec une large gamme de molécules : facteurs de croissance (Bashkin et coll., 1989; Yayon et coll., 1991), protéines diverses, enzymes de dégradation, notamment les métalloprotéases (Koyama et coll., 2008), des inhibiteurs de protéase (Murphy et coll., 2003), et différentes cytokines (Ariel et coll., 1997; Lortat-Jacob et coll., 1997; Muramatsu et Muramatsu, 2008). Ils sont ainsi impliqués dans la modulation de nombreuses fonctions biologiques, participant à l'homéostasie et à la réparation tissulaire (Fears et Woods, 2006; Takahashi et coll., 2007). Quatre rôles majeurs (Figure 10) leurs sont attribués (Bernfield et coll., 1999) comme l'implication dans l'adhésion cellulaire, l'internalisation et la protection de ligands, de façon autocrine et paracrine.

Dégradés par les héparanases à la suite d'une lésion, les HSPGs ne pourront plus assurer leurs rôles. La détérioration de la MEC va alors induire la mise en place d'un tissu cicatriciel (Fears et Woods, 2006; Takahashi et coll., 2007), et l'absence de régulation des phénomènes d'adhérence cellulaire va faciliter l'envahissement du site de lésion par les leucocytes et les neutrophiles du système immunitaire (Giuffrè et coll., 1997; Irony-Tur-Sinai et coll., 2003; Wang et coll., 2003).

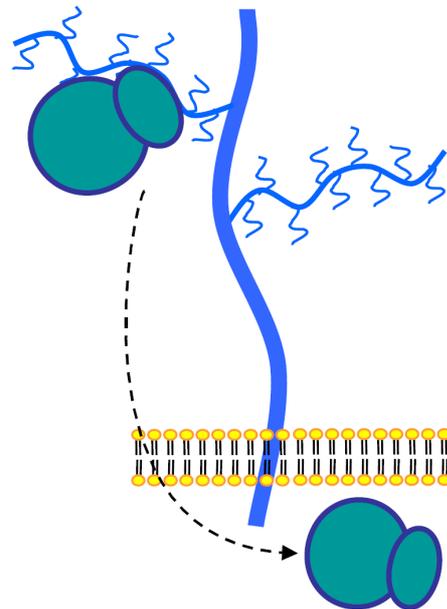
Plus tardivement, au sein de la cicatrice gliale, les HSPGs et les HS-GAGS vont être réexprimés par les astrocytes réactifs dans la cicatrice gliales (Stichel et coll., 1999; Moon et coll., 2002).

1. Adhérence cellulaire

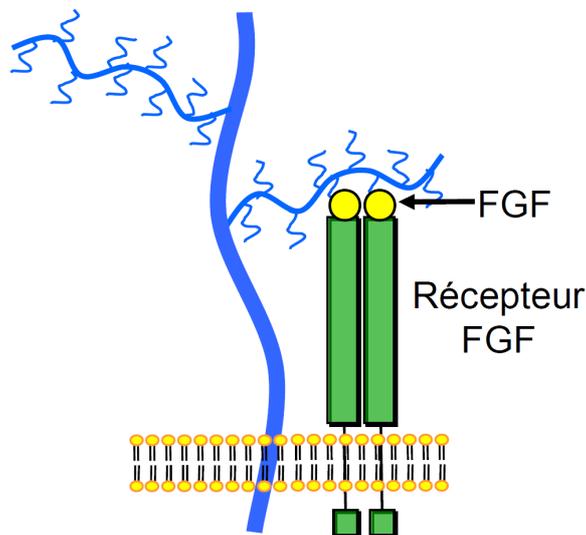
Interaction avec les molécules de la MEC



2. Internalisation des ligands



3. Protection et biodisponibilité de ligands



4. Action paracrine

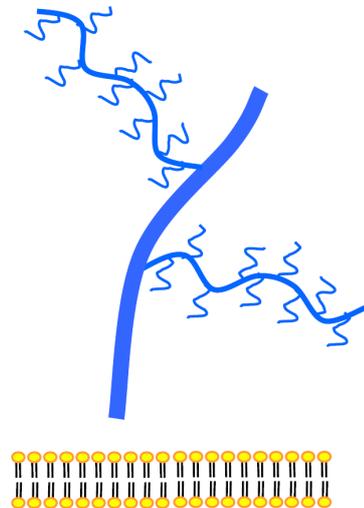


Figure 10 : **Rôles des héparanes sulfate protéoglycane**

1) Les HSPGs immobilisent des ligands insolubles (molécules de la MEC) à proximité de la membrane, favorisant ainsi les interactions entre les protéines impliquées dans les phénomènes d'adhérence cellulaire 2) Les HSPGs sont des récepteurs permettant l'internalisation de ligands solubles (enzymes, lipoprotéines). 3) les HSPGs protègent des molécules solubles (facteurs de croissance et cytokines) de la dégradation et agissent en tant que corécepteurs pour faciliter la transduction du signal. 4) Les HSPGs peuvent être clivés et agir en tant qu'effecteurs solubles.

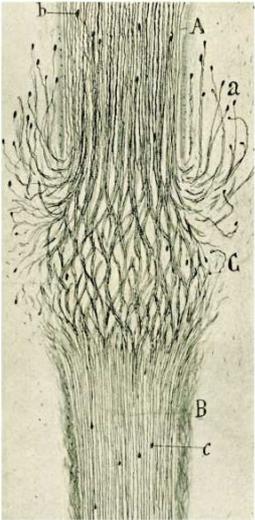
Conclusion :

Dans le SNC de mammifère adulte, des conditions multifactorielles empêchent les processus de régénération. Les stress oxydatif, excitotoxique et inflammatoire, à l'origine de la mort neuronale, les modifications de l'environnement périlésionnel, la réponse gliale et les molécules inhibitrices de la croissance axonale représentent, en particulier, des obstacles majeurs.

Les neurones centraux possèdent pourtant des capacités intrinsèques de régénération.

Après transection ou écrasement, des informations remontent le long de l'axone vers le corps cellulaire, d'abord sous forme de potentiels d'action antidromiques, puis de signaux moléculaires, sous la forme, par exemple des facteurs de transcription synthétisés à proximité du site de lésion (Abe et Cavalli, 2008). Au niveau du soma, ces signaux vont agir sur la dynamique du cytosquelette et activer des facteurs de transcription permettant l'activation de gènes précoces (L1, C-jun, C-fos). Ces derniers stimulent la synthèse de différentes protéines du cytosquelette, ainsi que de la GAP-43 (43kDa Growth Associated Protein), une protéine impliquée dans les mécanismes de plasticité (McKerracher et coll., 1993; Jenkins et coll., 1993; Tetzlaff et coll., 1994; Caroni, 1997; Chaisuksunt et coll., 2000a; Chaisuksunt et coll., 2000b; Mason et coll., 2003; Wintzer et coll., 2004). Ces gènes précoces et ces protéines sont typiquement exprimés dans les neurones en développement (Skene, 1989; Hunt et Mantyh, 2001), mais ne le sont que faiblement dans le SNC adulte, excepté dans les régions cérébrales à fort potentiel de plasticité synaptique (Benowitz et Perrone-Bizzozero, 1991). La surexpression de ces gènes après lésion est suivie par une amorce d'élongation du cône de croissance appelée poussée régénérative (Ramon y Cajal, 1928; Schwab, 2002). Dans le SNC, ces processus permettent aux axones lésés de régénérer et de se reconnecter à leur cible.

Dans le SNC cependant ces processus sont réprimés, à la fois par les faibles taux de cAMP présent dans les neurones adultes et par un environnement fortement défavorable. Les tentatives de régénération avortent ainsi rapidement. Ramon Y Cajal fut le premier à le souligner, à l'aide des travaux de son étudiant Tello.



« (Tello) coupa le nerf optique (A) et lui attacha ... un fragment de nerf sciatique (B). Dans ce cas... on pouvait clairement voir quelques fibres... traverser la cicatrice (C) et s'insinuer dans le greffon ; à l'intérieur du greffon elles évoluèrent sur une longue distance (c)... (Ainsi) l'échec de régénération des voies centrales est ... dû aux conditions de l'environnement neuroglial dans lequel, depuis la période embryonnaire, toute activité stimulant le neurotrophisme ... a définitivement cessé. »

Ramon Y Cajal, 1928

Depuis une trentaine d'années, les tentatives pour vaincre les obstacles et fournir un environnement favorable aux neurones centraux endommagés afin de soutenir leurs processus de régénération ont pris un essor fabuleux, faisant miroiter des perspectives thérapeutiques dont l'enjeu sociétal est majeur.

II) Stratégies de restauration

Différentes voies, ayant pour objectif de pallier les déficits induits par une lésion dans le SNC, sont actuellement explorées. Elles englobent des traitements pharmacologiques divers, des thérapies cellulaires et des greffes, l'ingénierie tissulaire et le développement de biomatériaux, les nanotechnologies, la robotique, des protocoles de réhabilitation...

Chacun de ces domaines étant extrêmement vaste, j'ai choisi de ne développer, dans cette présentation, que les axes stratégiques sur lesquels je me suis appuyé pour construire mes recherches. Je ne présenterai ainsi que les données actuelles portant sur les traitements pharmacologiques et les hydrogels en tant que matrice permissive, implantable dans une cavité lésionnelle.

A) La survie neuronale

Après axotomie, l'interruption de l'activité neuronale et de la suppléance en neurotrophines, transportées habituellement par voie rétrograde depuis les terminaisons jusqu'aux péricaryons, va permettre l'activation d'un agent pro-apoptotiques appartenant à la famille de Bcl et nommé Bad, qui déclenche le cycle de mort cellulaire programmée (Raff, 1992; Jacobson, 1997).

L'activation de Bad va entraîner la dépolarisation des membranes mitochondriales et la libération de cytochrome C dans le cytoplasme, induisant l'activation des caspases 9 et 3, qui sont impliquées dans l'apoptose (pour revue Yuan et coll., 2003)

Néanmoins, ces mécanismes peuvent être contrecarrés par la surexpression de puissants agents anti-apoptotiques appartenant également à la famille de Bcl, Bcl-2 ou Bcl-X_L (Bonfanti et coll., 1996; Cenni et coll., 1996; Blomer et coll., 1998; Parsadanian et coll., 1998; Takahashi et coll., 1999). Ainsi, la transfection virale des gènes de Bcl-2 ou Bcl-X_L ou la stimulation de leur synthèse par l'administration de lithium (Wada et coll., 2005) ont exercé des effets neuroprotecteurs dans des modèles de section du nerf optique, d'ischémie cérébrale et de maladies neurodégénératives (Saavedra et coll., 2000; Rowe et Chuang, 2004; Malik et coll., 2005; Xu et coll., 2006; Bian et coll., 2007).

Des traitements pharmacologiques ont tenté de cibler plus particulièrement les caspases. Ainsi, l'inhibition de l'activité de la caspase 3 par un dérivé peptidique

zDEVD-fmk (z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-fluoromethylketone) après section de la moelle épinière (Citron et coll., 2008) ou traumatisme crânien (Knoblach et coll., 2004); ou celle de la capases 9 par le z-LEHD-fmk (z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-fmk, après lésion traumatique médullaire chez le Rat (Colak et coll., 2005), permet une forte diminution (près de 50%) du nombre de cellules apoptotiques au voisinage de la lésion.

La survie neuronale au sein du SNC peut également être favorisée par un apport en neurotrophines exogènes ou l'augmentation d'AMPC intracellulaire. Ces données seront détaillées dans les paragraphes suivants, abordant également d'autres effets de ces traitements.

B) Radicaux libres

L'administration d'antioxydants, après lésion au sein du SNC, permet de limiter les atteintes nécrotiques en favorisant la survie cellulaire et en réduisant les processus de dégénérescence secondaire.

Les molécules antioxydantes peuvent agir à différents niveaux, sur : l'élimination des anions super oxydes, la capture des ROS ou de leurs précurseurs, l'inhibition de leur formation et/ou la chélation des ions métalliques nécessaires à la catalyse des composés induisant la formation de ces ROS. Elles sont classées en deux types : les enzymes et les antioxydants de faibles poids moléculaires (AFPM). Les enzymes comprennent la Superoxydes Dysmutase (SOD), les catalases, les peroxydases et leurs enzymes de soutien qui ne sont fonctionnelles que sur une courte période (Rokyta et coll., 1996). Les AFPM, quant à eux, peuvent être subdivisés en deux classes selon que leur action est directe (récupérateurs ou casseurs de chaînes) ou indirecte (chélateurs de pro-oxydants). Une liste des principaux composés, de leur cible d'action, et de leurs effets, est donnée dans le tableau 1.

Pour mes travaux de thèse, nous avons sélectionné l'Aminoguanidine (AG), dont les propriétés antioxydantes sont remarquables. Ce composé inhibe en effet l'activité de certaines oxydases (diamine oxydase et sérum amine oxydase), connues pour dégrader l'histamine et les polyamines endogènes (Seiler et coll., 2000) en ROS hautement cytotoxiques et mutagènes pour le cerveau (des peroxydes d'hydrogène, des aminoaldéhydes et du lysomotropique aldehyde 3-animopropanol) (Yu et coll., 2004).

D'autres part, l'AG exerce une autre action antioxydante en inhibant la Nos inductible. En réduisant la libération massive de NO induite par une lésion, l'AG présente des propriétés neuroprotectrices (Griffiths et coll., 1993; Griffiths et coll., 1995; Wolff et Lubeskie, 1995; Iadecola et coll., 1995b; Zhang et coll., 1996; Higuchi et coll., 1998; Viktorov, 2000; Cash et coll., 2001). Néanmoins, certaines données montrent que l'iNOS pourrait réguler positivement des facteurs induisant la neurogénèse dans le gyrus denté chez le Rat adulte (Cheng et coll., 2003b). L'inhibition de l'iNOS par l'AG dans l'hippocampe après un traumatisme crânien pourrait ainsi augmenter les déficits cognitifs induits par la lésion (Sinz et coll., 1999).

Enfin, l'AG semble posséder des propriétés antioxydantes propres. Il a, en effet, été montré *in vitro* que cette molécule est capable de piéger des radicaux libres comme le peroxyde d'hydrogène et les peroxy-nitrates (Yildiz et coll., 1998).

Le traitement par l'AG a été testé dans différents modèles de lésion du SNC, au niveau de la moelle épinière (Chatzipanteli et coll., 2002; Soy et coll., 2004), mais également au niveau cérébral après lésion ischémique (Iadecola et coll., 1995b; Cockroft et coll., 1996), hémorragique (Atan et coll., 2004; Shirhan et coll., 2004a; Shirhan et coll., 2004b), et traumatique (Wada et coll., 1998; Stoffel et coll., 2000; Lu et coll., 2003b; Moochhala et coll., 2004). De nombreux effets protecteurs ont été identifiés sur les plans histopathologique et fonctionnel. Ainsi après lésion traumatique, ce traitement a permis de réduire, de façon dose dépendante, le volume de l'œdème et de la zone de nécrose, avec une importante réduction du nombre de neurones en voie de dégénérer et de cellule apoptotiques, mais sans affecter les autres paramètres physiologiques tels que la température, la pression artérielle, la glycémie, le pH sanguin, la pression partielle de CO₂ et O₂ (Zimmerman et coll., 1995; Cockroft et coll., 1996; Ivanova et coll., 1998; Dogan et coll., 1999a; Dogan et coll., 1999b; Avshalumov et Rice, 2003; Lu et coll., 2003a; Moochhala et coll., 2004). L'administration d'AG s'est également révélée cliniquement efficace dans les 24h suivant une lésion par occlusion de l'artère cérébrale médiane (Iadecola et coll., 1995a). Sur le plan fonctionnel, après un choc hémorragique ou une lésion traumatique, le traitement à l'AG améliore les performances comportementales et cognitives, indicateurs de la sévérité de la lésion cérébrale (Sullivan et coll., 1994; Levin, 1995; Lu et coll., 2003b; Moochhala et coll., 2004; Shirhan et coll., 2004b).

Traitement	Cible / Action	Effets sur les lésions du SNC	Références
OPC-14117 (Vit E)	Piégeur de radicaux libres	Diminution de l'œdème et des déficits comportementaux liés à une contusion cérébrale	(Kawamata et coll., 1997)
MDL 74, 722 (Vit E)	Piégeur de radicaux libres	Réduction de 49% la taille de nécrose après une ischémie	(van der Worp et coll., 1999)
Ubiquinone (coenzyme Q ₁₀)	Cofacteur essentiel de la chaîne de transport des électrons dans les mitochondries	Diminution de l'apoptose et de la concentration de cytochrome c ou des caspases -3 et -9, Augmentation de 45% de la survie de gerbille après ischémie	(Ogawa et coll., 1986; Wu et coll., 2007)
Dihydrolipoate	Réduction de la peroxydation des lipides	Réduction la nécrose après un choc ischémique cérébral	(Prehn et coll., 1992; Backhauss et coll., 1992)
Les agents de récupération piégeur de spin	Molécules capables de piégés d'autres molécules hautement réactives et instables.	Protection des tissus après une lésion ischémique ou traumatique, et même des effets de l'âge	(Carney et Floyd, 1991; Hensley et coll., 1997)
Deferoxamine	Chélateurs d'ions métalliques	Amélioration de la survie après une ischémie chez le rat, chez le chien et chez la souris.	(Palmer et coll., 1994; Hurn et coll., 1995; Sarco et coll., 2000)
Ebselen	Mimétique de la glutathione peroxydase dégrade les peroxyde d'hydrogène	Réduction de la nécrose post-ischémique chez l'animal comme chez l'Homme	(Johshita et coll., 1990; Yamaguchi et coll., 1998; Ogawa et coll., 1999)
Glutathione (GSH)	Détoxification des peroxydes et des toxines électrophiles, substrat de la GSH peroxydase	Déplétion de GSH augmente la lésion ischémique chez le rat.	(Mizui et coll., 1992)
L'acide urique	Déchet qui représente 60% de l'activité antioxydante plasmatique	Diminution après lésion ischémique des atteintes corticales et striatales Amélioration des performances comportementales chez le Rat.	(Wayner et coll., 1987; Benzie et Strain, 1996; Yu et coll., 1998)
La créatine (N-(aminoiminométhyl)N-méthyl glycine)	Tripeptide endogène produit par le foie, les reins et le pancréas.	Amélioration les atteintes corticales de 50% chez le Rat après une lésion traumatique. Rétablissement du fonctionnement mitochondriale	(Holtzman et coll., 1998; McArdle et coll., 1999; Balestrino et coll., 1999; Sullivan et coll., 2000)
Les polyphenols	Extrait à partir du thé vert (Flavonoïdes et <i>Epigallocatechin gallate</i>) ou du vin rouge (Resveratrol)	Protection contre ischémie cérébrale ou de stress oxydatif.). (pour revue voir Dore (2005) pour les polyphenols du vin et Etus et coll. (2003) pour les extraits de thé vert)	(Etus et coll., 2003; Lee et coll., 2003; Kiziltepe et coll., 2004; Mandel et coll., 2004; Dore, 2005)
2,4 diamino-Pyrrolo(2,3-D) Pyrimidine,	Fortes propriétés antioxydantes sur les lipides.	Amélioration après de lésion oxydative chez la Souris et des lésions ischémique chez le Rat	(Bundy et coll., 1995; Hall et coll., 1997; Schmid-Elsaesser et coll., 1997)
Aminoguanidine	Inhibiteur de l'iNOS, Inhibiteur de la diamine oxydase et de l'amine oxydase du sérum Piégeur de radicaux libres (<i>in vitro</i>)	Diminution la taille de l'œdème et le volume de l'infarctus Réduction importante du nombre de neurones dégénérescents et des cellules apoptotiques. Amélioration des capacités neurologiques et les performances comportementales,	(Zimmerman et coll., 1995; Cockroft et coll., 1996; Ivanova et coll., 1998; Dogan et coll., 1999a; Dogan et coll., 1999b; Avshalumov et Rice, 2003; Lu et coll., 2003a; Moochhala et coll., 2004).

Tableau 1 : Les principaux antioxydants utilisés dans le traitement post-lésionnel et leurs effets

C) Diminution de la réaction inflammatoire post-lésionnelle

Différentes cibles thérapeutiques permettant de diminuer l'inflammation post-lésionnelle peuvent être visées, notamment au niveau cellulaire, pour limiter la prolifération des cellules microgliales et des astrocytes, ou au niveau moléculaire, pour inhiber l'expression de protéines pro-inflammatoires.

Ainsi, des études *in vitro* ont montré que des inhibiteurs du cycle cellulaire, tels que le flavopiridol, l'olomoucine et la roscovitine, réduisent significativement la prolifération astrocytaire et diminuent la mort neuronale (Cernak et coll., 2005). Dans un modèle de lésion traumatique chez le Rat, les mêmes auteurs ont montré que le flavopiridol, administré au niveau central, permet de réduire la taille de la lésion ainsi que celle de l'œdème et de minimiser de façon dépendante de la dose la prolifération et l'activation de la microglie, permettant *in fine* de réduire les déficits fonctionnels. Des effets similaires ont été obtenus avec l'olomoucine dans un modèle de lésion médullaire (Tian et coll., 2007).

En ce qui concerne l'inhibition des molécules pro-inflammatoires, les travaux se sont orientés préférentiellement vers les stéroïdes naturels ou de synthèse, et notamment les glucocorticoïdes. En effet, ces composés exercent des effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs très puissants (Sorrells et Sapolsky, 2007). Ces effets sur le tissu cérébral lésé sont assurés par la diminution de l'expression des gènes de nombreuses molécules chimioattractives et pro-inflammatoires comme les cytokines (notamment IL-1beta, IL-6 et TNF-alpha), par une réduction de l'activité de la COX-2 et des prostaglandines, ainsi que par une augmentation de l'expression des molécules anti-inflammatoires IL-10 et TGF-Beta (Barnes, 2006; Sorrells et Sapolsky, 2007). Le seul traitement actuellement approuvé par la Food and Drug Administration, aux Etats Unis, consiste d'ailleurs en l'administration de méthylprednisolone, un membre synthétique de la famille des glucocorticoïdes. Dans le cas d'atteinte traumatique de la moelle épinière, ce traitement permet de réduire de façon significative la taille de la lésion, d'inhiber la peroxydation des lipides, de limiter les processus d'excitotoxicité liés au glutamate, de stimuler la synthèse de différents composés (sous-unités de la pompe Na⁺K⁺ATPase, facteurs de croissance comme le NGF), et de promouvoir la croissance axonale (Hall et Travis, 1988; Marzatico et coll., 1990; De Nicola et coll., 1998; Nash et coll., 2002). Cependant, ce

traitement est, à l'heure actuelle, de plus en plus controversé, les risques encourus¹ semblant plus importants que les bénéfiques (Hall, 2003; Roberts et coll., 2004; Edwards et coll., 2005).

D'autres dérivés des glucocorticoïdes sont également étudiés, tels que les lazaroïdes, aminostéroïdes dépourvus d'activité minéralo- et glucocorticoïde (Niederau et coll., 1995). Ces composés préviennent la peroxydation des lipides dépendante des ions métalliques (Hall, 1995). Ainsi, le tirilazad mesylate (U-74006F), un composé lipophile présentant une grande affinité pour l'endothélium vasculaire (Hall et coll., 1994), est utilisé chez le Rat pour réduire la mortalité post-traumatique et l'infarctus cérébral (McIntosh et coll., 1992; Sanada et coll., 1993), ainsi que l'étendue des nécroses après choc ischémique (Beck et Bielenberg, 1991; Park et Hall, 1994). Un autre lazaroïde, le LY231617, semble réduire la dégénérescence neuronale induite par une ischémie globale (Clemens et coll., 1993; O'Neill et coll., 1997).

Certains stéroïdes endogènes comme la progestérone et les œstrogènes ont des propriétés neuroprotectrices dans le SNC après lésion. Ces composés permettent notamment de réduire l'étendue des lésions traumatiques ou ischémiques, au niveau cérébral et médullaire (Roof et Hall, 2000; Sribnick et coll., 2005; Gibson et coll., 2008). Présentant des propriétés antioxydantes (Roof et coll., 1997; Roof et Hall, 2000), ils stimulent également l'expression des molécules anti-apoptotiques Bcl-XL et Bcl-2 (Roof et Hall, 2000; Sribnick et coll., 2006). Les œstrogènes sont également capables de réduire les processus d'excitotoxicité liés au glutamate (Stein, 2001), tandis que la progestérone régule l'expression de facteurs neurotrophiques comme le BDNF (Gonzalez et coll., 2004), active des signaux intracellulaires favorables à la survie neuronale (Singh et coll., 1999; Yao et coll., 2007) et inhibe de surcroît l'expression de molécules pro-apoptotiques comme Bax, Bad et la Caspase-3 (Djebaili et coll., 2004). Cependant, l'inhibition de l'enzyme de synthèse des stéroïdes endogènes, l'aminogluthéthimide, a permis de protéger les neurones corticaux de l'excitotoxicité liée au glutamate dans un modèle de lésion ischémique (Shirakawa et coll., 2006).

¹ Dans l'étude de Roberts et coll, chez des patients atteints d'un traumatisme crânien sévère, la méthylprednisolone augmente significativement le risque de décès, passant de 17,9% à 21,1%.

D) Stimulation de la plasticité neuronale post-lésionnelle

1) Blocage des molécules inhibitrices

De nombreux efforts ont été mis en œuvre dans le but de développer des traitements promoteurs de la croissance axonale, en ciblant des centaines molécules de la matrice extracellulaire, de la myéline ou des voies de signalisation.

a) Les Chondroïtinases

L'activité inhibitrice des CSPGs de la MEC sur la croissance axonale provient surtout de leurs chaînes de CS-GAG, susceptibles d'être décrochées du squelette protéique par des chondroïtinases (CHases). Un traitement par ces enzymes, démontré efficace *in vitro* pour stimuler la croissance axonale (Smith-Thomas et coll., 1994; Smith-Thomas et coll., 1995; Dou et Levine, 1995; Zuo et coll., 1998b), a permis aux axones axotomisés de la voie nigrostriée chez le Rat, de traverser le site de lésion et de croître vers leur cible originale (Moon et coll., 2001). Les CHases peuvent ainsi modifier l'environnement lésionnel en le rendant plus permissif. Dans un modèle d'écrasement du funiculus dorsal (au niveau de la moelle épinière) chez le rat, le traitement aux CHases a permis de stimuler la régénération des axones corticospinaux (Barritt et coll., 2006) et d'assurer la restauration de leur activité électrique, améliorant ainsi les fonctions motrices, proprioceptives, et autonomes des animaux (Bradbury et coll., 2002; Caggiano et coll., 2005; Cafferty et coll., 2008).

Dans le traitement des lésions médullaires, les CHases ont souvent été associées à des thérapies cellulaires (greffes de cellules de Schwann, de cellules olfactives engainantes ou de fragments de nerf périphérique). Ces approches combinées permettent aux axones d'entrer et de sortir du greffon (Chau et coll., 2004), données corrélées avec une restauration partielle de la motricité (Fouad et coll., 2005; Houle et coll., 2006).

b) Approches centrées sur le Nogo

Différentes stratégies de promotion de la régénération dans le SNC s'intéressent à Nogo-A et à son récepteur NgR, tentant de neutraliser les effets inhibiteurs de l'environnement sur la croissance axonale.

L'utilisation d'un anticorps anti-Nogo, développée par Caroni et Schwab, fut la première de ces stratégies, permettant la croissance axonale *in vitro* sur culture de

myéline (Caroni et Schwab, 1988a). Des cultures sur tranches ont montré que ce traitement stimulait le développement neuritique au niveau de la région CA3 de l'hippocampe (Craveiro et coll., 2008). *In vivo*, l'utilisation d'un anticorps anti-Nogo a fait l'objet de nombreuses études, notamment au niveau de la moelle épinière. Ces composés permettent d'induire une régénération partielle du tractus corticospinal (Schnell et Schwab, 1990; Schnell et Schwab, 1993), et d'augmenter le bourgeonnement de collatérales par les axones non lésés, favorisant ainsi la mise en place de circuits de compensation au niveau du tronc cérébral et de la moelle épinière, dans les zones ayant perdu leurs afférences controlatérales après transection partielle. Au niveau fonctionnel, ce traitement est suivi d'améliorations des fonctions motrices chez le Rat (Z'Graggen et coll., 1998; Raineteau et coll., 1999; Raineteau et coll., 2001; Papadopoulos et coll., 2002; Bareyre et coll., 2002; Liebscher et coll., 2005; Weinmann et coll., 2006) et les primates, améliorant la dextérité et la préhension des pattes antérieures après lésion médullaire cervicale (Fouad et coll., 2004; Freund et coll., 2006; Freund et coll., 2007; Freund et coll., 2009 ; pour revue Buchli et Schwab, 2005).

Testée dans des modèles de traumatisme crânien ou d'AVC, cette immunothérapie permet une restauration partielle des performances cognitives et comportementales, en corrélation avec une augmentation de la plasticité cérébrale dans l'hippocampe, indiquée par exemple par la réexpression de GAP-43 (Emerick et coll., 2003; Emerick et Kartje, 2004; Papadopoulos et coll., 2006; Tsai et coll., 2007; Marklund et coll., 2007).

D'autres stratégies ciblent plutôt le NgR. Ainsi dans un modèle d'hémisection médullaire, le traitement avec un fragment soluble de ce récepteur, constitué des 310 acides aminés de son ectodomaine, bloque les effets inhibiteurs de Nogo-A, Omgp et MAG sur la croissance axonale et améliore les performances locomotrices des rats (Li et coll., 2004). L'administration d'un peptide antagoniste du NgR, le NEP1-40, permet de stimuler les processus de régénération du tractus corticospinal (Fournier et coll., 2002; GrandPre et coll., 2002), avec une amélioration des fonctions motrices des animaux (GrandPre et coll., 2002; Atalay et coll., 2007). Enfin les travaux en thérapie génique d'une équipe japonaise montrent que l'injection d'ADN recombinant codant pour un peptide antagoniste de NgR permet de promouvoir la récupération partielle des fonctions motrices chez le Rat (Yu et coll., 2007; Yu et coll., 2008).

Afin de potentialiser leurs effets, ces approches permettant de neutraliser Nogo et son récepteur ont été combinées avec un traitement anti-inflammatoire à la méthylprednisolone (Ji et coll., 2005) ou divers facteurs de croissance (Guest et coll., 1997; Cui et coll., 2004; Gharabaghi et Tatagiba, 2005).

c) Inhibition de la voie Rho

Comme nous l'avons vu, de nombreux signaux issus de la matrice extracellulaire, d'effecteurs solubles ou de la myéline convergent vers l'activation d'une même voie de signalisation intracellulaire : celle de la protéine Rho et de ses effecteurs, qui bloquent la croissance axonale. Différentes approches ont été développées pour tenter de neutraliser cette voie, par inhibition directe ou indirecte.

(1) Inhibition directe

Développée par l'équipe de Lisa McKerracher, la C3-transférase, obtenue à partir de *Clostridium botulinum*, inhibe la protéine Rho par ADP-ribosylation de l'asparagine 41 dans le site de liaison effecteur de la GTPase (Mueller et coll., 2005; McKerracher et Higuchi, 2006). Testée dans des modèles de lésion du nerf optique ou de la moelle épinière, l'application locale de C3-transférase au niveau du site endommagé permet l'amorce de processus régénératifs au travers de la cicatrice gliale ; après lésion médullaire des améliorations de la locomotion ont été rapportées (Lehmann et coll., 1999; Dergham et coll., 2002; Bertrand et coll., 2005; Bertrand et coll., 2007). Un analogue de la C3-transférase, le BA-210, développé pour optimiser les effets (Lord-Fontaine et coll., 2008), a passé le stade des études précliniques et s'approche de la phase II des essais cliniques (McKerracher et Higuchi, 2006).

Utilisés dans la lutte contre l'inflammation, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (comme par exemple l'ibuprofène) ont récemment été identifiés comme inhibant également l'activité de Rho, permettant ainsi de stimuler la repousse des axones sérotoninergiques corticospinaux et de faciliter la restauration des fonctions locomotrices après transection ou contusion médullaire (Fu et coll., 2007).

En ce qui concerne l'inhibition de la protéine ROCK, l'application de Y-27632, un dérivé de pyridine, promeut la restauration structurelle et fonctionnelle chez la

Souris et chez le Rat après une atteinte médullaire (Ellezam et coll., 2002; Dergham et coll., 2002; Tanaka et coll., 2004). Une autre petite molécule le fasudil, un dérivé d'isoquinoline sulfonamide, stimule la restauration fonctionnelle des reflexes des pattes postérieures et la coordination motrice après une section de la moelle épinière chez le Rat (Hara et coll., 2000). Utilisé en clinique au Japon depuis 1995 dans le traitement des vasospasmes cérébraux (vasoconstrictions à l'origine d'une ischémie) pour ses propriétés vasodilatatrices, neuroprotectrices et neurotrophiques (Kubo et coll., 2008). Le traitement par le fasudil réduit les symptômes ischémiques sans exercer d'effets secondaires notables (Suzuki et coll., 2008).

(2) Inhibition indirecte

L'inhibition indirecte de la voie Rho par l'intervention d'un autre mécanisme intracellulaire a pu être mise en évidence dans les neurones sensitifs de la racine dorsale de la moelle épinière. Ces neurones ont la particularité de posséder deux prolongements : l'un périphérique issu d'un corpuscule sensitif, l'autre central, pénétrant de la moelle épinière. Plusieurs études ont montré qu'une lésion des prolongements centraux ne déclenche pas de processus de régénération soutenue. Lorsqu'une lésion des prolongements périphériques précède d'une à deux semaines la lésion des prolongements centraux, ceux-ci sont alors capables de réexprimer des protéines impliquées dans les processus de plasticité neuronale, comme la GAP-43 (Schreyer et Skene, 1993), et de développer des cônes de croissance susceptibles de traverser la cicatrice gliale (Richardson et coll., 1984; Oudega et coll., 1994; Chong et coll., 1996; Neumann et Woolf, 1999). Deux équipes, celle de Qiu et celle de Neumann, ont simultanément mis en évidence que l'effet inducteur, issu de la lésion conditionnelle des prolongements périphériques, passait en fait par l'augmentation de l'AMPc intracellulaire. Dans les neurones, l'augmentation du taux d'AMPc entraîne dans un premier temps l'activation de la protéine kinase A (PKA), qui a un effet direct sur le cytosquelette en inactivant Rho (Cai et coll., 2002; Neumann et coll., 2002; Qiu et coll., 2002a; Filbin, 2003; Hannila et Filbin, 2008). Dans un second temps, indépendamment de PKA, l'augmentation du taux d'AMPc active le facteur de transcription CREB (cAMP response element-binding), initiant la synthèse de nouvelles protéines. Dans les prolongements centraux des neurones sensitifs, l'effet de la lésion conditionnelle peut être mimé par injection au niveau du ganglion rachidien d'un analogue non hydrolysable de l'AMPc, le dibutyryl AMPc (db-

AMPc) (Neumann et coll., 2002; Qiu et coll., 2002b). L'injection locale de db-AMPc a également permis de stimuler la régénération axonale au niveau de différents sites lésionnels de SNC affectant le cervelet, le cortex ou l'hippocampe (Cai et coll., 1999; Snider et coll., 2002).

Dans les neurones centraux, les concentrations d'AMPc très élevées au cours des stades de développement, pour permettre tous les processus de croissance et de plasticité neuronales, chutent une fois le développement terminé. Réaugmentées à la suite d'une lésion, elles sont rapidement neutralisées par une protéine Go/Gi qui inhibe l'adénylate cyclase, enzyme de synthèse de l'AMPc (Cai et coll., 2002).

Des approches thérapeutiques tentent, à l'heure actuelle, de stimuler la production d'AMPc au niveau central. L'équipe de Marie Filbin s'intéresse à un composé déjà utilisé en tant qu'antidépresseur, le Rolipram, un inhibiteur de la phosphodiesterase 4 (PDE4), enzyme de dégradation de l'AMPc. L'administration de Rolipram après hémisection de la moelle épinière chez le Rat, combinée à une greffe de tissu embryonnaire au niveau de la lésion, permet aux fibres nerveuses de coloniser le transplant et d'améliorer significativement les performances locomotrices des animaux (Nikulina et coll., 2004).

D'autres équipes se sont intéressées à la cascade d'évènements intracellulaires initiée par l'augmentation du taux d'AMPc, et ses implications dans les processus régénératifs, dans l'espoir d'y trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour le SNC endommagé.

L'activation de CREB par l'AMPc stimule la production d'Arginase 1 (Arg 1) (Cai et coll., 2002). Cette enzyme joue un rôle clé dans la protection du système nerveux central et dans sa régénération (pour revue Lange et coll., 2004). Des études *in vitro* ont montré que l'Arg 1 a un effet neuroprotecteur après un stress oxydatif (Esch et coll., 1998) et que sa surexpression permet de bloquer l'effet inhibiteur de la myéline sur la croissance axonale (Cai et coll., 2002). Inversement, le blocage d'Arg 1 peut abolir les effets neurotrophiques de l'AMPc (Cai et coll., 2002).

Arg 1 est une enzyme clé de la synthèse des polyamines (PAs), petit groupe de chaînes aliphatiques aminées, impliquées dans la croissance neuronale au cours du développement (Slotkin et Bartolome, 1986), et dans les processus de régénération axonale post-lésionnelle (Ingoglia et coll., 1982; Gilad et Gilad, 1983; Chu et coll., 1995; Gilad et coll., 1996). Les nombreuses fonctions attribuées aux PAs (Tabor et Tabor, 1984; Seiler, 1991; Gilad et Gilad, 1992) soulignent leur

importance dans les mécanismes de défense cellulaire contre l'accumulation des radicaux libres et la peroxydation de lipides (Ohmori et coll., 1988; Tadolini, 1988). Les PAs participent également à la régulation ionique de l'environnement neuronal, au contrôle de l'homéostasie calcique (Jensen et coll., 1987), à la modulation de plusieurs récepteurs canaux (Williams, 1997), notamment les récepteurs NMDA et leurs seconds messagers, et à la stimulation des facteurs neurotrophiques (Gilad et Gilad, 1999). L'augmentation de leur métabolisme, appelée « réponse des polyamines », est aujourd'hui connue pour avoir un rôle crucial dans la réponse des neurones à une lésion, essentielle pour la survie cellulaire et les processus de régénération (Gilad et Gilad, 1992). Cependant, soutenus dans le SNP (Gilad et Gilad, 1983; Soiefer et coll., 1988), ces processus ne sont que transitoires au sein du SNC (Paschen et coll., 1988; Gilad et Gilad, 1992).

Ainsi, l'augmentation de la biosynthèse des PAs endogènes, observée après lésions traumatiques ou ischémiques (Gilad et Gilad, 1983; Shirhan et coll., 2004c), neurotoxiques (Gilad et Gilad, 1991b) ou dégénératives (Gilad et Gilad, 1991a), ne permet pas de soutenir les processus spontanés de régénération.

L'apport de PAs exogènes a donc été envisagé en tant que stratégie thérapeutique après lésion cérébrale ou médullaire. Bien que les échanges des PAs entre le compartiment sanguin et le SNC soient limités, l'interruption de la BHE induite par les phénomènes inflammatoires, comme nous l'avons vu précédemment, permettrait aux PAs d'atteindre le cerveau (Seiler et Dezeure, 1990; Dietrich et coll., 1991). Les effets de l'administration de PAs exogènes ont été étudiés dans différents modèles de trauma chez l'animal, et retrouvés identiques à ceux des polyamines endogènes (Seiler et Dezeure, 1990; Gilad et Gilad, 1991b): neuroprotecteurs (Gilad et Gilad, 1988; Gilad et Gilad, 1989; Gilad et Gilad, 1991b) et neurotrophiques (pour revue Gilad et Gilad, 1992), permettant de lever l'inhibition de la croissance axonale induite par la voie Rho (Dornay et coll., 1986; Gilad et Gilad, 1991b; Chu et coll., 1994; Chu et coll., 1995; Cai et coll., 2002; Filbin, 2003). Les mécanismes d'action précis de l'action des PAs, endogènes ou exogènes, n'ont pas encore été complètement identifiés. Ces molécules exercent leurs actions à travers une ou plusieurs combinaisons d'actions cellulaires (Gilad et coll., 1999). En particulier, les PAs influencent directement, via des effets à court et long terme, la synthèse, la polymérisation et l'organisation des microtubules, qui représentent les principaux composants de la mobilité cellulaire (Kaminska et coll., 1992; Banan et coll., 1998)

(Wolff, 1998). Elles interagissent également avec les acides nucléiques et la structure de la chromatine (Cohen 1998), et influencent les processus de bourgeonnement axonal et de plasticité synaptique (Aizenman et coll., 2002)

Plus récemment, un nouveau rôle a été identifié pour les PAs dans le cerveau des rongeurs (Malaterre et coll., 2004). Ces molécules stimulent la prolifération des cellules progénitrices neurales dans deux zones de neurogénèse, le gyrus denté et la zone subventriculaire. La régulation de ces progéniteurs constitue l'une des nouvelles stratégies thérapeutiques envisagées pour les maladies neurodégénératives et les lésions cérébrales (pour revue Kuhn et coll., 2001). Les mécanismes moléculaires par lesquels les polyamines stimulent la prolifération des cellules souches ne sont pas encore élucidés : les polyamines pourraient être un intermédiaire intracellulaire entre les voies de signalisation hormonales et des facteurs trophiques agissant sur la neurogénèse (Malaterre et coll., 2004).

Cependant, malgré leur large potentiel neuroprotecteur et régénératif, les polyamines à forte concentration ont des effets cytotoxiques, compte tenu notamment de leur dégradation oxydative (Paschen, 1992; Kindy et coll., 1994; Ivanova et coll., 1998; Seiler, 2000; Seiler, 2004). De nouveaux composés de synthèse dérivant des polyamines naturelles ont été développés pour pallier cet inconvénient majeur (Gilad et Gilad, 1999). Pour notre part, nous avons choisi de combiner les traitements et d'administrer la Putrescine, la moins toxique des trois polyamines (Seiler et coll., 2000), en présence d'Aminoguanidine, inhibiteur efficace, comme nous l'avons déjà décrit, de la polyamine oxydase tissulaire, ce qui devrait permettre de prolonger la durée d'action de la putrescine tout en évitant sa dégradation en aldéhydes réactifs (pour revue Schimchowitsch et Cassel, 2006).

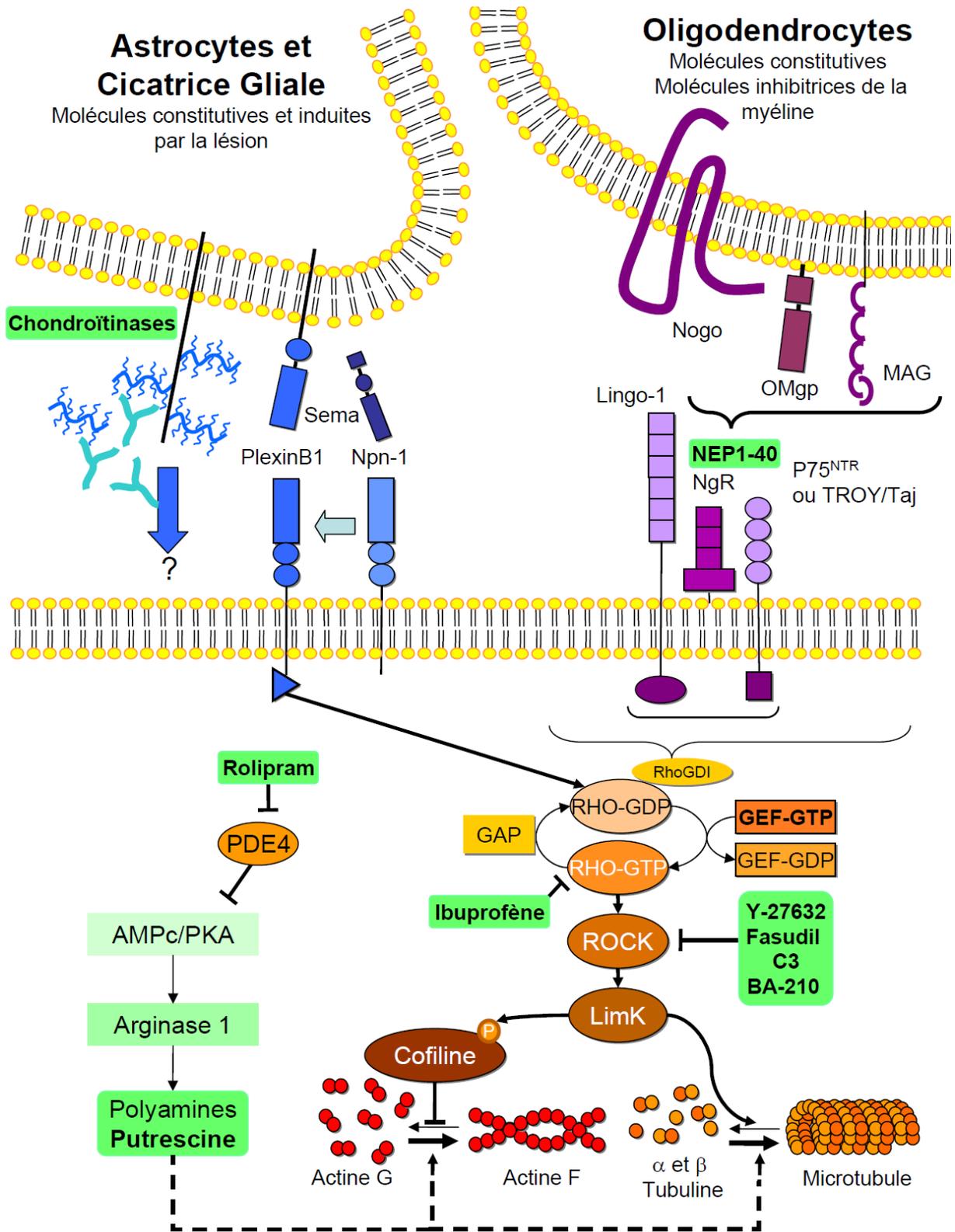


Figure 11 : Schéma représentant les cibles moléculaires des différents traitements (encadrés verts) bloquant les effets des molécules inhibitrices de la croissance axonale.

2) Apport et protection des molécules stimulantes

a) Neurotrophines et facteurs de croissance

Les familles de molécules les plus utilisées pour promouvoir les processus de plasticité cérébrale sont celles des neurotrophines et des facteurs de croissance.

Neurotrophiques, comme leur nom l'indique, les neurotrophines exercent également d'autres fonctions. Synthétisées dans les tissus cibles, elles se fixent sur leurs récepteurs, au niveau des terminaisons présynaptiques, avant d'être internalisées dans les neurones. Transportées par voie rétrograde le long de l'axone jusqu'au soma, elles activent plusieurs cascades intracellulaires impliquées dans la survie neuronale et la croissance axonale (pour revue Webster et Pirrung, 2008) (Reichardt, 2006).

En fonction des structures impliquées, différentes neurotrophines peuvent agir de concert. C'est le cas, par exemple, pour les neurones cholinergiques du septum médian, dont les connexions synaptiques sont stabilisées et maintenues fonctionnelles par trois neurotrophines, le NGF, le BDNF et la NT-3, synthétisées dans l'hippocampe (Hefti et Mash, 1989; Sobreviela et coll., 1996; Mufson et coll., 1999).

Les effets de l'administration de neurotrophines ont été étudiés dans différents modèles de lésion du SNC. Les effets du BDNF et de la NT-3 ont été surtout caractérisés au niveau médullaire, stimulant la survie des neurones lésés (Cheng et Mattson, 1994; Liu et coll., 1999; Cheng et coll., 2003a) et la croissance de leurs axones (Mocchetti et Wrathall, 1995; Vavrek et coll., 2006). Les effets du NGF ont été largement étudiés dans le cerveau.

Après transection ou aspiration des voies septohippocampiques dorsales (SHD) par exemple, l'administration intraparenchymateuse de NGF atténue l'atrophie des neurones cholinergiques induite par la lésion, limite leur dégénérescence (Wilcox et coll., 1995), stimule la croissance de leurs axones vers la source de NGF (Hagg et Varon, 1993), stabilise les synapses (pour revue Thoenen et coll., 1987) et, d'un point de vue fonctionnel, permet une amélioration des performances mnésiques détériorées par la lésion (Francis-Turner et Valouskova, 1996).

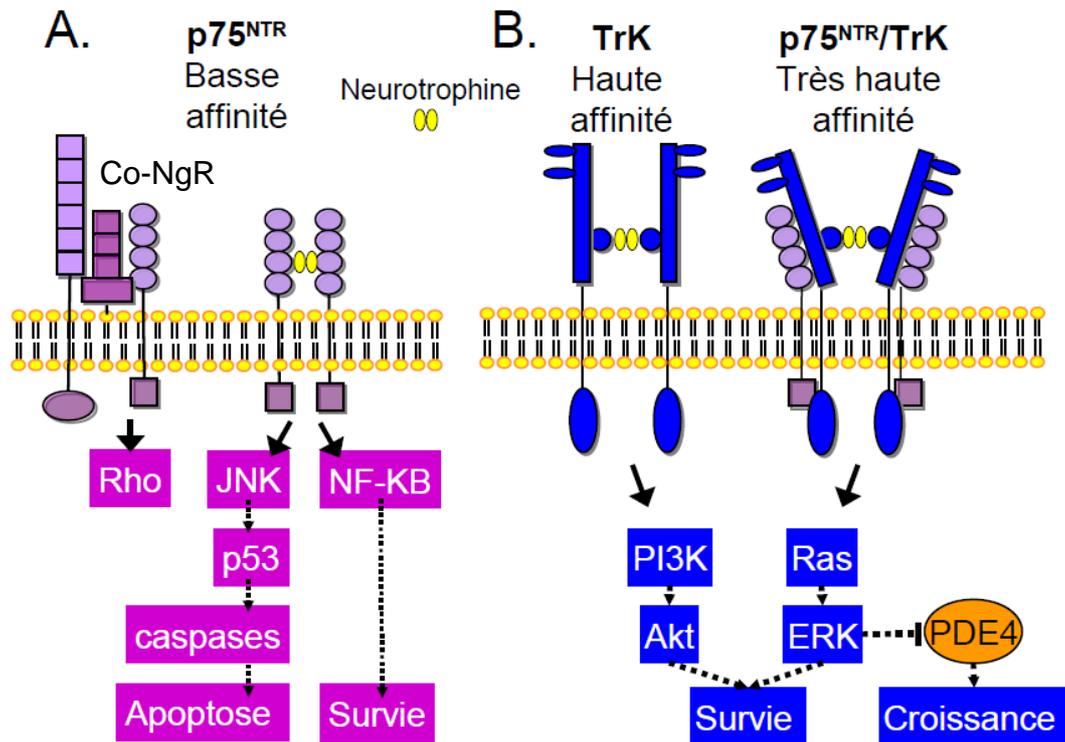


Figure 12 : Signalisation des Neurotrophines

Les Neurotrophines de mammifère, Nerve Growth Factor (NGF), Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF), et Neurotrophines 3 et 4 (NT-3 et NT-4), vont agir sur deux types de récepteurs, le récepteur à basse affinité des neurotrophines ($p75^{\text{NTR}}$) et une famille de récepteurs à tyrosine kinase : les récepteurs tropomyosine kinase (Trk).

Le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ (A) appartient à la superfamille des récepteurs du facteur de nécrose des tumeurs (TNF). Ce récepteur régule trois voies de signalisation majeures. Via l'activation de NF-KappaB (NF-KB), il active la transcription de plusieurs gènes dont certains favorisent la survie neuronale. Via l'activation de son « domaine de mort » (death domain), il active Jun kinase (JNK) et sa cascade intracellulaire, qui contrôlent la transcription de gènes favorables à l'apoptose. Enfin, il est impliqué dans la formation du complexe moléculaire co-NgR, responsable de l'activation de la voie Rho induisant la rétraction des cônes de croissance (pour revue Reichardt 2006)

La famille des Trk (B) est constituée de trois types de récepteurs Trk A, B, et C, ayant respectivement une affinité particulière pour le NGF, le BDNF et la NT-4, et pour la NT-3). La fixation d'une neurotrophine favorise la dimérisation des Trk. Le complexe ligand-récepteur est endocyté au niveau des terminaisons et transporté activement, de façon rétrograde (Wu et coll., 2009), jusqu'au corps cellulaire où il activera des seconds messagers. Ainsi la dimérisation des Trk entraîne d'une part l'activation de Ras, conduisant à l'activation des kinases des protéines mitogènes activées (MAPK), et aboutissant à l'activation de ERK, et d'autre part l'activation de la phosphatidyl-inositol-3 phosphate kinase (PI3-k), Akt et la PLC-Gamma-1, entraînant la génération de IP3 et de DAG. *In fine*, ces deux processus aboutissant à l'activation de facteurs de transcription régulant plusieurs gènes anti-apoptotiques ou impliqués dans la plasticité. De plus, l'activation de ERK permet de diminuer l'activité inhibitrice de PDE4 sur l'AMPc et lève ainsi l'inhibition sur la croissance axonale.

Les mécanismes d'action du NGF passent par une signalisation complexe. L'action neuroprotectrice du NGF serait d'une part liée aux propriétés antioxydantes de ce composé, via l'activation des enzymes permettant la réduction d'un tripeptide, la glutathione, connue pour ses propriétés antioxydantes (déjà mentionné dans le tableau 1), et d'autre part à l'activation des récepteurs Trk (Figure 12) et leurs cascades de signalisation intracellulaire, aboutissant à l'expression de gènes en faveur de la survie neuronale. L'action neuritotrophique du NGF est liée à ERK (Extracellular signal-regulated kinase) qui, comme le Rolipram précédemment cité, inhibe la PDE4 et augmente le taux d'AMPc (Gao et coll., 2003). Plus récemment, une nouvelle fonction a été attribuée au NGF, celle de diminuer la prolifération des astrocytes activés à la suite d'une lésion centrale. En effet, p75NTR, le récepteur à basse affinité des neurotrophines (Figure 12), est exprimé par les astrocytes et permet l'activation des caspases induisant la mort cellulaire, ce qui diminue la gliose réactionnelle induite par la lésion (Cragolini et coll., 2009).

L'inconvénient majeur d'un traitement par le NGF est que ce facteur ne passe pas la BHE (Friden et coll., 1993) et doit donc être injecté directement dans le SNC. Son utilisation thérapeutique chez l'Homme est ainsi plus limitée. D'autre part, des injections ICV répétées de NGF produisent des effets secondaires importants : anorexie, perte de poids (Williams, 1991; Lapchak et Hefti, 1992), douleurs dorsales (Eriksdotter et coll., 1998)... Pour pallier ces inconvénients, un traitement par la propentofyline, un dérivé de xanthine, stimulant la synthèse endogène de NGF et passant la BHE, a été testé chez l'Homme, aboutissant cependant aux mêmes effets secondaires indésirables.

D'autres études ont ciblé les facteurs de croissance, tels que le FGF (dont la forme majoritairement exprimée par les neurones est FGF1) et le TGF-beta, qui passent la BHE (Cuevas et coll., 1998; McLennan et coll., 2005) et exercent également des effets neuroprotecteurs et/ou neuritotrophiques sur les neurones lésés. Les récepteurs aux FGFs sont des récepteurs à tyrosine kinase activant les mêmes voies de signalisation intracellulaire que les Trk, tandis que les trois isoformes de TGF-béta permettent l'activation d'agents anti-apoptotiques tel que Bcl-2 (Prehn et coll., 1994; Zhu et coll., 2002).

De nombreuses études ont mis en évidence un rôle neuroprotecteur des

facteurs de croissance après un traumatisme au sein du SNC : hypoxie (Freese et coll., 1992; Prehn et coll., 1993), stress oxydatif et stress excitotoxique par le glutamate (Mattson et Cheng, 1993; Ren et Finklestein, 1997; Ruocco et coll., 1999), ou lésion des voies SHD (Otto et coll., 1989; Grothe et coll., 1989; Cummings et coll., 1992).

D'autres études, encore, ont révélé les interactions potentialisantes entre les neurotrophines et les facteurs de croissance. Ainsi, l'apport exogène combiné de ces composés s'est révélé particulièrement efficace pour favoriser la survie cellulaire et la croissance axonale au niveau d'une lésion de la moelle épinière (Pearse et coll., 2004; Lu et coll., 2004; Nikulina et coll., 2004; Lee et coll., 2008) ou des cellules ganglionnaires de la rétine (Logan et coll., 2006). D'autre part, FGF1 est capable d'augmenter la synthèse des ARN messagers et leur transcription (Figueiredo et coll., 1995).

Cependant, la diffusion dans tout le cerveau de doses élevées de facteurs de croissance et de neurotrophines exogènes semble perturbatrice. Les essais cliniques dont FGF2 a fait l'objet ont d'ailleurs été interrompus, en raison des risques secondaires encourus (Bogousslavsky et coll., 2002).

Des approches ont alors été envisagées, pour essayer de restreindre l'action de ces facteurs au niveau du site de lésion. Comme nous l'avons déjà décrit, les neurotrophines et facteurs de croissance se liant aux HS sont libérés massivement, mais rapidement dégradés après une lésion du SNC (Story, 1991; McCaffrey et coll., 1994). Il semblait donc judicieux de pouvoir, soit stimuler la synthèse locale de ces facteurs, soit les protéger de la dégradation enzymatique et prolongeant ainsi leur biodisponibilité et leur durée d'action directement au niveau du site lésionnel

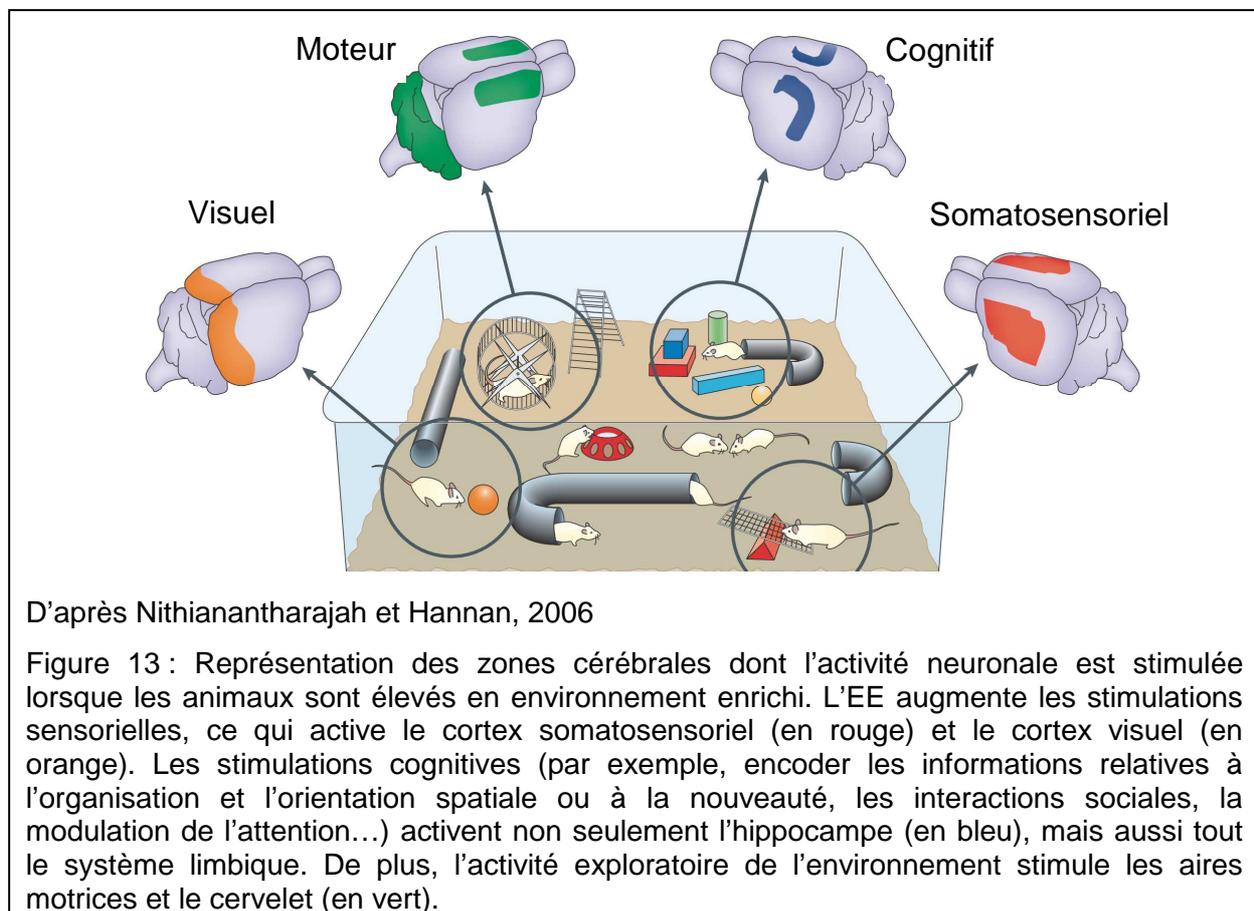
b) Elevage en milieu enrichi

Une façon d'augmenter au niveau du site lésionnel du SNC, le cocktail post-lésionnel de neurotrophines et de facteurs de croissance endogènes, consiste à stimuler l'activité neuronale dans les régions cérébrales impliquées (Figure 13) (Nithianantharajah et Hannan, 2006). L'augmentation des stimulations sensorielles, motrices et cognitives par des conditions d'élevage dites enrichies (en interactions sociales et en activité physique et exploratoire, comparativement aux conditions d'élevage standard où l'animal est placé seul, et dans une cage de plus petite

dimension), entraîne ainsi une augmentation des taux de NGF et BDNF dans certaines aires cérébrales (Pham et coll., 2002).

Après une lésion du CNS, des animaux élevés en EE présentent, comparativement à leurs homologues élevés en condition standard, une plus forte densité d'épines dendritiques dans le cortex moteur (Kim et coll., 2008), une neurogénèse accrue, et une activité apoptotique spontanée plus réduite au niveau de l'hippocampe. L'exercice physique augmente l'expression de facteurs de croissance, stimule l'angiogénèse et améliore les fonctions cognitives et motrices (Will et coll., 2004). Les effets bénéfiques de l'élevage en EE ont été mis en évidence dans des modèles d'ischémie cérébrale (pour revue Komitova et coll., 2006; Johansson, 2007) et de lésion traumatique (Will et coll., 1976; Whishaw et coll., 1984; Kolb et Gibb, 1991; Restivo et coll., 2005; Gaulke et coll., 2005; Lippert-Gruener et coll., 2007; Fischer et Peduzzi, 2007). De plus, certaines études ont montré qu'après lésion, l'élevage en EE est susceptible de potentialiser les effets des facteurs de croissance (Koopmans et coll., 2006; Kim et coll., 2008).

Nous avons inclus l'EE dans nos études, dans l'espoir de potentialiser les effets de nos autres traitements.



c) Agents protecteurs des facteurs de croissance et de neurotrophines

Synthétisés par OTR3 (Paris) à partir de dextrane, les RGTAs ou ReGeneraTing Agents représentent une nouvelle classe d'agents thérapeutiques mimant les effets des HS (Tardieu et coll., 1989; Tardieu et coll., 1992; Barritault et Caruelle, 2006). Possédant des propriétés antioxydantes, ces composés sont par ailleurs capables de protéger, stocker, et contrôler la biodisponibilité de nombreuses molécules, notamment des facteurs de croissance et des neurotrophines (Macias, 2008), mais aussi d'autres molécules impliquées dans les processus inflammatoires : cytokines, interleukines, FSC, chémokines... (Lever et Page, 2002).

Testés dans différents modèles de lésion périphérique (Tableau 2), les RGTAs exercent des effets spectaculaires sur les processus de réparation tissulaire, permettant une véritable régénération des tissus endommagés et l'absence de tissu cicatriciel.

Les effets de RGTAs ont été testés pour la première fois au niveau du SNC dans mon laboratoire d'accueil, à l'occasion du travail de thèse de Patricia Marques-Peirera (2004), dans un modèle de lésion immunotoxique des neurones cholinergiques du Septum médian.

Patricia Marques-Peirera a pu montrer que les RGTAs étaient capables de passer la BHE. Ces composés sont ainsi aisément administrables par voie systémique, et présentent la particularité d'aller se fixer spécifiquement au niveau du site inflammatoire induit par la lésion (Meddahi et coll., 2002a). Non observés dans les tissus cérébraux sains ni même au niveau d'une lésion mécanique induite par le passage d'une canule d'injection, les RGTAs fluorescents ont été effectivement retrouvés dans la zone inflammatoire induite par l'immunotoxine jusqu'à 20 jours, au moins, postopératoires (thèse de Marques-Pereira, 2004). Dans ce modèle de lésion cérébrale, les RGTAs se sont montrés capables de protéger, bien que de façon partielle, les neurones cholinergiques septaux et leurs projections hippocampiques des effets délétères de la 192-IgG-saporine (augmentation du nombre de neurones septaux exprimant la ChAT, avec une restauration partielle de la sensibilité de leurs autorécepteurs muscariniques perturbés par la lésion). Compte tenu de ces données, il nous a semblé particulièrement intéressant d'étudier les effets des RGTAs dans notre modèle de lésion chirurgicale, et de les associer aux conditions d'élevage en milieu enrichi.

Tableau 2 : Effets de RGTAs dans différents modèles de lésion périphériques

Modèle de lésion	Effets observés	Références
Craniotomie	Réparation osseuse Différenciation des ostéoclastes	(Blanquaert et coll., 1999)
Ecrasement du muscle strié squelettique	Nouveaux myotubes Régénération de la jonction neuromusculaire Revascularisation musculaire	(Papy-Garcia et coll., 2002; Meddahi et coll., 2002b)
Infarctus du myocarde	Diminution de la dégénérescence des myocytes Augmentation de la revascularisation	(Yamauchi et coll., 2000)
Ecrasement du nerf périphérique	Importante réduction de l'adhérence des tissus environnants	(Zuidendorp et coll., 2008)
Ulcère de la cornée	Reformation complète de l'épithélium cornéen	(Fredj-Reygrobellet et coll., 1994)
Ulcère du tube digestif	Diminution de l'inflammation Augmentation de la réparation tissulaire	(Meddahi et coll., 2002a)
Mucosite (inflammation et ulcération d'une muqueuse)	Diminution de l'inflammation par préservation des constituants de la membrane	(Morvan et coll., 2004)
Périodontite	Restauration du tissu gingival Prolifération cellulaire Accumulation de collagène Diminution de l'inflammation	(Escartin et coll., 2003; Lallam-Laroye et coll., 2006)
Ablation dermale	Accélération de la cicatrisation Augmentation de la résistance cutanée Augmentation de la microvascularisation	(Tong et coll., 2008)
Lésion cholinergique septo-hippocampique (lésion des neurones cholinergiques par la 192 IgG-Saporine)	Survie de neurones cholinergiques Augmentation de l'activité hippocampique de l'AChE	Marques-Pereira et coll (en préparation)

L'ensemble des axes de recherche abordés jusqu'à présent sont basés sur le développement de stratégies visant à stimuler et soutenir les propriétés intrinsèques de réparation des neurones centraux, ou de modifier leur environnement pour le rendre favorable aux processus de régénération. Cependant, une lésion dans le SNC entraîne généralement la formation d'une cavité lésionnelle infranchissable pour des neurites en voie d'élongation. Pour soutenir la repousse neuronale et permettre aux fibres lésées de reconnecter leurs structures cibles, il faut combler la cavité par une matrice permissive. Dans cette optique, la recherche de nouveaux matériaux, favorisant l'interdisciplinarité, a littéralement explosé au cours des 10 dernières années.

E) Biomatériaux en tant que ponts de régénération

D'origine biologique (bloc de tissu foetal, segment de nerf périphérique...) ou de synthèse (Friedman et coll., 2002), les ponts de régénération font actuellement l'objet de nombreuses études impliquant notamment des approches physico-chimiques de pointe, pour développer des composés biocompatibles et performants, susceptibles de combler une cavité lésionnelle dans le SNC et de servir de matrice permissive pour le développement cellulaire et la croissance des neurones en voie de régénération. Parmi ces composés, les hydrogels occupent aujourd'hui une place privilégiée.

Les hydrogels sont des polymères réticulés hydrophiliques, insolubles dans l'eau (Tsang et Bhatia, 2004). Compte tenu de leurs propriétés mécaniques et de leur capacité à retenir de grandes quantités d'eau, permettant une diffusion rapide des ions et des nutriments (Woerly et coll., 1999), les hydrogels sont des matrices particulièrement intéressantes pour être implantées au sein de tissus mous (Woerly et coll., 1999; Balgude et coll., 2001; Tsang et Bhatia, 2004; Tan et coll., 2005). Leur structure macroporeuse tridimensionnelle permet leur colonisation par différents types cellulaires. D'autres part, ils peuvent être enrichis en composés actifs comme des neurotrophines, des oligopeptides ou des protéines de la MEC, afin d'optimiser leurs propriétés d'adhérence et de favoriser le développement cellulaire et la croissance axonale.

En ce qui concerne les hydrogels susceptibles de combler une cavité lésionnelle dans le SNC et notamment le cerveau, les propriétés physico-chimiques doivent répondre à un cahier des charges précis. Facilement implantables sans comprimer les tissus environnants, ces matériaux doivent être résistants, mais idéalement résorbables à long terme (bioéliminables) pour laisser place à la réorganisation tissulaire (Gutowska et coll., 2001; Jain et coll., 2006; Gupta et coll., 2006).

Les hydrogels sont classés en deux catégories, en fonction de leur origine, synthétique ou biologique.

1) Les hydrogels d'origine synthétique

Offrant des perspectives prometteuses, les hydrogels dérivés du méthacrylate ont pour intérêt majeur de posséder des propriétés mécaniques analogues à celles

du tissu cérébral. Le poly(2-hydroxyethyl) méthacrylate (pHEMA), le plus utilisé dans cette classe d'hydrogel, permet une bonne adhérence cellulaire et un développement neuronal adéquat lorsqu'il est associé à des molécules d'adhérence telles que la laminine ou le collagène (Giannetti et coll., 2001) ou des oligopeptides issus de ces molécules (Yu et Shoichet, 2005). Le pHEMA a été principalement utilisé dans le cadre de lésions médullaires, permettant des avancées encourageantes (Flynn et coll., 2003). L'équipe de Stéphane Woerly notamment, à l'origine de la société canadienne Organogel, a développé et optimisé différents hydrogels à base de pHEMA ou de pHPMA (poly(hydroxypropyl) méthacrylate). Le Neurogel, en particulier, hydrogel de pHPMA réticulé, a permis le développement d'un pont revascularisé favorisant la régénération médullaire des axones ascendants et descendants (Woerly et coll., 2001). D'autres hydrogels à base de pHEMA, pHPMA ou poly(glyceryl méthacrylate) (pGMA), et imprégnés de collagène, ont été testés dans le cadre de lésions cérébrales (Woerly et coll., 1990). Un de ces hydrogels à fait l'objet d'une collaboration avec mon laboratoire d'accueil, dans le cadre de la thèse d'Elie Hofferer-Duconseille (1997) (Duconseille et coll., 1999). Implanté chez le Rat, dans la cavité lésionnelle réalisée au niveau des voies septohippocampiques dorsales, cet hydrogel de pHPMA enrichi en groupements N-acétyl-glucosaminés a montré une bonne intégration dans le tissu hôte après un an d'implantation, et a été colonisé par des vaisseaux sanguins, des astrocytes et des fibres neuronales, et un réseau de laminine et de fibronectine. Son implantation, combinée à une greffe homotypique de cellules septales fœtales, a permis d'atténuer les déficits comportementaux et électrophysiologiques induits par la lésion. Les études morphologiques ont montré que la présence de l'hydrogel a permis aux fibres neuronales issues des cellules greffées de franchir la cavité lésionnelle et d'atteindre partiellement leur structure cible. Ces données, très encourageantes, montraient cependant la nécessité d'optimiser l'interface hydrogel/tissu cible. Or, la synthèse d'un hydrogel de pHPMA implique l'utilisation d'un monomère toxique. Seule la forme polymérisée de l'hydrogel est utilisable, nécessitant ainsi le prédécoupage du gel aux dimensions exactes de la cavité avant son implantation, qui est d'un part techniquement impossible et d'autre part très limitant pour des cavités lésionnelles difficiles d'accès.

D'autres études ont concerné le polyéthylène glycol (PEG) qui, injectable à l'état liquide, présente l'avantage de pouvoir être réticulé par photopolymérisation

(West et coll., 1997). Polymère hydrophile, le PEG est non-toxique, biodégradable et bio-éliminable. Son utilisation dans le cadre du SNC a donné également des résultats encourageants. Cependant, le PEG présente une faible adhérence pour les protéines et les cellules (Naraghi et coll., 1998), ce qui limite ses applications. Des essais d'enrichissement en groupement peptidiques ou molécules neurotrophiques ont ainsi été réalisés pour optimiser ses propriétés (Piantino et coll., 2006; Burdick et coll., 2006).

Les hydrogels à base des PEG sont actuellement plutôt utilisés pour la fabrication de microsphères implantables, susceptibles de libérer leur contenu selon une cinétique modulable. Des microsphères contenant des neurotrophines, chacune ayant sa propre vitesse de libération, ont ainsi pu être implantées dans des cavités lésionnelles de la moelle épinière, favorisant in fine la repousse neuritique (Piantino et coll., 2006; Burdick et coll., 2006).

2) Les hydrogels d'origine biologique

Un des avantages majeurs concernant l'utilisation de molécule d'origine biologique (par exemple des GAGs ou des chaînes polysaccharidiques) pour la synthèse d'hydrogels est leur biocompatibilité (Nisbet et coll., 2009).

L'agarose a été le premier biomatériau utilisé pour la synthèse d'un hydrogel (Bellamkonda et coll., 1995b). Issues d'extraits d'algue rouge, ses chaînes linéaires polysaccharidiques sont employées dans l'ingénierie tissulaire pour former des gels thermosensibles, possédant de bonnes propriétés de rigidité, de porosité et de biocompatibilité (Bellamkonda et coll., 1995b; Dillon et coll., 1998; Balgude et coll., 2001; Stokols et Tuszynski, 2004; Stokols, 2006). *In vitro*, l'agarose a été utilisé pour favoriser l'adhérence cellulaire et la croissance neuritique (Luo et Shoichet, 2004). Ses propriétés peuvent être optimisées par greffage d'oligopeptides de laminine sur son squelette polysaccharidique (Bellamkonda et coll., 1995a; Luo et Shoichet, 2004). *In vivo*, dans un modèle de lésion médullaire, l'implantation d'un hydrogel d'agarose contenant des microtubes libérant du BDNF a permis la colonisation neuritique du biomatériau (Stokols et Tuszynski, 2004; Jain et coll., 2006). Une matrice d'agarose peut ainsi favoriser la croissance axonale, mais elle présente deux inconvénients : elle n'est pas biodégradable, et sa température de gélification est inférieure à 37°C, ce qui nécessite soit un système de refroidissement permettant la formation du gel après implantation de la matrice (Jain et coll., 2006), soit de

prédécouper l'hydrogel préformé aux dimensions de la cavité lésionnelle, opération des plus délicates, voire impossible.

D'autres essais ont ainsi porté sur la méthylcellulose, capable de gélifier à des températures physiologiques en présence de sels ou d'autres composés (Tate et coll., 2001; Stabenfeldt et coll., 2006). La méthylcellulose n'induit pas de réaction inflammatoire, mais n'absorbe aucune protéine et n'a aucune activité trophique (Tate et coll., 2001). Ses propriétés doivent donc être optimisées par enrichissement moléculaire (Stabenfeldt et coll., 2006). Gupta et ses collaborateurs ont essayé de la combiner au hyaluronane (ou encore acide hyaluronique ou hyaluronate), un GAG de haut poids moléculaire, afin d'augmenter sa vitesse de gélification. Implantée dans une cavité lésionnelle de la moelle épinière chez le Rat, cette matrice mixte a permis de réduire l'inflammation et a favorisé la restauration partielle des fonctions locomotrices (Gupta et coll., 2006).

Le hyaluronane, qui peut être utilisé seul pour former un hydrogel, est l'un des composants de la MEC dans le SNC (Mori et coll., 2004). Testés dans différents modèles de lésions du SNP, les hydrogels de hyaluronane sont capables d'être colonisés par des fibres nerveuses, qui présentent de plus une meilleure vitesse de conduction (Seckel et coll., 1995). Peu efficaces dans le cadre d'une lésion traumatique du cerveau, les hydrogels de hyaluronane doivent être optimisés par greffage de 10 à 25% de molécules d'adhérence telles que la polylysine. Dans ces conditions, les neurones et les cellules gliales peuvent coloniser l'hydrogel (Tian et coll., 2005). Un hydrogel de hyaluronane optimisé par greffage d'anticorps anti-Nogo sur son squelette (Tian et coll., 2005), a permis la restauration partielle des performances motrices chez le Rat après une ischémie (Ma et coll., 2007).

Dans la panoplie des biomatériaux susceptibles de servir de matrice permissive, l'alginate et ses dérivés occupent une grande place. L'alginate est une chaîne polysaccharidique linéaire, chargée négativement, qui forme un gel en présence de cations divalents comme le Ca^{2+} (Dvir-Ginzberg et coll., 2003; Lai et coll., 2003; Awad et coll., 2004; Barralet et coll., 2005). Dans le cadre de lésions médullaires, les hydrogels d'alginate ont été utilisés comme ponts de régénération. Stimulant la croissance axonale, ils ont pu être colonisés par des fibres ascendantes et descendantes, capables de rétablir des synapses fonctionnelles comme l'a montré la restauration de leur activité électrophysiologique (Suzuki et coll., 2002). Les

hydrogels d'alginate permettent également de réduire la taille de la cicatrice gliale (Kataoka et coll., 2001). En collaboration avec le laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire de Nancy (LCPM), impliqué dans la synthèse d'hydrogels de hyaluronane pour la réparation du cartilage (Pelletier et coll., 2001; Dausse et coll., 2003; Galois et coll., 2004; Gerard et coll., 2005; Huin-Amargier et coll., 2006), nous avons essayé de développer de nouveaux biomatériaux susceptibles d'être implantés dans notre modèle de lésion cérébrale. Deux types d'hydrogels d'alginate ont été synthétisés, présentant les avantages majeurs d'être associatifs (l'absence de liaisons covalentes entre les chaînes d'alginate leur permettant une grande souplesse de structuration et déstructuration), rhéofluidifiants (c'est-à-dire devenant liquide sous contrainte mécanique) et thixotropes (retrouvant au repos leur consistance de gel). Facilement injectables, ces hydrogels ont fait l'objet d'une étude conjointe entre nos deux laboratoires pour les optimiser, à la fois sur le plan physico-chimique, grâce au travail de thèse de Frédéric Vallée (Synthèse et caractérisation d'un hydrogel d'alginate pour la régénération de voies nerveuses lésées au sein du SNC chez le Rat, 2007) et sur le plan de leur application *in vivo*, au cours de mon projet de recherche. J'ai d'ailleurs participé à la synthèse des deux hydrogels utilisés pour ces études.

Nous avons également utilisé du Matrigel™ (BD Biosciences), un gel commercial généralement utilisé comme support tridimensionnel de croissance cellulaire. Obtenu à partir de cellules tumorales de Souris, ce mélange complexe de protéines gélatineuses, imitant la MEC, a la propriété d'être liquide à des températures inférieures à 4°C, et de se gélifier rapidement au dessus de ce point. Jamais utilisé, à notre connaissance, pour des applications cérébrales, le Matrigel a été implanté en tant que pont de régénération dans le cadre de lésions médullaires chez le Rat. Rigidifié par une gaine de poly(acrylonitrile-co-vinyl chloride) (PAN/PVC) et enrichi en cellules de Schwann (cellules productrices de myéline dans le SNC), le Matrigel™ a pu être colonisé par des axones myélinisés, des vaisseaux sanguins, des fibroblastes et des macrophages au cours du mois suivant son implantation (Xu et coll., 1995a; Xu et coll., 1995b; Flanagan et coll., 2002). La gaine de PAN/PVC induisant une forte réaction inflammatoire, un traitement aux glucocorticoïdes (méthylprednisolone) a dû être ajouté, permettant de réduire la taille de la cavité lésionnelle et d'augmenter le nombre d'axones présents dans le pont de

régénération (Chen et coll., 1996; Oudega et coll., 1997; Jones et Jones, 2000). Maintenu au froid et implanté par injection rapide, le Matrigel a été testé en tant que matrice permissive dans la dernière de nos expériences.

Comme nous avons pu le voir au cours de ce chapitre, la recherche et le développement, dans le domaine crucial de la restauration fonctionnelle au sein du SNC, occupent un champ très vaste. De nombreuses approches sont actuellement testées, s'appuyant sur l'une ou l'autre des cibles stratégiques faisant barrière aux processus de régénération des neurones centraux. Les résultats obtenus dans les différents domaines sont, dans leur ensemble, encourageants, mais les avancées thérapeutiques restent encore très limitées, notamment en ce qui concerne la réparation des structures cérébrales.

Dans ce cadre, nous avons choisi une approche nouvelle ; celle-ci consiste à combiner des traitements ciblant chacun un point stratégique, mais susceptibles de se potentialiser mutuellement en atténuant réciproquement leurs effets secondaires tout en renforçant leur potentiel global.

Ainsi, la combinaison d'aminoguanidine et de putrescine, jamais testée encore dans le SNC, nous a semblé particulièrement judicieuse. En effet, le large spectre d'action des polyamines, de la défense cellulaire à la stimulation de la neurogénèse, de l'organisation des microtubules à la stimulation de la transcription de facteurs neurotrophiques, donne à ces molécules un potentiel thérapeutique considérable, malheureusement inexploitable en raison d'un catabolisme en métabolites hautement toxiques. Pouvoir contourner cet obstacle majeur, et potentialiser du même coup la durée d'action des polyamines, à l'aide d'un composé facilement administrable, très bien toléré, et possédant par lui même des propriétés remarquables, nous a semblé un atout essentiel. En effet, l'aminoguanidine, en plus d'être un inhibiteur reconnu des polyamines oxydases, représente également un antioxydant, un bloqueur de la NOS inductible, un agent capable de limiter l'accumulation de produits de glycation avancée, et un composé déjà utilisé sur le plan clinique pour ses effets neuroprotecteurs puissants. Son association avec la putrescine pouvait donc se révéler particulièrement efficace.

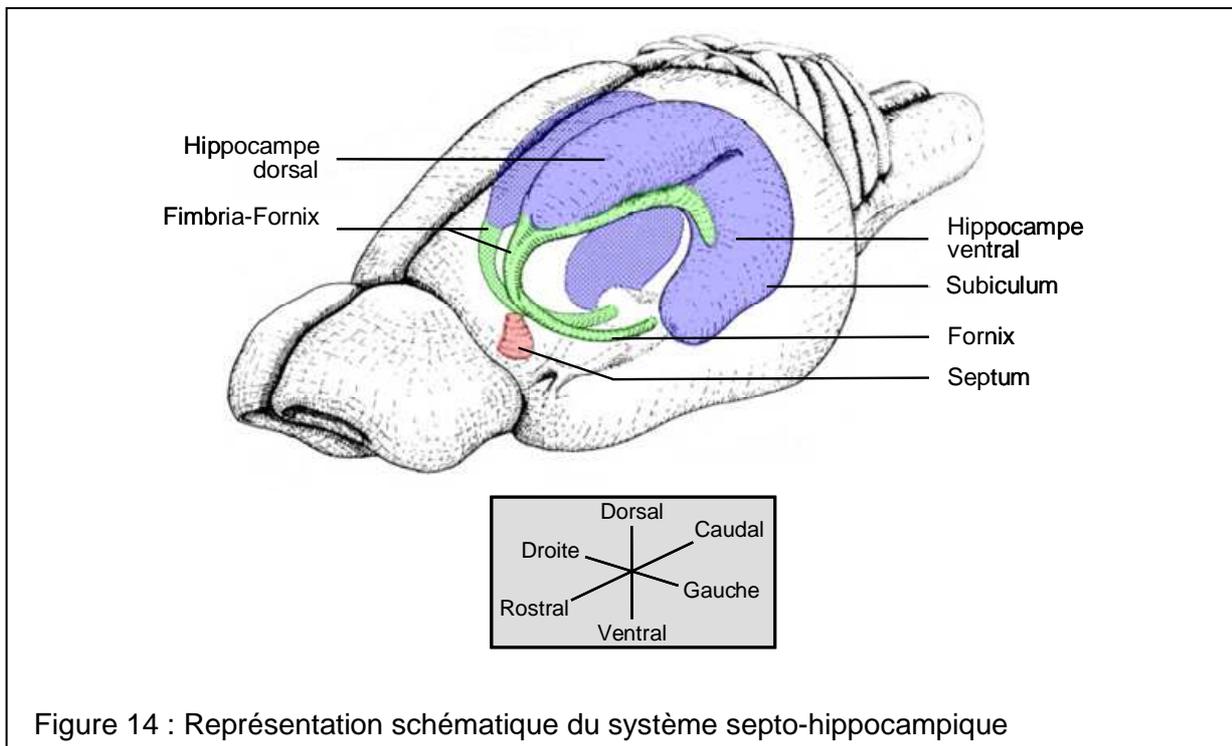
De la même façon, renforcer la production endogène de facteurs neurotrophiques par une stabulation des animaux dans un environnement enrichi, mimant les protocoles de réhabilitation fonctionnelle utilisés en clinique pour les patients souffrant d'une atteinte du SNC, nous a paru indispensable. A la condition de pouvoir prolonger la biodisponibilité et la durée d'action de ces facteurs directement au niveau de la région cible, à l'aide de composés hautement sélectifs pour les zones lésionnelles, les RGTAs, facteurs par ailleurs multipotents, impliqués dans de nombreux processus de régénération cellulaire et tissulaire, et potentiellement efficaces dans le cerveau.

Enfin, nous avons associé ces traitements, individualisés d'abord puis combinés, au comblement de la cavité lésionnelle par une matrice permissive, support matériel de croissance cellulaire, dont nous avons tenté d'optimiser la structure physico-chimique pour la rendre la plus compatible possible aux exigences du milieu cérébral.

III) Système septo-hippocampique : modèle de lésion

L'investigation des processus de régénération et de restauration fonctionnelle dans le SNC de rat adulte nécessite d'avoir un modèle lésionnel induisant des modifications comportementales et morphologiques bien caractérisées et durables. Nous avons choisi une lésion par aspiration de la Fimbria-Fornix, zone de passage des voies septo-hippocampiques dorsales. Cette lésion va créer une cavité entre deux structures fortement connectées, le septum médian (SM) et l'hippocampe, entraînant d'importants déficits comportementaux et cognitifs bien caractérisés au laboratoire (pour revue voir Cassel et coll., 1997) ainsi que dans la littérature scientifique. Ce type de lésion affecte également le corps calleux et des fractions du cortex moteur primaire et secondaire, ainsi qu'une partie du cortex somatosensoriel des pattes antérieures et postérieures et du tronc.

Ce chapitre abordera l'anatomie et le rôle fonctionnel du système septo-hippocampique, ainsi que les répercussions de sa déconnexion.



A) Le Septum

Le septum est une structure sous-corticale médiane qui, sur l'axe antéropostérieur, est limitée à l'avant par la *taenia tecta* (structure du bulbe olfactif) et en arrière par les commissures hippocampiques. Sur le plan coronal, il est situé sous

le corps calleux, entre les cornes antérieures des ventricules latéraux, et en position dorsale par rapport à la commissure antérieure.

Le septum est divisé en trois régions, latérale, médiane et postérieure. Celles-ci diffèrent par leur topologie, leur cytoarchitecture et leurs voies de projection et d'afférence (Swanson et Cowan, 1979). Nous focaliserons notre description sur la partie médiane, dont les neurones et les projections sont majoritairement affectés par la lésion.

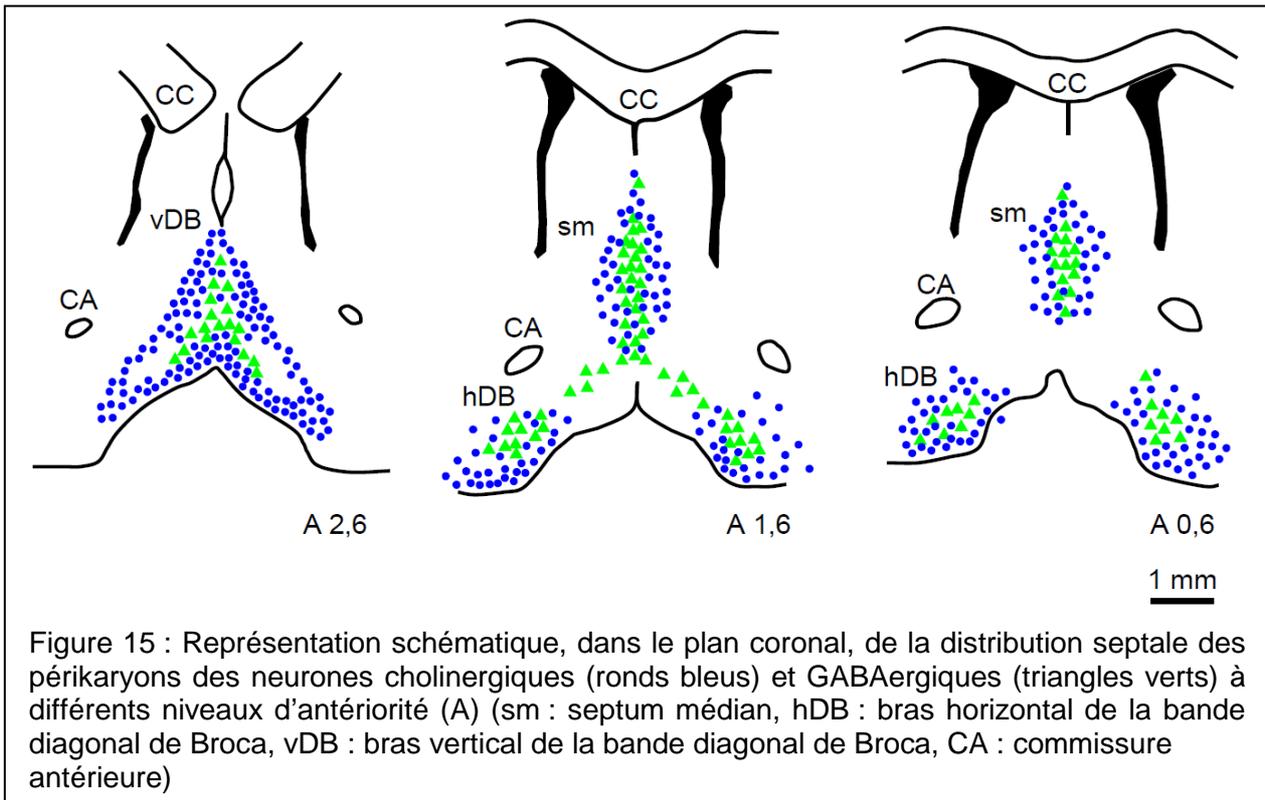
Cette région représente la plus petite et la plus ventrale des régions septales. Elle comprend, selon l'axe dorsoventral, le noyau du septum médian (SM) proprement dit, et les deux divisions de la bande diagonale de Broca, appelées respectivement bras vertical (vDB) et bras horizontal (hDB).

Cette région septale médiane (SM/vDB), qui connecte l'hippocampe par les voies septohippocampiques dorsales, est une structure hétérogène sur le plan neurochimique.

Le neurotransmetteur le plus abondant y est l'acétylcholine (ACh), trouvé dans des neurones distribués de manière rostromédiane et orientés verticalement (Figure 15) (Ichikawa et Hirata, 1986) ; leurs fibres se réunissent au niveau dorsal avant de rejoindre le fornix.

Les neurones GABAergiques constituent, en importance, la deuxième population (Costa et coll., 1983; Panula et coll., 1984). Ces neurones peuvent être divisés en deux sous-groupes selon la présence ou non de parvalbumine (Parv), une protéine de liaison du calcium (Freund, 1989). Les neurones GABAergiques dépourvus de Parv, disposés latéralement dans l'aire septale, sont des interneurones impliqués dans les circuits locaux (Brashear et coll., 1986; Freund, 1989), alors que les neurones exprimant la Parv, localisés près de la ligne médiane, sont des neurones de projection (Freund, 1989), notamment septo-hippocampiques (Kiss et coll., 1990) (Figure 15).

Le complexe SM/vDB contient également des neurones glutamatergiques (Carnes et coll., 1990; Sotty et coll., 2003). De nombreux neuropeptides, les plus abondants étant la galanine (Senut et coll., 1989) et le N-acétyl-aspartyl-glutamate (Forloni et coll., 1987), sont colocalisés dans certains neurones cholinergiques. Le VIP (Vasopressive intestinal peptide), les enképhalines, le CGRP (calcitonin gene related peptide), et la substance P sont également présents dans cette structure (pour revue Dutar et coll., 1995)



B) L'hippocampe

L'hippocampe est une structure télencéphalique de l'archéocortex, appartenant au système limbique. Il est localisé sous le cortex postérieur et le cortex temporal. Il peut être divisé en deux grandes sous parties, l'hippocampe dorsal et ventral. Je ne détaillerai que l'anatomie de l'hippocampe dorsal, majoritairement affecté par notre lésion.

L'hippocampe dorsal, chez les Mammifères, est constitué de deux structures distinctes, ayant chacune une forme de C dans le plan frontal, et qui s'imbriquent l'une dans l'autre : la corne d'Ammon et le gyrus denté (fascia dentata). La corne d'Ammon est subdivisée en trois aires appelées champs amoniques (CA1, CA2 et CA3). CA1 en constitue la région supérieure tandis que CA2 et CA3 en forment la région inférieure. Différentes couches composent ces champs (figure 16-B). La couche pyramidale contient les somas des cellules pyramidales glutamatergiques, dont l'axone quitte la structure hippocampique par l'alveus pour rejoindre le subiculum ou la fimbria avant d'atteindre le septum. Les dendrites apicales de ces cellules passent dans la *stratum radiatum* avant de s'étendre dans une couche moléculaire (*stratum lacunosum-moleculare*), où sont localisés des interneurons

cholinergiques (Frotscher, 1988). Les dendrites basales projettent dans la couche *stratum oriens*.

Le gyrus denté est constitué de trois couches : une couche de cellules granulaires glutamatergiques dont les péricaryons séparent une couche interne, le hile (ou couche polymorphe), et une couche externe dite couche moléculaire. Les axones des cellules granulaires convergent vers le hile, alors que leurs dendrites, rayonnant dans la couche moléculaire, reçoivent les afférences de différentes aires cérébrales, en particulier, du septum et du cortex entorhinal (Amaral et Witter, 1995; Daitz et Powell, 1954; Zimmer, 1971).

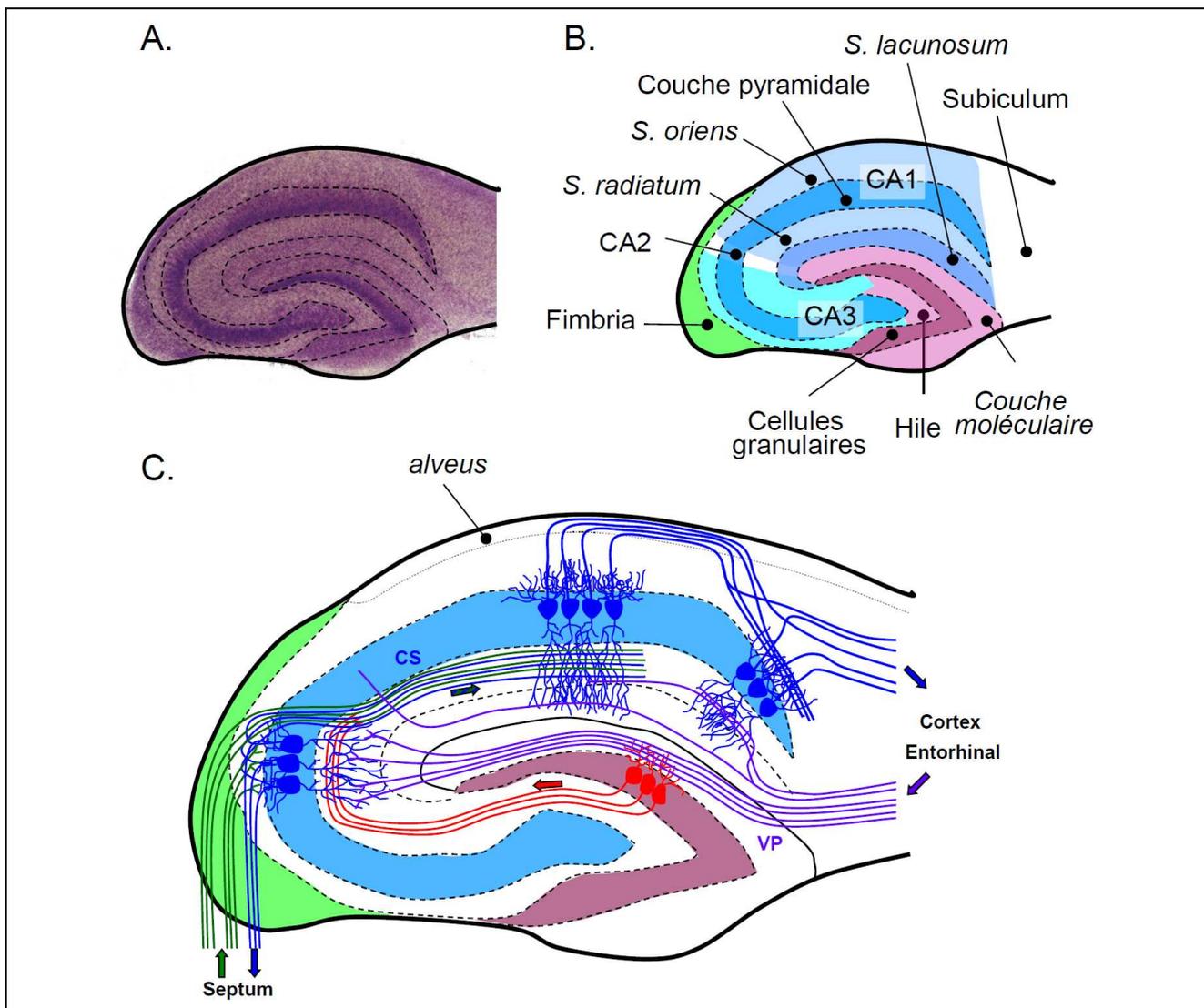


Figure 16 : Représentation schématique de l'organisation de l'Hippocampe dorsal. A : Coloration d'une coupe coronale au violet de crésyl (le plan coronal) B : Détails des différentes couches de l'hippocampe : en bleu les champs amoniques (CA), en violet le gyrus denté et en vert la fimbria. C : Représentation schématique des principales connexions ipsilatérales et internes à l'hippocampe. (S : *stratum* ; CS : collatérales de Schaffer ; VP : voies perforantes

C) Les projections septo-hippocampiques

Les projections SH comprennent, outre les fibres issues des neurones cholinergiques et GABAergiques du SM/vDB, des fibres sérotoninergiques issues de neurones localisés dans le noyau du raphé (B5 à B8, selon la nomenclature de (Dahlstrom et Fuxe, 1964), ainsi que des projections noradrénergiques provenant de la partie dorsale du locus cœruleus (A6) (Gage et coll., 1983a). Elles regroupent aussi des fibres peptidergiques, comme par exemple celles contenant de la galanine (Gage et coll., 1983a; Palkovits, 1984). Plus récemment, des projections provenant des neurones glutamatergiques septaux ont été également mises en évidence (Sotty et coll., 2003).

Ces projections empreintent 3 voies différentes :

- La voie septo-hippocampique dorsale supracalleuse (la voie cingulaire), composée des axones issus de la partie dorsolatérale du bras vertical de la bande diagonale de Broca.

- La voie septo-hippocampique dorsale infracalleuse (la Fimbria et le Fornix dorsal), qui contient la majorité de fibres issues du septum médian et de la partie ventromédiane du bras vertical de la bande diagonale de Broca. Cette voie n'est pas affectée par notre lésion.

- La voie ventrale, issue essentiellement de la bande diagonale de Broca (bras vertical et horizontal), qui traverse l'amygdale et le cortex entorhinal pour innover principalement l'hippocampe ventral et le subiculum.

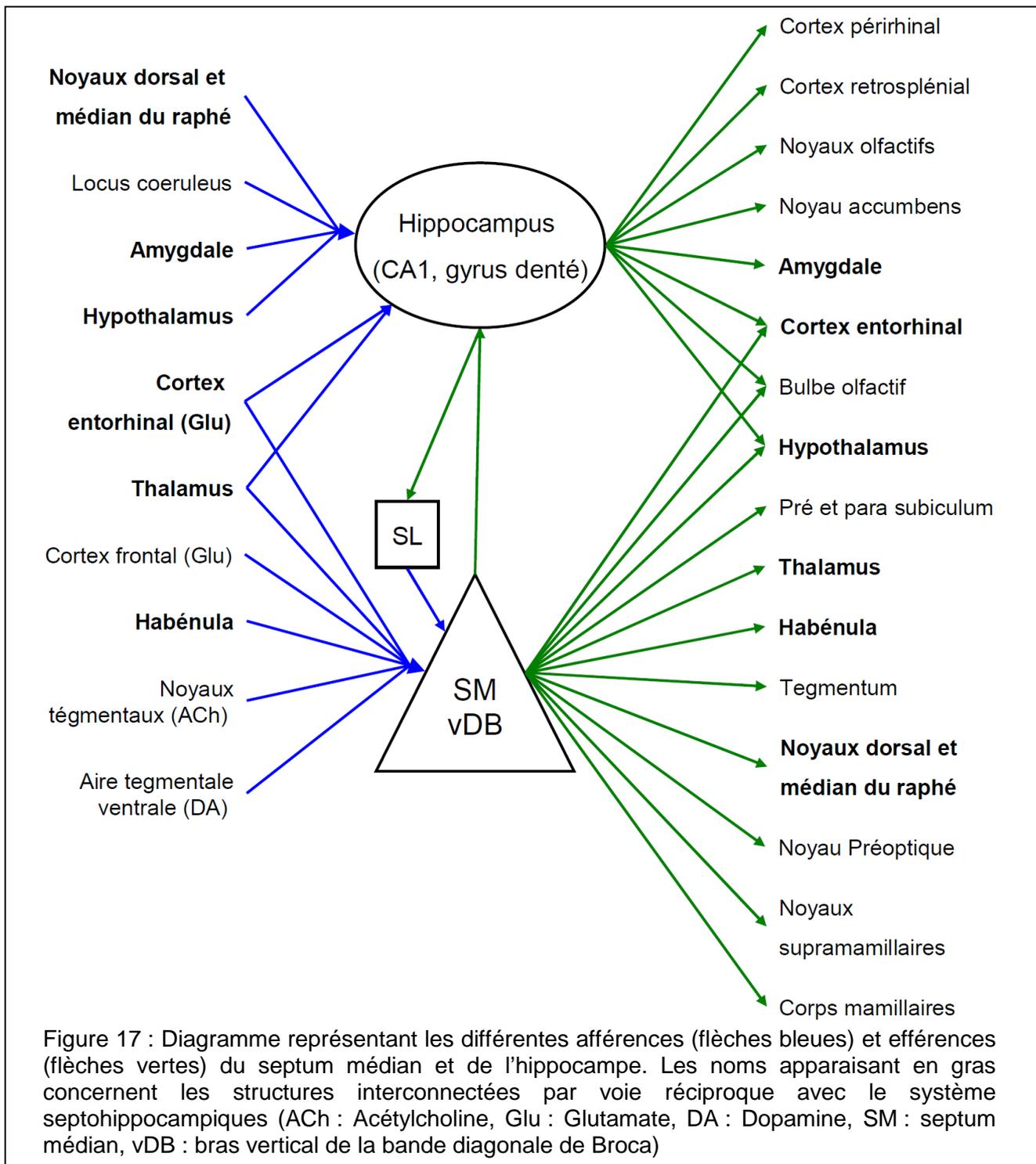
Près de 90% de l'innervation cholinergique de l'hippocampe provient des neurones localisés dans le septum médian (Ch1 selon la nomenclature de Mesulam et coll., 1983) et dans le bras vertical de la bande diagonale de Broca (Ch2 ; Peterson, 1994). Près de 55% de ces fibres passent par la voie Fifo, 30% par la voie cingulaire et 15% par la voie ventrale (Gage et coll., 1983b; Gage et Bjorklund, 1986; Cassel et coll., 1997).

Les neurones cholinergiques du SM/vDB projettent sur tous les types cellulaires majeurs de l'hippocampe dorsal : cellules pyramidales, cellules granulaires et interneurons inhibiteurs GABA (Leranth et Frotscher, 1987).

Les neurones GABAergiques septaux contenant de la parvalbumine,

projetent sur l'hippocampe (Kiss et coll., 1990), et font préférentiellement synapse avec les interneurons GABAergiques hippocampiques (Kohler et coll., 1984; Freund et Antal, 1988) inhibant les cellules pyramidales (Toth et coll., 1997).

D) Autres voies d'afférences et efférences du Septum et de l'Hippocampe dorsal



Le septum et l'hippocampe sont connectés à de nombreuses structures via leurs afférences (pour revue Amaral et Witter, 1989) et leurs efférences (Milner et coll., 1983).

Trois grands faisceaux de fibres convergent vers le septum

Au niveau dorsal, via la fimbria et le fornix, transitent, en plus des voies SHD, des fibres glutamatergiques issues des cortex entorhinal et frontal (Witter et coll., 1989). En retour, le complexe SM/vDB émet des projections vers le cortex entorhinal, et le pré- et le para-subiculum (Meibach et Siegel, 1977; Swanson et Cowan, 1979; Witter et coll., 1989).

Au niveau médian, via la strie médullaire du thalamus, le septum est interconnecté, par voies réciproques, avec le thalamus et l'habenula (Meibach et Siegel, 1977).

Au niveau ventral, via le faisceau du télencéphale, le septum est connecté à l'hypothalamus et au tronc cérébral. L'innervation cholinergique du septum provient du noyau tegmental, et son innervation dopaminergique de l'aire tegmentale ventrale. Les neurones cholinergiques septaux innervent le tegmentum, le raphé médian, l'hypothalamus, le noyau préoptique, le noyau supramillaire (Swanson et Cowan, 1979), les corps mamillaires et le bulbe olfactif (Meibach et Siegel, 1977; Aggleton et coll., 1995).

Ainsi, de par leurs afférences et efférences, le SM et la vDB constituent une région charnière dans le système limbique. Cette région intègre les informations relatives aux états émotionnels et motivationnels, ainsi que celles provenant du système autonome, véhiculées par les projections noradrénergiques issues du tronc cérébral et par les projections hypothalamiques. Elle les achemine ensuite vers l'hippocampe.

L'hippocampe est fortement lié au cortex entorhinal par un faisceau de fibres, les voies perforantes. Des projections, principalement issues de l'aire CA1, s'orientent également vers le cortex périrhinal, le cortex rétrosplénial, certaines parties du cortex frontal médian, et vers les noyaux olfactifs, le bulbe olfactif, l'amygdale et l'hypothalamus. Enfin, l'hippocampe émet des projections vers le septum latéral, qui projette à son tour sur le septum médian, pour constituer la boucle septo-hippocampo-septale.

L'hippocampe reçoit des afférences du cortex entorhinal, du locus coeruleus (Costa et coll., 1983), du raphé, de l'hypothalamus, du thalamus et de l'amygdale (Frotscher, 1991).

Ainsi, de par ses afférences et ses efférences, l'hippocampe occupe une position pivot lui permettant d'intégrer, par l'intermédiaire du cortex entorhinal, les informations relatives à l'environnement externe du sujet. Ces informations lui parviennent par l'intermédiaire de nombreuses aires corticales associatives et sensorielles. L'hippocampe peut ainsi être impliqué dans la formation de traces mnésiques variées et dans une multitude d'autres processus (Gray et McNaughton, 1983). L'hippocampe joue un rôle prédominant dans les processus mnésiques et plus particulièrement dans ceux se rapportant à l'orientation et à la mémoire spatiale (Tolman, 1948 ; O'Keefe et Nadel 1978). Il joue ainsi un rôle crucial dans l'intégration et le stockage des informations spatiales, qui aboutissent à la construction d'une représentation spatiale, appelée carte cognitive (O'Keefe et Nadel, 1978).

E) Répercussion d'une lésion des voies septo-hippocampiques dorsales

Le modèle de lésion des voies SHD entraîne des modifications anatomiques et comportementales, bien caractérisées au laboratoire, sur lesquelles nous nous sommes appuyés pour mettre en évidence les effets de nos stratégies thérapeutiques.

1) Répercussions anatomiques

Après lésion des voies SH dorsales, et donc axotomie, les neurones cholinergiques de l'aire septale ne dégèrent pas, mais ils cessent d'exprimer l'enzyme de synthèse de l'ACh, la choline acétyltransférase (ChAT). Comme l'ont montré Naumann et ses collaborateurs, dans un modèle de transection de la Fimbria-Fornix, l'expression de la ChAT peut réaugmenter, mais de façon modérée, plusieurs mois après la lésion (Naumann et coll., 1994a). Le même phénomène est observé avec la parvalbumine, synthétisée par les neurones GABAergiques (Kermer et coll., 1995).

La lésion des voies SHD prive l'hippocampe dorsal de nombreux neurotransmetteurs : ACh, GABA, Glutamate, Sérotonine et Noradrénaline. La perte la plus massive concerne l'ACh dont la concentration diminue de 80-90% dans l'hippocampe dorsal en corrélation avec une diminution de 70-90% de l'activité de son enzyme de dégradation, l'AChE (Cassel et coll., 1997). L'innervation sérotoninergique de l'hippocampe diminue de 20% par rapport à la normale, celle du GABA de 11% (Cassel et coll., 1997). En ce qui concerne la noradrénaline, les effets de la lésion sont limités puisque très peu de fibres noradrénergiques transitent par les voies SHD.

La désafférentation de l'hippocampe par lésion des voies SHD induit un bourgeonnement de collatérales issues des fibres cholinergiques, sérotoninergiques et noradrénergiques transitant par la voie septohippocampique ventrale. Ce bourgeonnement, dit homotypique (Gage et coll., 1983a), va coloniser l'hippocampe dorsal. Un bourgeonnement hétérotopique est également observé. Il implique les fibres orthosympathiques provenant du ganglion cervical supérieur (Crutcher et al 1987). Innervant initialement les vaisseaux sanguins parahippocampiques, ces fibres colonisent d'abord le lobe temporal de l'hippocampe, puis le hile du gyrus denté avant d'atteindre la couche de cellules pyramidales de CA3 (Crutcher et Davis, 1981; Crutcher, 1987).

2) Répercussions fonctionnelles

Après lésion des voies SHD, la première manifestation comportementale est le syndrome de « rage septale », où l'animal adopte des postures et des comportements d'attaque. En effet, ces comportements agressifs, qui sont gérés par l'hypothalamus, sont également modulés par l'hippocampe via la connexion septo-hypothalamique (Siegel et coll., 1997). Néanmoins, le syndrome septal s'atténue et disparaît spontanément 15 à 20 jours après la lésion, et parfois bien plus rapidement, voire n'apparaît pas pour des lésions relativement limitées.

Cette lésion induit cependant des altérations comportementales durables.

La plus spectaculaire concerne l'augmentation de l'activité locomotrice des animaux dans un milieu familier (cage d'élevage) ou dans un nouvel environnement (Gray et McNaughton, 1983; Cassel et coll., 1992; Cassel et coll., 1997). Selon O'keefe et Nadel (1979), le système septohippocampique n'est pourtant pas impliqué dans le contrôle direct des fonctions sensorimotrices. C'est l'interruption de la

connexion passant par le fornix, reliant l'hippocampe au noyau accumbens, structure impliquée dans la gestion de l'activité locomotrice, qui peut expliquer cette exacerbation (Whishaw et Mittleman, 1991).

Des déficits sensorimoteurs marqués peuvent également être observés. Ce handicap n'est cependant pas occasionné par l'interruption des voies SHD proprement dites, ainsi que l'on montré Hofferer et Cassel (1996) dans un modèle de lésion électrolytique, mais proviendrait de l'atteinte localisée du cortex moteur et somatosensoriel des membres postérieurs et du tronc entraînée par l'approche chirurgicale de la lésion par aspiration.

Les fonctions mnésiques, dépendantes de l'hippocampe, sont également profondément affectées par une lésion des voies SHD, ou la déplétion cholinergique de l'hippocampe.

Ainsi, les performances mnésiques à court terme (la mémoire de travail) et celles de mémoire à plus long terme (mémoire de référence) sont amoindries, que ce soit dans des tâches à caractère spatial, telles que le test de la piscine de Morris (Cassel et coll., 1992; Duconseille et coll., 2001; Lehmann et coll., 2002), ou dans une tâche d'apprentissage associatif, telle que le conditionnement de peur au contexte (Phillips et LeDoux, 1995).

D'autre part, la lésion entraîne également des comportements de persévération chez le Rat (Whishaw et Maaswinkel, 1998) qui se traduisent, dans la tâche du labyrinthe en T, par la revisite systématique de la branche précédemment visitée (Duconseille et coll., 2001; Lehmann et coll., 2002)

Le système septo-hippocampique est aussi impliqué dans la gestion des émotions telles que l'anxiété. L'hippocampe, le septum et l'amygdale forment, d'après Jeffrey Gray, un système activé dans les situations anxiogènes, qui génère une réponse complexe induisant une augmentation de l'attention et une inhibition comportementale (Gray, 1982). L'hippocampe et le septum, grâce à leurs afférences multiples, participent à l'analyse des informations sensorielles et la comparaison des données stockées en mémoire. Ainsi l'hippocampe intervient dans la genèse des prédictions et le septum dans l'inhibition comportementale (Gray, 1982; McNaughton et Gray, 2000). L'interruption du dialogue septo-hippocampique empêche ainsi la mise en place de l'inhibition comportementale, bloquant l'initiation d'un état anxieux :

la lésion des voies SHD a donc un effet anxiolytique (pour revue Menard et Treit, 1999; Menard et Treit, 2000; Degroot et Treit, 2004). De plus, l'atteinte localisée, entraînée par la lésion par aspiration, d'une partie cortex cingulaire et du cortex rétrosplénial, appartenant au système limbique, et intervenant dans la régulation des émotions, pourrait aggraver les déficits cognitifs observés (anxiété et mémoire).

Matériels et Méthodes

I) Animaux

Les études présentées dans ce travail ont été réalisées sur des rats mâles de la souche Long-Evans provenant du centre d'élevage R. Janvier (France). Le choix de cette souche a été motivé par le fait qu'elle est utilisée depuis longtemps au sein du laboratoire, mais aussi par certaines de ses caractéristiques physiologiques et physiques. Ces animaux possèdent notamment une très bonne capacité d'apprentissage et une vision normale, deux caractéristiques indispensables pour la réalisation de tests comportementaux impliquant, en particulier, la mémoire spatiale. Les rats utilisés sont âgés de 3 mois au moment des opérations chirurgicales. La maturité cérébrale des rats intervenant approximativement à l'âge de 30 jours, nos expériences ont donc toutes été menées sur des rats adultes.

Tous les protocoles impliquant les animaux et leur entretien sont menés en conformité avec les directives nationales (n°8748 du 19 octobre 1987, Ministère de l'agriculture) et internationales (NIH publication, n°82-23 version 85). Chaque expérimentateur titulaire possède une autorisation d'expérimenter individuelle délivrée par le ministère de l'Agriculture. (N° autorisation JC Cassel : 67-215 , S Schimchowitsch : 67-101, C Muller : 67-344)

II) Conditions d'élevage

Dès leur arrivée au laboratoire, les animaux sont placés dans des cages individuelles et gardés en animalerie pendant 7 jours sans aucune manipulation. Ils sont ensuite manipulés quelques minutes par jour pendant trois jours consécutifs, pour les familiariser avec l'expérimentateur.

Les pièces de l'animalerie, à température ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) et humidité ($50\% \pm 10\%$) contrôlées, sont éclairées selon un cycle de 12h (période éclairée 7h-19h) et maintenues sous ambiance sonore pendant la phase diurne. Les rats disposent d'eau et de nourriture *ad libitum*. Tous les tests comportementaux ont été réalisés pendant la phase diurne.

A) Elevage en milieu standard

Les rats sont placés seul sur une litière de sciure dans des cages transparentes en Makrolon (46 x 26 x 15 cm).

B) Elevage en milieu enrichi (EE)

Immédiatement après leur arrivée au laboratoire, les rats sont placés par cinq dans une grande cage standardisée. Après la lésion chirurgicale réalisée 10 jours après leur arrivée, les animaux sont placés individuellement dans des cages standardisées pendant les 5 jours de traitement et de surveillance post-chirurgicaux. Le sixième jour post opératoire commence l'élevage en milieu enrichi, tout d'abord uniquement pendant la période diurne, lorsque l'activité plus faible des animaux réduit les risques d'agression et de combats, puis, après une quinzaine de jours, en continu. Les animaux sont alors laissés en EE pendant 5 semaines avant d'être replacés dans des conditions standard.

Dans les conditions d'EE, les rats sont placés par 10 dans une grande cage grillagée (100 x 40 x 50 cm) contenant divers objets qui sont changés quotidiennement (jouets, échelles, tuyaux ...). Les dimensions spacieuses de la cage donnent aux rats une plus grande amplitude de déplacement et, par conséquent, les amènent à interagir avec leurs congénères et les objets lors de l'exploration de leur environnement. On considère que cet environnement, sans cesse modifié, est enrichi en stimulations physiques et sociales.



Figure 18 : Vue du dessus d'une moitié de cage de milieu enrichi

III) Opération chirurgicale et traitements

A) Préparation de l'animal et anesthésie

Le jour de l'opération, les rats sont pesés et anesthésiés avec une injection intrapéritonéale d'un mélange de xylazine (0,85 mg/kg, Rompun 2%, Bayer Pharma) et de kétamine (6,38 mg/kg, Imalgène 500, Merial). Après identification par marquage des oreilles et rasage du crâne, l'animal est placé dans un cadre stéréotaxique et enveloppé dans une couverture de survie. Les yeux sont recouverts d'une goutte de Lacrigel (Europhtha) pour éviter leur dessèchement, l'anesthésie s'accompagnant d'une exophtalmie prononcée.

B) Lésion par aspiration des voies septo-hippocampiques

Le scalp est incisé longitudinalement et dégagé afin de laisser apparaître la boîte crânienne et les repères anatomiques des sutures osseuses. Le crâne est ensuite fraisé entre Bregma -1,5mm et Bregma -2.2mm (coordonnées antéropostérieures), de part et d'autre de la suture centrale ($\pm 3,0$ mm coordonnées médiolaterales) pour ne pas léser le sinus veineux. Une double transsection, de part et d'autre du sinus veineux, est effectuée à l'aide d'une lame de scalpel, aux coordonnées antéropostérieures Bregma -1,6mm et Bregma -2,1mm, et dorsoventrale -5mm (par rapport à la surface du crâne), jusqu'à la limite médiolaterale de ± 3 mm déterminée par l'ouverture du volet crânien. Une pipette Pasteur incurvée, au bout de laquelle est collé un fragment de tube en verre de 5mm de long (microcaps), est connectée à une trompe à vide. L'aspiration est réalisée jusqu'à la profondeur de -5mm, éliminant le cortex, le corps calleux et les voies SHD sous-jacentes. Une gaze hémostatique est alors insérée dans la cavité (Surgicel, Johnson & Johnson) de manière à stopper le saignement provoqué par l'aspiration. Elle est retirée après quelques minutes. L'implantation de l'hydrogel pourra alors être réalisée chez les animaux bénéficiant de ce traitement. Pour les autres, le scalp est soigneusement suturé.

Toutes les opérations chirurgicales sont réalisées en conditions aseptiques. Une fois l'intervention terminée, les rats reçoivent une injection de 0,3 ml d'antibiotique (Extencilline® 2,4 M UI poudre pour solution injectable) en intramusculaire (IM) et une injection intrapéritonéale (IP) de 2 ml de NaCl stérile à

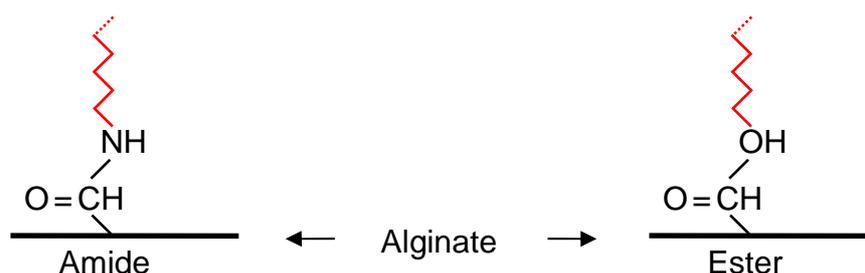
0,9% additionné de glucose à 5%. Les rats sont maintenus au chaud jusqu'à leur réveil afin d'éviter tout risque d'hypothermie lié à l'anesthésie, puis remis dans leur cage d'élevage.

Les rats pseudo-opérés (témoins) subissent toutes les étapes chirurgicales jusqu'au fraisage du crâne inclus, mais aucune lésion des tissus cérébraux n'est réalisée.

C) Synthèses, préparation et implantation des hydrogels d'alginate

Au cours de mon stage dans le laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire de Nancy, sous la direction de Michèle Léonard, deux hydrogels d'alginate de sodium (extrait de *Macrocystis pyrifera*, Alginic Acid, Sodium Salt, Medium Viscosity, Sigma-Aldrich) ont été synthétisés, selon des procédés différents.

Les propriétés physico-chimiques des gels d'alginate en milieu aqueux dépendent de leur masse molaire et de leur structure, c'est-à-dire de la proportion et de la distribution des motifs mannuroniques par rapport à celle des motifs guluroniques dans les chaînes d'alginate. Pour former une structure d'hydrogel, le squelette d'alginate doit être greffé par des chaînes d'alkyles en C₁₂. Nous avons testé deux méthodes de greffage, par motif ester (Hydrogel d'alginate ester ; synthèse décrite dans la figure 19) et par motif amide (Hydrogel d'alginamide ; synthèse décrite dans la figure 20).



Les chaînes alkyles greffées sur le squelette d'alginate confèrent aux polymères des propriétés remarquables ; en effet leurs interactions électrostatiques, non-covalentes, permettent d'obtenir des gels associatifs rhéofluidifiants (devenant liquide sous contrainte mécanique) et thixotropes (retrouvant au repos leur consistance de gel).

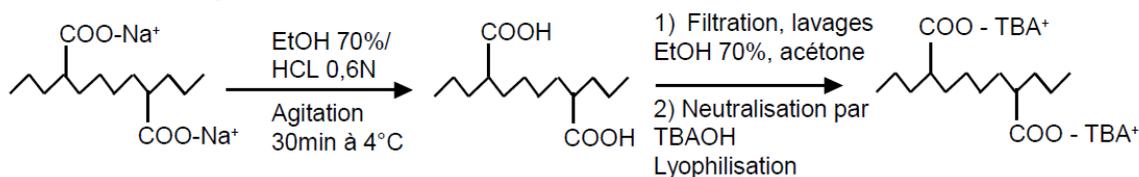
1) Préparation des biomatériaux

Avant utilisation, chaque polymère est stérilisé à sec par exposition aux ultraviolets (254nm) pendant 45 min. Il est ensuite dissout, à 20 g/L, dans du NaCl stérile 0,9%. Après une faible agitation mécanique de 24h, le mélange est centrifugé 30 min à 5000 tour/min pour éliminer les bulles d'air. L'hydrogel, fluide sous contrainte mécanique, est introduit dans une seringue par aspiration lente.

L'hydrogel est injecté de façon bilatérale pour combler la cavité lésionnelle (ordre de volume de 17 mm³). Après quelques minutes, le scalp est suturé.

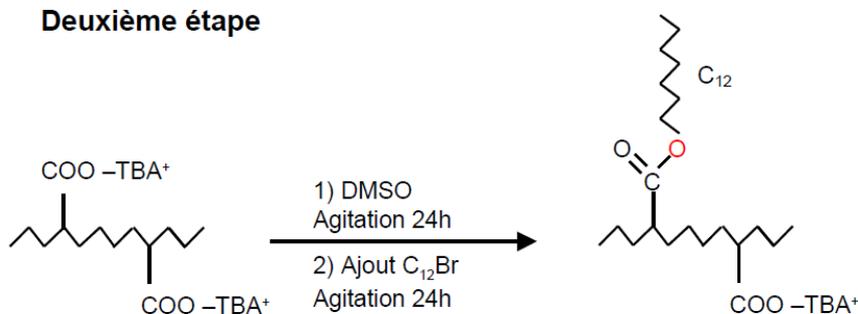
Synthèse Alginate Ester

Première étape



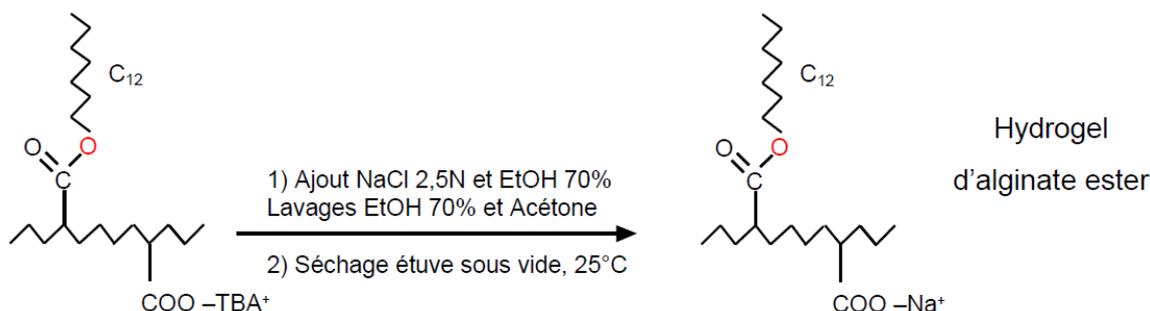
Le polysaccharide (5g) est obtenu sous forme acide par échange cationique en milieu hétérogène dans un mélange éthanol 70% / HCl 12N (95ml / 5ml), à 4 °C, pendant 1/2h. Après filtration (filtre borosilicate n°4), l'alginate sous forme acide est lavé avec l'éthanol 70% (500 ml) jusqu'à l'élimination complète du chlorure de sodium formé au cours de la réaction (vérification par test AgNO_3 0,1N sur les solutions de lavage), puis finalement lavé à l'acétone (300 ml). Après séchage sous vide à température ambiante pendant 2h, l'alginate résultant est mis en suspension dans 500 ml d'eau et neutralisé par une solution d'hydroxyde de tétrabutylammonium 0,15M jusqu'à pH 7, puis lyophilisé.

Deuxième étape



L'alginate sous forme de sel de tétrabutylammonium est dissous dans le DMSO (1% en masse) à l'aide d'une agitation magnétique, à température ambiante, pendant 24h. Puis, le dérivé bromé $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{Br}$ est ajouté pour obtenir le taux de fixation recherché. La réaction se fait sous agitation magnétique, à température ambiante, pendant 24h.

Troisième étape



Une solution de NaCl 2,5N (12,8% en volume) est ajoutée au mélange réactionnel, soumis à une forte agitation à l'aide d'un ultra-turrax (5000 rpm, 5 minutes). Afin de favoriser l'échange entre ions TBA^+ et Na^+ , le mélange est laissé sous agitation pendant 1 heure puis il est versé dans l'éthanol 70% (80% en volume) pour précipiter l'alginate de Na modifié. L'ensemble est soumis à l'action de l'ultra-turrax (5000 rpm, 15 minutes). Après filtration (filtre borosilicate n°4), l'alginate modifié est lavé avec de l'éthanol 70% jusqu'à l'élimination complète du chlorure de sodium en excès et finalement lavé à l'acétone. Après séchage sous vide à température ambiante pendant 3 jours, le dérivé final est stocké à 4°C.

Figure 19 : Synthèse de l'Alginate Ester (d'après la thèse de Frédéric Vallée)

Synthèse Alginate Amide

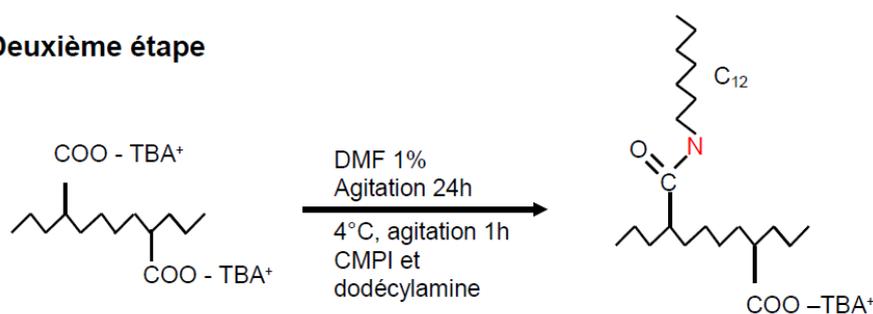
La synthèse des dérivés alginamides met en jeu la réaction entre les fonctions carboxylate de l'alginate et une amine primaire qui formera les greffons, la dodécylamine dans notre cas, par l'intermédiaire d'un agent de couplage. L'agent de couplage permet d'activer les fonctions carboxylate de l'alginate en formant un ester actif susceptible de réagir rapidement sur la fonction amine. En nous référant à des résultats déjà décrits dans la littérature, deux voies de synthèse, l'une en milieu organique et l'autre en milieu aqueux tamponné, ont été successivement envisagées en utilisant deux agents de couplage: l'iodure de 2-chloro-1-méthylpyridinium (CMPI)(Fulka), réactif organosoluble et chlorhydrate de 1-éthyl(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide (EDC)(Sigma-Aldrich), carbodiimide hydrosoluble.

Le protocole de synthèse des alginates amphiphiles utilisant le CMPI pour former l'intermédiaire réactif est inspiré des travaux de Barbucci et Coll. [Barbucci, 2000, 2002, 2004]. Ces auteurs décrivent la synthèse de nouveaux gels d'alginate ou de hyaluronate, obtenus par réticulation chimique des chaînes de polysaccharides au moyen d'une diamine (le 1,3-diaminopropane), dans la diméthylformamide (DMF). D'après les auteurs, la diamine réagit par ses deux extrémités sur les fonctions carboxylate préalablement activées par le CMPI pour former une réticulation chimique.

Première étape

Cette étape est identique à la première étape de la synthèse d'alginate ester

Deuxième étape



L'alginate sous forme de sel de tétrabutylammonium (2 g) est dissous dans la DMF (1% w/v) à l'aide d'une agitation mécanique à température ambiante pendant 24h dans un réacteur. Le réacteur est mis dans la glace, 45 minutes, avant ajout des réactifs (CMPI et de dodécylamine). La dodécylamine est dissoute dans un volume de 100 ml de DMF et laissée sous agitation magnétique pendant une heure, puis la quantité de triéthylamine nécessaire (ratio molaire identique à celui de la dodécylamine) est ajoutée à cette solution de dodécylamine. La quantité de CMPI nécessaire selon le taux de greffage attendu est ensuite dissoute dans un volume de 50 ml de DMF. Ces solutions de CMPI et de dodécylamine sont placées 1h dans la glace puis ajoutées simultanément à la solution d'alginate-TBA. On veille à laisser le réacteur de nouveau 45 minutes dans la glace après ajout des réactifs. Le mélange réactionnel est ensuite maintenu sous agitation mécanique, à température ambiante (25°C) pendant 24h.

Troisième étape: identique

Cette étape est identique à la troisième étape de la synthèse d'alginate ester

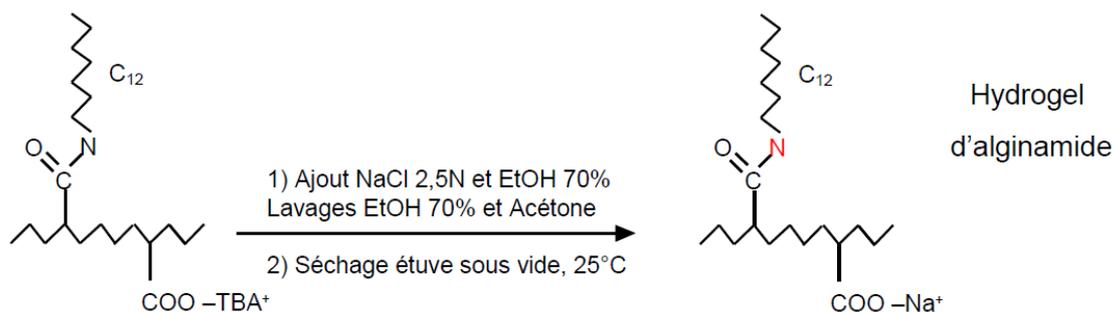


Figure 20 : Synthèse de l'Alginate Amide (d'après la thèse de Frédéric Vallée)

D) Administration de RGTAs

Immédiatement après la lésion, les RGTAs (OTR3, Paris, France), dilués dans du NaCl 0,9%, sont administrés en IM à raison de 1,5 mg/kg.

E) Administration d'Aminoguanidine et Putrescine (traitement à l'AGP)

Le traitement pharmacologique AGP consiste en une injection intrapéritonéale quotidienne, pendant cinq jours, d'un mélange de Putrescine (10mg/kg) et d'Aminoguanidine (320mg/kg), dilués dans une solution de NaCl 0,9 %. La première injection est réalisée dès les premiers signes de fin d'anesthésie, afin de limiter l'interaction, observée létale, entre les composés pharmacologiques et l'anesthésique. Nous avons pu noter la formation d'un précipité lorsque les différents composés sont mélangés dans un tube à essai.

IV) Tests comportementaux

A) Activité locomotrice en cage familière

Ce test permet d'enregistrer l'activité locomotrice spontanée du rat dans sa cage d'élevage. Pour cela, les cages sont disposées entre deux cellules photoélectriques A et B), situées à 2cm du sol et à 4cm de chacune des extrémités de la cage. Ces deux cellules sont reliées à un ordinateur qui enregistre le nombre de passages effectués par le rat d'un bout à l'autre de sa cage, indiqué par le nombre de coupures successives (A puis B ou B puis A) des faisceaux de lumière infrarouge localisés sur les capteurs A et B.

L'activité globale des rats est ainsi enregistrée en continu pendant 23h, et répartie en trois périodes, 8h diurnes, 12h nocturnes et 3h diurnes. L'actographie a été effectuée pour chaque animal, d'une part avant l'opération chirurgicale, puis à différents stades post-lésionnels.

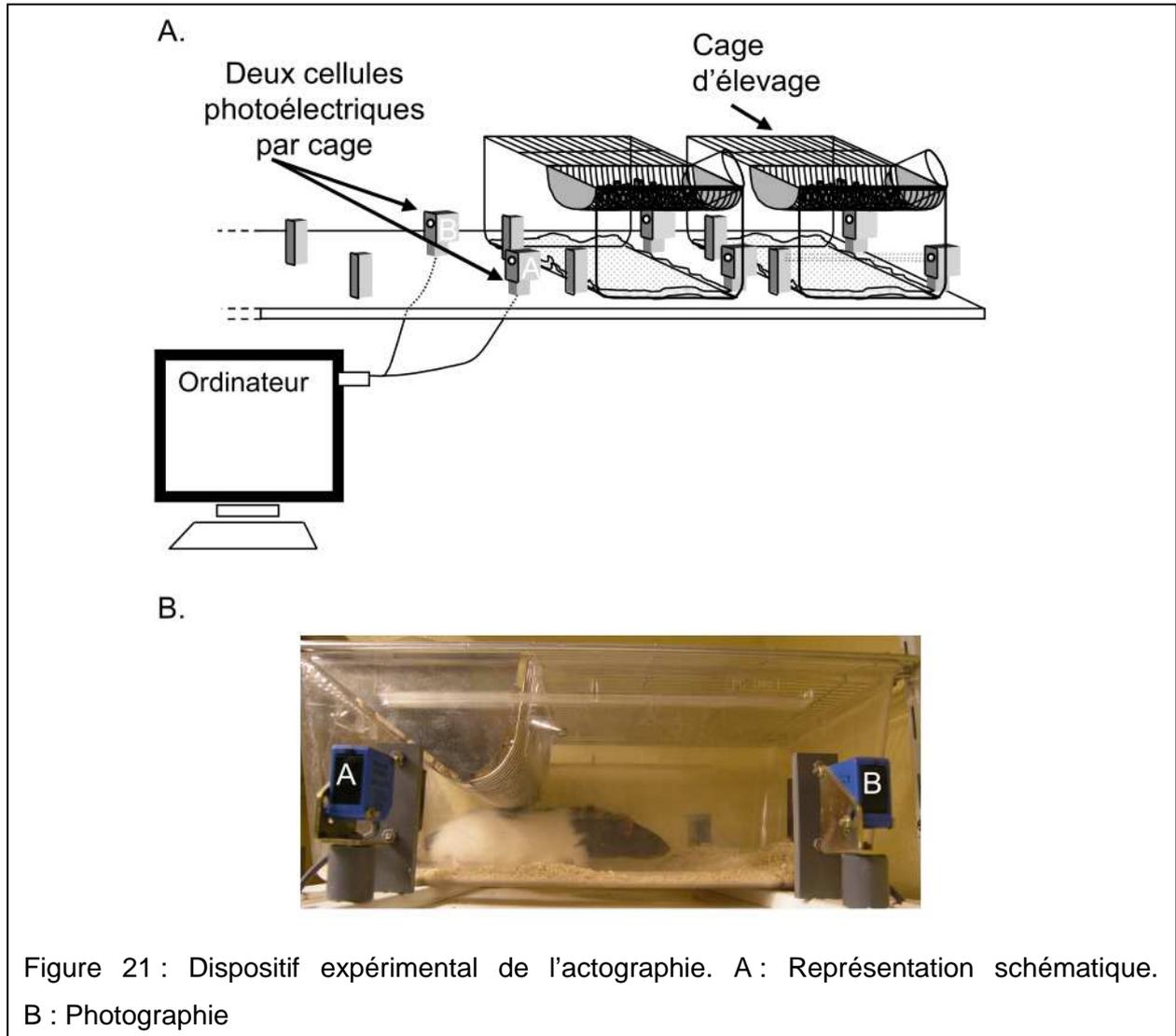


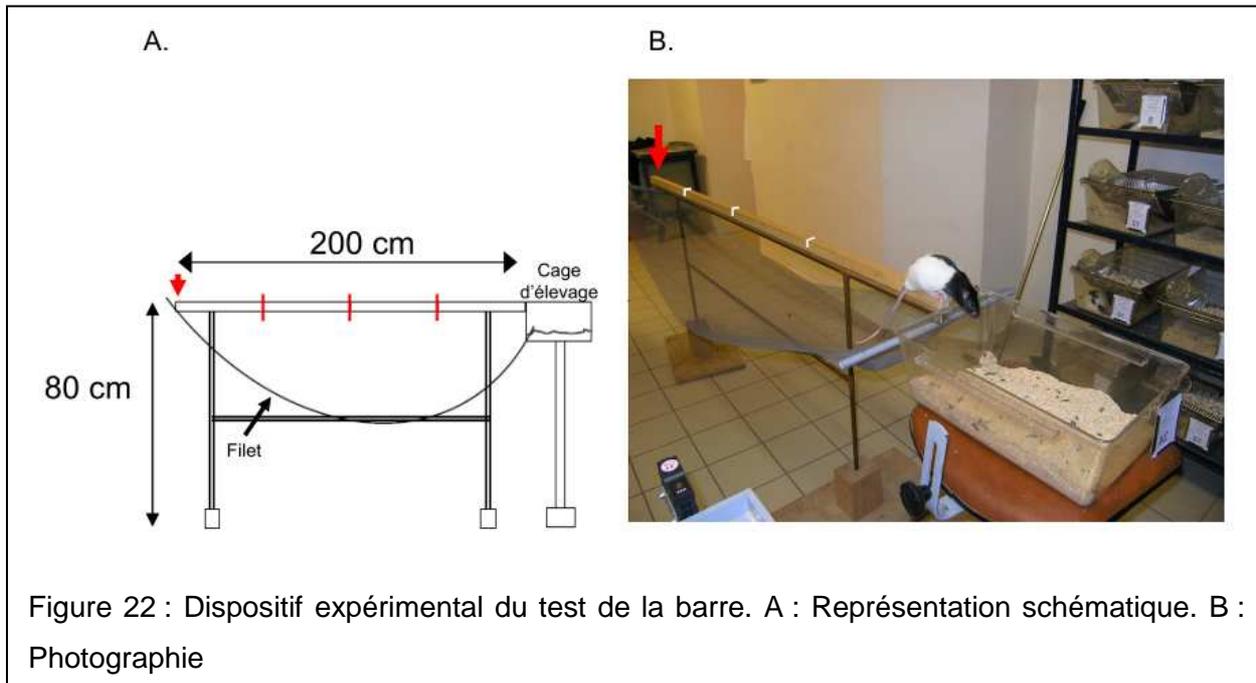
Figure 21 : Dispositif expérimental de l'actographie. A : Représentation schématique. B : Photographie

B) Test du franchissement de la barre

1) Dispositif expérimental

Ce test permet d'apprécier les capacités de coordination sensori-motrice des rats.

Le dispositif consiste en une barre en bois (longueur 200cm, largeur 2,4cm) placée à 80cm du sol et sous-divisée en quatre segments de 50cm. La barre est éclairée par un néon fixé parallèlement à celle-ci et situé à 2m au-dessus du sol. L'animal, déposé à une extrémité, doit se déplacer sur cette barre, pour rejoindre sa cage d'élevage placée à l'autre extrémité. Un filet est placé sous le dispositif afin de rattraper les animaux en cas de chute.



2) Protocole

La session de test comprend 4 jours d'apprentissage, au cours desquels les rats sont familiarisés avec la tâche par des distances à parcourir de plus en plus longues, partant de 50cm (un segment) le premier jour pour atteindre la totalité de la barre (200cm, 4 segments) le quatrième jour.

Le cinquième jour, les performances sont évaluées lors de 3 passages consécutifs sur la barre. Un point est attribué à chacun des segments correctement franchi (pattes posées sur la barre, sans dérapage et sans agrippement latéral). A l'issue des trois essais, chaque animal se voit donc attribuer une note, sur un score maximal de 12 points.

Le test a été réalisé avant l'opération chirurgicale, pour servir de référence, et a été répété à différents stades post-lésionnels pour suivre la récupération sensori-motrice des animaux. Dans ce contexte, la phase d'entraînement de 4 jours, avant évaluation, comprenait 3 parcours quotidiens de la barre.

La prise de poids des animaux, et notamment des pseudo-opérés, liée au vieillissement, provoquant une diminution progressive des performances, nous avons élargi la barre à 5cm lorsque le poids moyen du groupe témoin a dépassé 450g.

C) Piscine de Morris

Ce test a été conçu par Richard Morris (1984) pour évaluer les capacités à mémoriser et à gérer de l'information spatiale dans une situation peu agréable pour

le rat. L'animal doit échapper à une situation aversive (l'eau froide) en se réfugiant sur une plate-forme invisible. Pour cela, il doit se forger et utiliser une représentation de son environnement en se basant sur les indices spatiaux disponibles. Cette représentation est dite allocentrique. La piscine de Morris est l'un des tests les plus utilisés, et de nombreux protocoles ont été développés pour évaluer différentes composantes de la mémoire (mémoire de référence, mémoire de travail), ou déceler les stratégies utilisées par les animaux pour se repérer dans l'espace (stratégie allocentrique ou égocentrique). Compte tenu des déficits lourds entraînés par le modèle de lésion choisi, nous avons utilisé une version simplifiée du test, la plate-forme étant maintenue au même endroit tout au long de l'expérience, et focalisé notre attention sur la mémoire spatiale de référence. La mémoire de référence se rapproche d'une mémoire à long terme dans laquelle seraient stockées des règles générales, des items dépendants du contexte, ou encore des procédures caractéristiques d'une situation donnée. Ces règles, items et procédures restent valables pour cette même situation toutes les fois où que le rat y est confronté.

1) Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental du test de la piscine de Morris est constitué d'une enceinte circulaire en plastique blanc de 160 cm de diamètre et de 60 cm de hauteur, remplie à mi-hauteur d'eau à 20°C. L'eau est rendue opaque par adjonction de lait en poudre. La plate-forme, constituée d'un cylindre (11cm de diamètre) en plastique transparent, est immergée à 1cm sous la surface afin d'être invisible pour l'animal. La piscine est située dans une pièce comportant différents indices distaux (étagères avec les cages, tuyaux peints, ventilation, formes géométriques ...) susceptibles de permettre à l'animal de se repérer dans l'enceinte et de mémoriser la position de la plate-forme par rapport à un cadre de référence allocentrique. La tâche du rat est d'apprendre à rejoindre la plate-forme le plus directement possible. Le trajet effectué par l'animal est filmé à l'aide d'une caméra vidéo, qui transmet l'image à un moniteur. Le dispositif est relié à un ordinateur qui digitalise le trajet et calcule différentes variables dépendantes, telles que la distance parcourue, la latence, la vitesse, dans les secteurs d'intérêts.

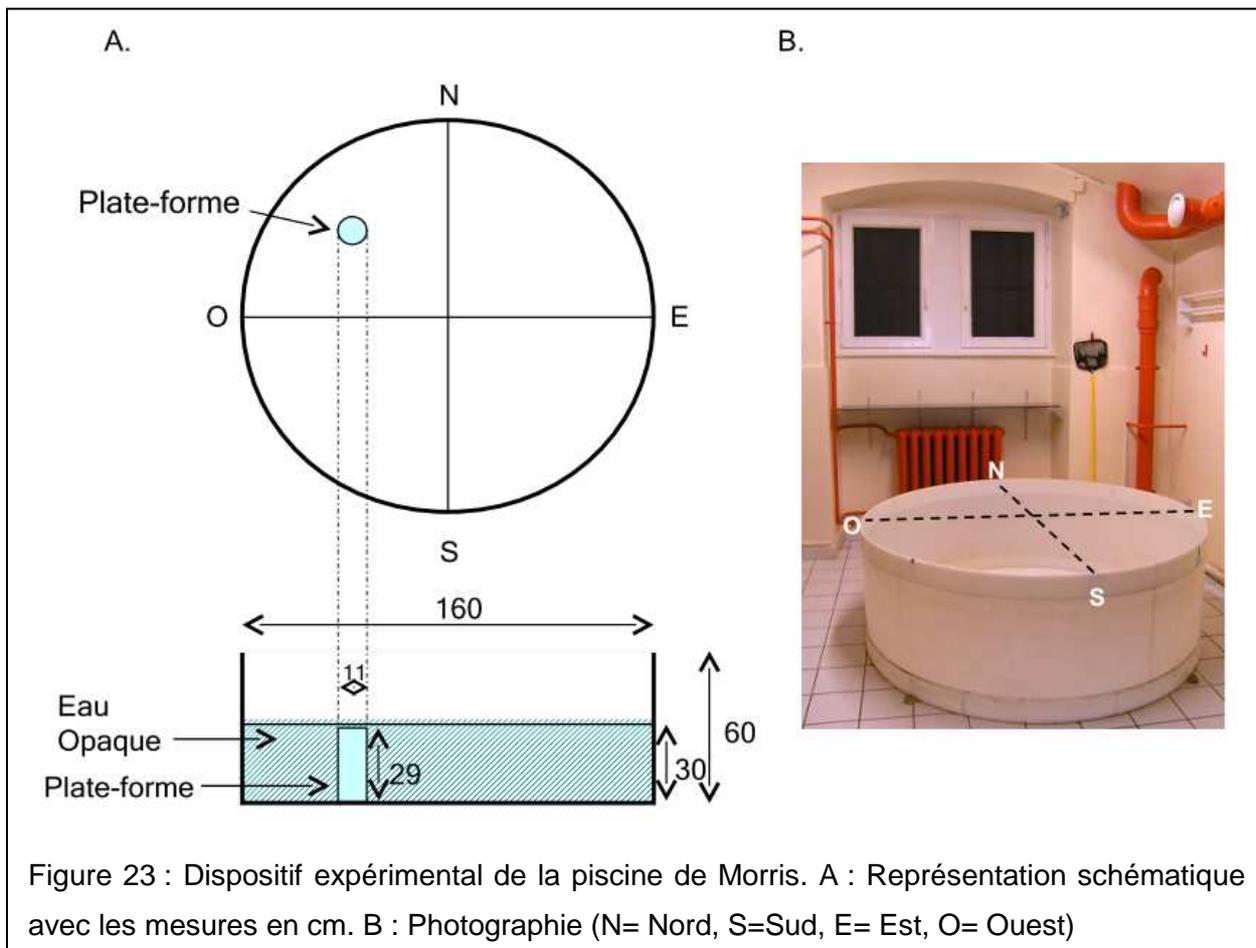


Figure 23 : Dispositif expérimental de la piscine de Morris. A : Représentation schématique avec les mesures en cm. B : Photographie (N= Nord, S=Sud, E= Est, O= Ouest)

2) Protocole

Le test se déroule sur sept jours consécutifs au cours desquels la position de la plate-forme, localisée dans un des cadrans virtuels de l'enceinte, reste inchangée. Les trois premiers jours, les animaux sont entraînés à retrouver la plate-forme visible, émergeant d'1 cm au dessus de la surface de l'eau, afin d'évaluer leur performance de visuo-guidage; les quatre jours suivants, les animaux doivent retrouver la plate-forme cachée. Une séance quotidienne est constituée de quatre essais consécutifs, les points de lâcher de l'animal dans la piscine variant d'un essai à l'autre. L'essai débute quand l'animal est déposé dans le bassin, face à la paroi, et s'arrête lorsque le rat a rejoint la plate-forme, sur laquelle il est laissé pendant dix secondes avant de passer à l'essai suivant. Si le rat ne trouve pas la plate-forme au bout de soixante secondes, l'essai est terminé et l'expérimentateur place l'animal sur la plate-forme pour dix secondes. Le septième jour, le rat réalise en plus un test de rappel, 5 minutes après le dernier essai d'acquisition. La plate-forme est alors retirée du bassin et les déplacements de l'animal (notamment dans le cadran cible) sont enregistrés pendant 60 secondes. A l'issue des essais, le rat est séché dans une

serviette éponge et remis dans sa cage.

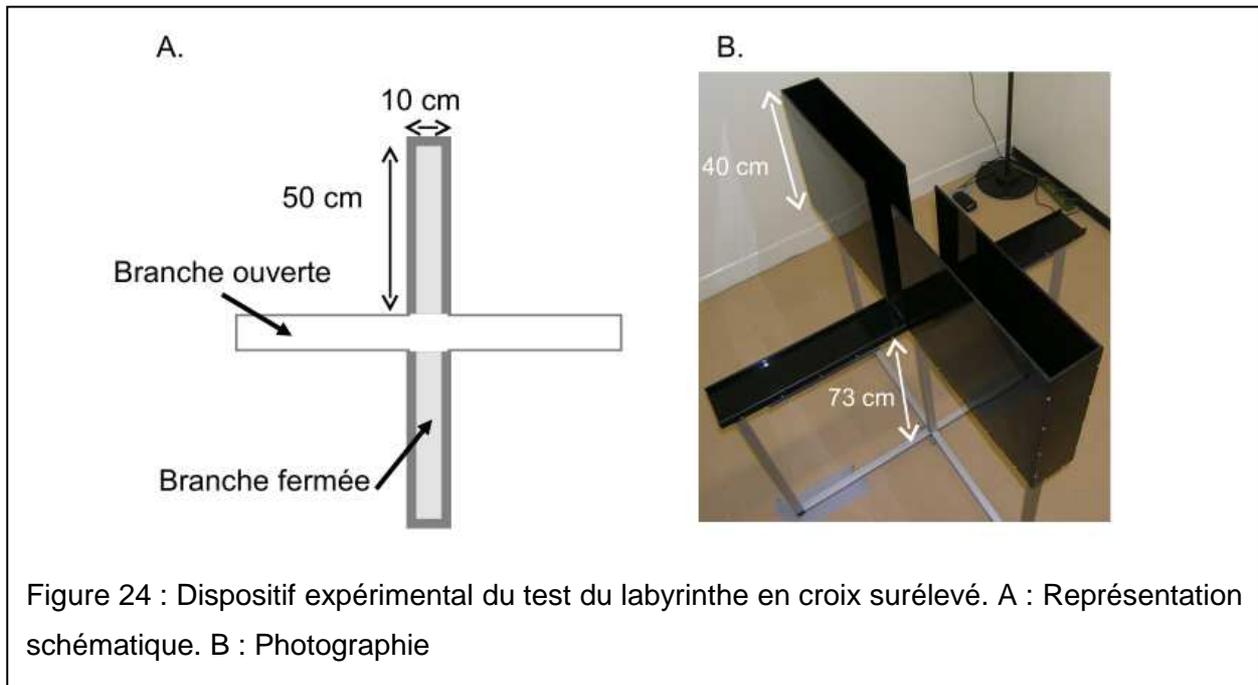
A partir du temps passé dans chaque quadrant de la piscine lors de l'essai sans plate-forme, nous avons calculé un indice de rétention qui consiste à diviser le temps passé dans le quadrant cible (celui qui contenait la plate-forme) par la moyenne du temps passé dans les trois autres quadrants. Ainsi, plus le rat passe de temps dans le quadrant cible, plus l'indice est élevé, alors qu'un indice proche de 1 indique que l'absence de recherche privilégiée de la plate-forme dans le quadrant cible.

D) Labyrinthe en croix surélevé

Ce test a été développé par Sharon Pellow (1985) pour évaluer le niveau d'anxiété des rongeurs. L'animal évolue librement pendant un laps de temps prédéfini dans les quatre branches du labyrinthe ; il peut visiter deux type de branche, les branches avec paroi (branche fermée) ou les branches sans paroi (branche ouverte).

1) Dispositif expérimental

Le labyrinthe en croix, en plexiglas noir, est constitué de quatre branches perpendiculaires (50cm de long x 10cm de large) fixées à une plate-forme centrale (10 x 10cm). Deux branches opposées sont bordées de parois opaques de 40cm de haut (branches fermées), les deux autres étant cernées de bordures de 1,5cm de haut (branches ouvertes). Le labyrinthe, surélevé à 73cm du sol, est placé dans une pièce de 2 x 3m. L'autre partie de la pièce, séparée par une paroi de contre-plaqué, est équipée d'un écran de contrôle connecté à un système informatique d'enregistrement des données, tous deux reliés à une caméra positionnée verticalement au dessus du labyrinthe. L'intensité lumineuse peut-être modulée au moyen de 4 lampes halogènes, placées autour du labyrinthe de telle sorte qu'elles forment un angle de 45° avec les branches et qu'elles soient localisées à la même distance de la plate-forme centrale. Elle est ajustée pour être identique à l'extrémité de chaque branche ouverte et fixée à 10 lux.



2) Protocole

Cinq minutes avant le test, le rat est placé dans une cage similaire à sa cage d'élevage, mais entièrement vide (sans sciure, ni nourriture, ni eau), dans laquelle il est transporté jusqu'à la salle d'expérimentation. L'essai débute lorsque l'animal est placé sur la plate-forme centrale, la tête dirigée vers une branche fermée (la même pour tous les rats). L'essai dure cinq minutes. Le labyrinthe est nettoyé avec une solution de vinaigre de cidre à 2% après le passage de chaque animal et le nombre de fèces dans la cage vide et dans le labyrinthe est relevé. L'expérimentateur, placé devant l'écran de contrôle, code, sur le clavier de l'ordinateur, chaque passage de l'animal dans les différentes branches et la plate-forme centrale (une entrée est comptabilisée lorsque le rat a les quatre pattes dans la section correspondante). Le logiciel informatique permet de déterminer le temps passé et le nombre d'entrées dans chaque partie du dispositif. Les variables dépendantes recueillies sont le nombre d'entrées dans les branches fermées (E_f), dans les branches ouvertes (E_o), le nombre de passages sur la plate-forme centrale (E_c), ainsi que le temps passé dans les branches fermées (T_f), dans les branches ouvertes (T_o), et au centre (T_c). Ces variables permettent le calcul du pourcentage d'entrées dans les branches fermées ($\% \text{ entrées} = E_f \times 100 / [E_o + E_f]$). Ces pourcentages permettent d'obtenir un indice d'anxiété de l'animal. Le nombre d'entrées et le temps passé dans la zone de la plate-forme centrale sont également considérés comme un reflet de certaines caractéristiques de l'anxiété du Rat. Le nombre d'entrées dans toutes les branches

et le nombre d'entrées dans les branches fermées sont considérés comme des indices de l'activité locomotrice.

E) Labyrinthe en T

Ce test, développé par Blodgett et McCutchen (1948), permet d'évaluer le comportement d'alternance des animaux. Ce comportement est défini comme la tendance qu'un rat présente spontanément, lorsqu'il est confronté à un labyrinthe à deux branches (en forme de T), à ne pas retourner dans la branche visitée au cours d'un premier passage, mais à visiter l'autre branche.

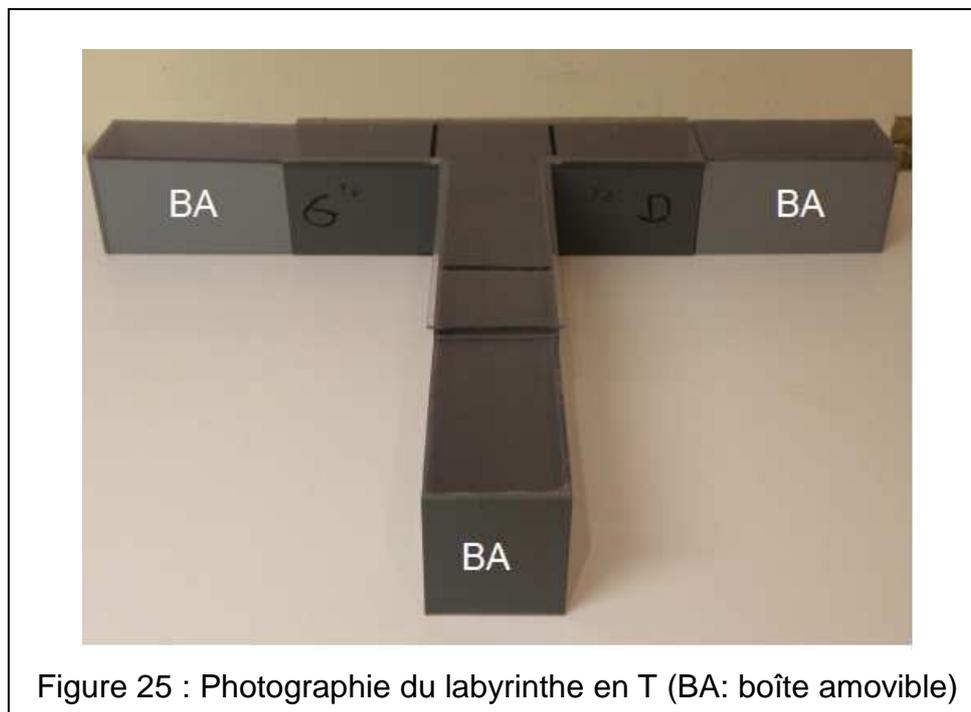


Figure 25 : Photographie du labyrinthe en T (BA: boîte amovible)

Le labyrinthe utilisé est composé d'un couloir central (34 x 10 x 13cm) qui s'ouvre sur deux branches latérales (20 x 10 x 13 cm). Le couloir et les branches sont chacun terminés par une boîte amovible (22 x 10 x 13cm), dans laquelle le rat peut être maintenu au moyen d'une porte guillotine. L'ensemble est placé sur une table et éclairé uniformément par une ampoule de 40 W située à 1 m au dessus du point de jonction entre les deux branches.

Nous avons utilisé un protocole d'alternance spontanée qui se déroule sur 5 jours, à raison de 2 essais par jour (un le matin et le second en début d'après midi).

Chaque essai est constitué de deux passages successifs : lors du premier passage, le rat entre dans l'une des deux branches du labyrinthe, où il reste confiné

pendant 1 min. Le rat est alors replacé au départ du labyrinthe, où il pourra choisir d'entrer dans l'une ou l'autre des branches. L'essai est doté 1 point si les 2 branches du labyrinthe sont visitées. Le nombre total d'alternances est relevé sur les 5 jours de test afin d'établir un pourcentage par rapport au nombre total d'essais. Un pourcentage d'alternance proche de 50% indique que les animaux font leur second choix au hasard.

Nous avons également relevé le nombre maximum de visites réalisées dans la même branche sur les 5 jours de test, afin d'évaluer les comportements persévératifs de nos animaux.

F) Conditionnement de peur au contexte

Le conditionnement de peur au contexte est une forme d'apprentissage associatif se mettant en place lors de l'exposition d'un animal à des chocs électriques auxquels il ne peut échapper. Ce type de stimulus spontanément aversif est appelé Stimulus Inconditionné (SI), induit une Réponse Inconditionnée (RI) de peur (se manifestant sur un plan autonome qu'endocrinien et comportemental). Lors de la réexposition au contexte de conditionnement, le rat exprimera une Réponse Conditionnée (RC) de peur associée à ce contexte, devenu Stimulus Conditionné (SC). Parmi les RC de peur pouvant être mesurées figure l'immobilité, réaction adaptative de défense propre à l'espèce et se manifestant par une absence totale de mouvements, exceptés ceux nécessaires à la respiration.

Avant conditionnement	Conditionnement	Après conditionnement
Ctx → pas de réponse SI → RI	SI + Ctx → RI	SC (Ctx) → RC

1) Dispositif expérimental

Huit boîtes de conditionnement, individuellement placées dans des unités d'isolation phonique (57 x 38 x 38 cm, Campden Ltd) ventilées (bruit de fond de 60 dB) et éclairées par une lumière d'ambiance (5 lux), sont utilisées. Les boîtes de conditionnement sont constituées de parois en Plexiglas transparent (25 x 27 x 18 cm), d'un plancher composé de barreaux métalliques inoxydables (3mm de diamètre ; 8mm d'espacement) sous lesquels se trouve un plateau amovible contenant de la sciure. Ces barreaux sont connectés à un générateur d'impulsions (Med Associates) permettant de délivrer un choc électrique au niveau des pattes de

l'animal, dont l'intensité peut être réglée à l'aide d'un potentiomètre.

Les expériences ont lieu entre 8h et 13h (heure d'hiver).



Figure 26 : Photographie d'une boîte de conditionnement

2) Protocole

a) Conditionnement

Les rats sont transportés dans leur cage d'élevage de l'animalerie à la salle expérimentale (faiblement éclairée, 2,5 lux) et placés individuellement dans les boîtes de conditionnement dans lesquelles ils resteront pendant 38 min. Cinq chocs électriques (0,8 s, 0,6 mA) sont administrés selon un agencement temporel (293, 639, 1206, 1445 et 2152 s après le placement du rat dans la boîte). Les animaux sont ensuite replacés dans leur cage et ramenés à l'animalerie. Les boîtes de conditionnement sont nettoyées à l'eau.

b) Test au contexte

Ce test est réalisé 24 heures après le conditionnement, chaque animal étant exposé pendant 18 min à la même boîte de conditionnement que la veille. Aucun choc n'est administré au cours de cette séance. Les animaux sont ensuite replacés dans leur cage et ramenés à l'animalerie, et les boîtes nettoyées à l'eau.

c) Quantification de l'immobilité

Les périodes codées sont les deux minutes qui suivent l'administration du dernier choc électrique lors du conditionnement et les 10 minutes du test au

contexte. Des macro-commandes (écrites sous Microsoft Excel, Marchand et al, 2003) permettent de convertir le fichier obtenu pour chaque animal en un fichier d'échantillonnage seconde par seconde de l'immobilité puis de calculer le pourcentage de temps d'immobilité.

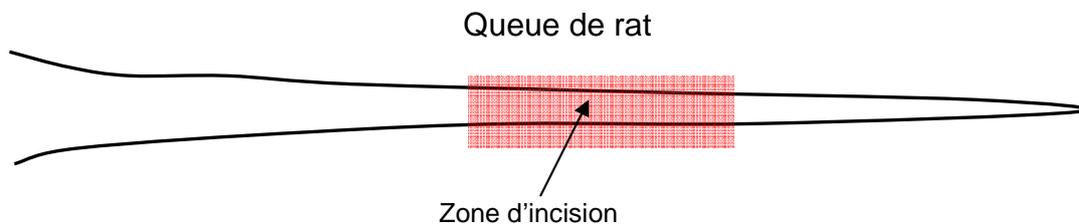
V) Dosage de la corticostérone plasmatique

A) Prélèvements d'échantillon sanguin

Les prélèvements ont été effectués dans deux conditions pour évaluer, d'une part le niveau basal de corticostérone plasmatique, et d'autre part un niveau hormonal circulant stimulé par un stress de contention de 10 minutes (animal introduit dans un tube suffisamment étroit pour l'empêcher de se retourner).

Les prélèvements sanguins de chaque rat ont été effectués entre 8h et 10h du matin, soit au début de la phase diurne, lorsque le taux de corticostérone est le plus bas chez cet animal.

Les rats sont amenés un à un dans la salle de prélèvement, différente de l'animalerie de stabulation. Le rat est sorti de sa cage et légèrement maintenu par un des expérimentateurs, tandis que l'autre incise, à l'aide d'une lame de scalpel, la queue du rat.



Le sang est prélevé à l'aide de tubes capillaires (Microvette CB 300) contenant de l'EDTA. Les tubes sont placés dans la glace, puis centrifugés à 4°C pendant 15min à 12000 rpm. Environ 200µl de plasma sont prélevés et conservés à -80°C.

B) Dosage Radioimmunologique

Le principe du dosage repose sur la compétition de liaison, au niveau des épitopes d'un anticorps dirigé contre la corticostérone de rat, entre la corticostérone contenue dans l'échantillon testé et une quantité fixe de corticostérone radiomarquée

à l'iode 125. Après obtention de l'équilibre de la réaction, l'anticorps est précipité et la radioactivité mesurée dans le culot.

La quantité d'anticorps étant constante, la fixation de l'hormone radioactive sera inversement proportionnelle à la concentration de corticostérone présente dans l'échantillon à analyser.

C) Protocole

Le dosage de la corticostérone a été réalisé à l'aide du kit Corticosterone DA (MP Biomedicals). Après décongélation, 5µl de plasma sont prélevés dans chaque échantillon et dilués dans 1ml de tampon gélatine phosphosaline pH=7,0 (diluante des stéroïdes).

Dans des tubes à hémolyse, les solutions suivantes sont déposées dans l'ordre et mélangées à chaque étape : le tampon gélatine phosphosaline, les étalons, les échantillons, l'hormone radioactive, l'anticorps anti-corticostérone, dont les quantités, les réactifs et les étalons sont présentés dans le tableau 3

Après 2 heures d'incubation, 0,5ml de solution de précipitation est ajouté dans chaque tube. Les tubes sont alors centrifugés (à 2000g pendant 15min, à 4°C). Le surnageant est éliminé par retournement des tubes et la radioactivité contenue dans le culot quantifiée par un compteur à scintillation relié à un ordinateur. Ce dernier établit la courbe étalon et détermine la quantité de corticostérone présente dans l'échantillon à doser.

Tableau 3 : Quantité (en ml) des différents réactifs utilisés pour le dosage RIA

Description	Nombre de tubes	Tampon (ml)	Etalon ou échantillon	I^{125} - Corticostérone	Anticorps
Blanc	2	0,3	0	0	0,2
0 ng/ml	2	0,1	0	0,2	0,2
25 ng/ml	2	0	0,1	0,2	0,2
50 ng/ml	2	0	0,1	0,2	0,2
100 ng/ml	2	0	0,1	0,2	0,2
250 ng/ml	2	0	0,1	0,2	0,2
500 ng/ml	2	0	0,1	0,2	0,2
1000 ng/ml	2	0	0,1	0,2	0,2
Control faible	2	0	0,1	0,2	0,2
Control fort	2	0	0,1	0,2	0,2
Echantillon	1/rat	0	0,1	0,2	0,2

VI) Techniques histologiques et Immunocytochimiques

A) Fixation des tissus par perfusion

A l'issue de la période de suivi post-lésionnel, les animaux subissent une injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique (200 mg/kg). Les animaux sont perfusés par voie intracardiaque avec une solution de formol à 4% (tampon phosphate 0,1M ; pH 7,4 ; 4°C). Les cerveaux sont retirés de la boîte crânienne et post-fixés pendant 2 h dans la même solution, avant d'être placés dans une solution de saccharose à 30% (tampon phosphate 0,1M ; pH 7,4, 4°C) pendant 48h. Les cerveaux sont ensuite congelés dans de l'isopentane refroidi (-35 à -40°C) dans de la carboglace et conservés à -80°C.

Les cerveaux sont coupés à l'aide d'un cryostat dans le plan sagittal. Des coupes de 60µm d'épaisseur sont déposées dans un milieu cryoprotectant, puis

conservées à -20°C avant utilisation.

Pour le groupe d'animaux ayant subi l'implantation de Matrigel dans la cavité lésionnelle, les cerveaux ont été coupés en tranches de 50µm d'épaisseur récupérées sur des lames gélatinées, brièvement séchées puis conservées à -20°C.

B) Préparation des tissus sans perfusion

Afin de préserver au mieux les hydrogels d'alginate dans la cavité lésionnelle, nous avons veillé à limiter au maximum les contraintes mécaniques. Les cerveaux sont prélevés, congelés dans de l'isopentane et coupés suivant le plan sagittal à l'aide un cryostat, en tranches de 50µm d'épaisseur. Les coupes sont récupérées sur lames gélatinées dans l'enceinte réfrigérée et conservées à -20°C.

Avant la réalisation des marquages histologiques ou immunohistochimiques, les coupes sont lentement décongelées (10min à 4°C), puis fixées pendant 30min, à 4°C, dans une solution de formol à 4% diluée dans du tampon cacodylate 0,1M ; pH 7,4. Ce tampon, non chélateur de calcium contrairement au tampon phosphate, a été choisi pour préserver les liaisons électrostatiques, impliquant le calcium, responsables de la structure en hydrogel des alginate. Le tampon cacodylate remplacera le tampon phosphate dans tous les protocoles d'histologie et d'immunohistochimie impliquant les hydrogels d'alginate.

C) Coloration au violet de crésyl

La coloration est réalisée dans un bain de violet de crésyl qui colore sélectivement les composés acides des cellules (particulièrement les noyaux). Après rinçage, les coupes sont placées pendant 9 min dans une solution de violet de crésyl (Sigma) chauffée à 60°C, puis différenciées dans une solution d'alcool-acide, et déshydratées dans des bains d'alcool de concentration croissante. Elles sont ensuite montées sous lamelle dans un milieu d'inclusion (Eukitt).

Après séchage, les lames sont observées au microscope optique et photographiées. Le logiciel ImageJ (NIH) est utilisé pour déterminer la surface occupée par la lésion par rapport à la surface totale de la coupe de cerveau, ainsi que la taille de zones de nécrose.

D) Révélation histochimique de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)

Cette technique de coloration permet de révéler l'activité de l'AChE. Mise au point par Koelle, cette méthode a été optimisée par Butcher (Koelle, 1954; Butcher, 1984).

Les coupes sont incubées pendant 15 à 18 heures dans une solution à 37°C contenant de l'iodure d'acétylthiocholine (4mM) en tant que substrat, et de l'éthopropazine (0,3 mM) comme inhibiteur des cholinestérases non spécifiques. Les coupes sont ensuite plongées dans une solution de sulfure de sodium (8 mM) pour révéler en brun le produit de la réaction, avant d'être rincées, déshydratées et montées sous lamelle dans l'Eukitt.

1) Evaluation de la densité optique du produit de la révélation histochimique de l'AChE

La densité optique (D.O.) du produit de révélation histochimique de l'AChE au niveau de l'hippocampe est proportionnelle à celle de l'innervation cholinergique issue du septum (Heckers et coll., 1994). Ainsi, la disparition des fibres cholinergiques septo-hippocampiques après lésion du septum ou de la FiFo entraîne une diminution du marquage de l'activité de l'AChE. La D.O., évaluée à l'aide d'un système d'analyse d'image assisté par ordinateur (SAMBA Technologies, France), est mesurée sur des images digitalisées, en délimitant la région hippocampique. La mesure du bruit de fond de la lame est directement soustraite de l'image à analyser. Sur chaque coupe, la mesure de la DO de la partie centrale du corps calleux, dépourvue de fibres AChE-positives, est soustraite des autres mesures.

E) Marquages immunohistochimiques

Les coupes sagittales sont incubées pendant 1 heure dans du sérum d'âne (pour saturer les sites non spécifiques ; Dutscher, Brumath, France), dilué à 10 % dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7.6 additionné de triton X100. Après 3 rinçages dans du PBS (tampon phosphate salin, 0.1 M, pH 7,4), les coupes sont incubées à température ambiante pendant 18 heures avec l'anticorps primaire (Voir Tableau 4)

Tableau 4 : Anticorps primaires

Antigène	Espèce	Dilution	Fournisseur
ChAT	Chèvre (Polyclonal)	1:200	Chemicon International, Temecula, CA
GFAP	Lapin (Polyclonal)	1:200	Chemicon International, Temecula, CA
Tyrosine hydroxylase	Souris (Monoclonal)	1:2000	Chemicon International, Temecula, CA
Neurofilaments phosphorilés	Souris (Monoclonal)	1:1000	Developmental Studies Hybridoma Bank , Iowa City, IA
VACHT	Chèvre (Polyclonal)	1:2000	Chemicon International, Temecula, CA

Après 3 rinçages, les coupes sont incubées pendant 1h avec l'anticorps secondaire. (Voir tableau 5)

Tableau 5 : Anticorps secondaires

Antigène	Espèce	Dilution	Fournisseur
anti-chèvre (Biotinylé)	Ane	1:200	Chemicon International, Temecula, CA
anti-souris (Biotinylé)	Cheval	1:200	Vector laboratories, Burlingame, CA
anti-lapin (Biotinylé)	Chèvre	1:200	Chemicon International, Temecula, CA
anti-chèvre (Texas Red)	Lapin	1:200	Vector laboratories, Burlingame, CA
anti-souris (Fluorescéine)	Ane	1:200	Chemicon International, Temecula, CA
anti-souris (Rhodamine)	Ane	1:200	Chemicon International, Temecula, CA
anti-lapin (Fluorescéine)	Ane	1:200	Chemicon International, Temecula, CA
anti-lapin (Rhodamine)	Ane	1:200	Chemicon International, Temecula, CA

Dans le cas de l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, les coupes sont rincées puis montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage pour fluorescence (VectaShield Hard Set, Vector laboratories, Burlingame, CA)

Dans le cas de l'utilisation d'un anticorps biotinylé, les coupes sont rincées et incubées pendant 1 heure avec le complexe avidine-biotine-peroxidase (1:500; Vectastain Elite ABC, Vector Labs, Burlingame, CA), puis exposées à un mélange de DAB et d'H₂O₂ (Peroxidase Substrate Kit DAB, Vector laboratories, Burlingame, CA) jusqu'à obtenir un bon rapport marquage/bruit de fond. La réaction est stoppée par deux rinçages au tampon PBS. Les lames sont alors séchées, déshydratées, puis montées entre lame et lamelle avec de l'Eukitt.

L'omission de l'anticorps primaire sert de contrôle négatif et résulte en l'absence de marquage sur toutes les préparations.

1) Comptage des neurones dans le complexe SM/vDB

La commissure antérieure est utilisée comme repère anatomique pour sélectionner, définir et standardiser, d'un animal à l'autre, la zone de comptage des neurones ChAT dans le complexe SM/vDB. Ainsi, le complexe SM/vDB sera délimité ventralement par une ligne imaginaire passant au centre de la commissure antérieure, dorsalement et latéralement par la distribution des neurones marqués. Pour chaque rat, le comptage des neurones a été réalisé sur 2 à 3 coupes sagittales, après quoi les valeurs ont été moyennées.

VII) Analyses statistiques

L'ensemble des données a été traité à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) à un ou plusieurs facteurs, ou d'une ANOVA à mesures répétées en fonction du plan expérimental.

Lorsqu'elle s'est trouvée légitime, une comparaison deux à deux a été réalisée avec le test de comparaisons multiples de Newman-Keuls (Winer, 1971).

Pour l'analyse des résultats obtenus dans certains test comportementaux, nous avons comparé à l'aide d'un test T de Student, les moyennes obtenues par rapport à une valeur standard. Ainsi l'indice de rétention, obtenus pour le test de la piscine de Morris, a été comparé à la valeur 1, tandis que les pourcentages calculés,

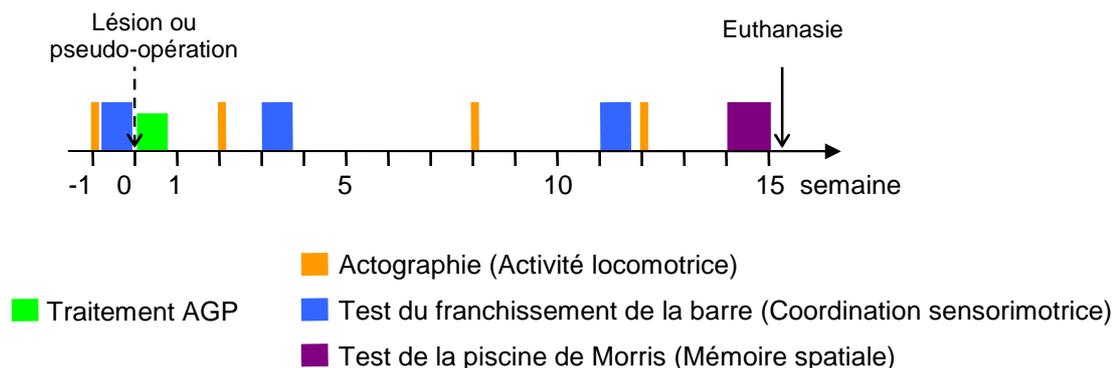
à partir des résultats obtenus dans le labyrinthe en croix surélevé et dans le labyrinthe en T, ont été comparés à la valeur de référence 50%.

Résultats

Partie I

Récupération fonctionnelle et structurale après traitement combiné d'Aminoguanidine et de Putrescine.

Cette partie de mon travail de thèse a eu pour but d'étudier les effets comportementaux et morphologiques d'un traitement à l'AGP administré quotidiennement lors des 5 jours suivant la lésion. Quatre groupes expérimentaux ont été constitués : les deux groupes d'animaux lésés (L), ayant reçu des injections de solvant (NaCl 0,9%) ou d'AGP (L-AGP), et leurs homologues témoins pseudo-opérés (Po). Les animaux ont été suivis pendant 15 semaines au niveau comportemental, selon le protocole expérimental décrit ci-dessous, avant d'être euthanasiés, en vue de l'analyse histologique et immunohistochimique des cerveaux.



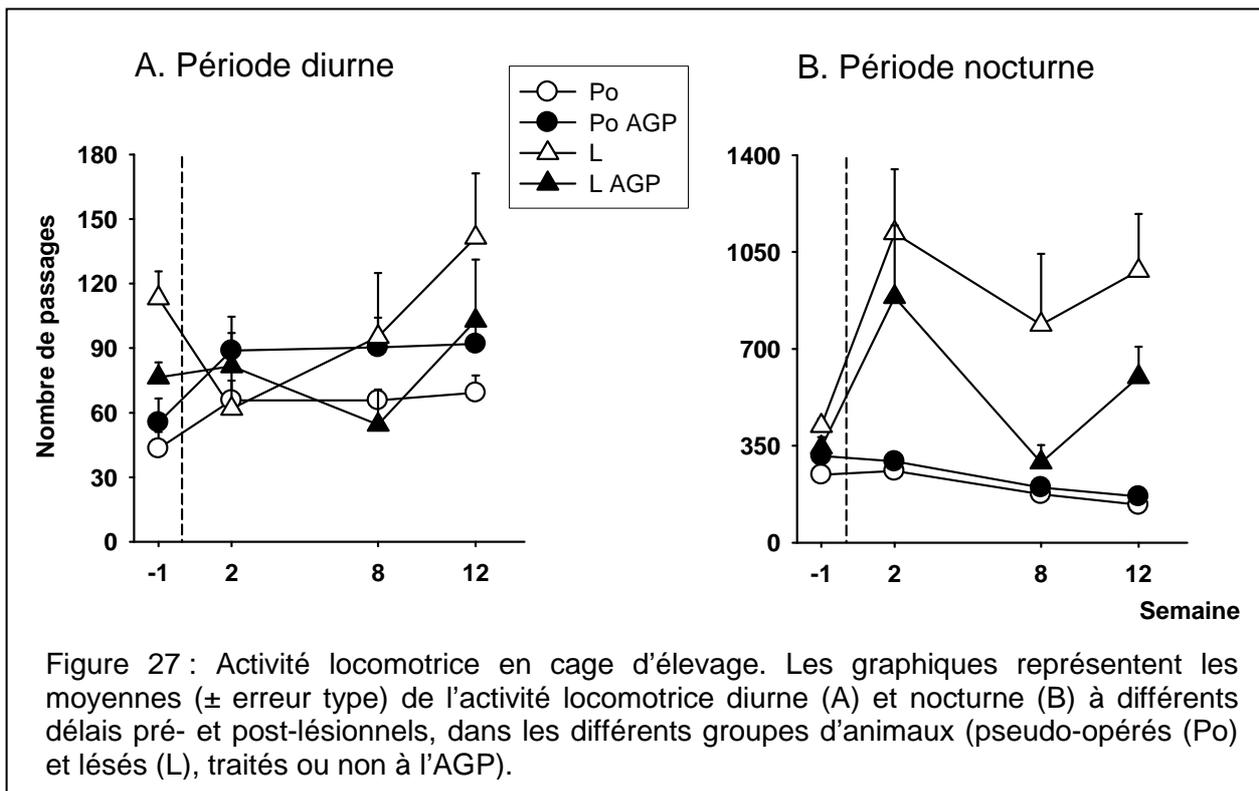
I) Analyse Comportementale

A) Atténuation de l'hyperactivité locomotrice après traitement à l'AGP

L'activité locomotrice est enregistrée en cage de d'élevage une semaine avant l'intervention chirurgicale et 2, 8 et 12 semaines après, pendant les phases diurnes et nocturnes du nyctémère (Figure 27).

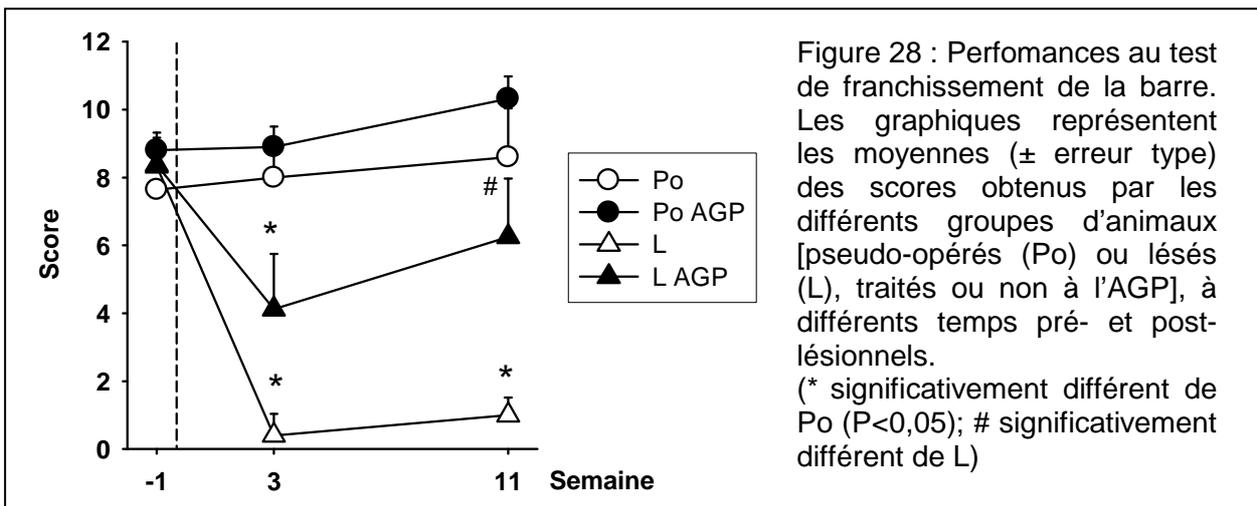
La lésion provoque une augmentation durable de l'activité locomotrice, qui est spécialement prononcée pendant la période nocturne (effet majeur du Groupe, $F_{1,29} = 37,3$ $P < 0,001$). Sans effet significatif sur les rats pseudo-opérés, le traitement à l'AGP permet une atténuation de l'hyperactivité induite par la lésion. Au cours de la

période nocturne, les scores d'activité des animaux L-AGP sont significativement supérieurs à ceux observés chez les groupes d'animaux pseudo-opérés, mais sont significativement inférieurs à ceux du groupe L-NaCl (interaction Groupe x Traitement, $F_{1,29}=5,1$, $P<0,05$). On peut observer un effet du facteur Semaine significatif ($F_{3,87}=11,2$ $P<0,001$), le niveau d'activité étant significativement plus élevé au cours des deux premières semaines post-lésionnelles que lors des stades plus tardifs (8 semaines, $P<0,001$; 12 semaines, $P<0,05$). L'interaction Groupe x Semaine ($F_{3,87}=11,7$ $P<0,001$) peut s'expliquer par le fait que les niveaux d'activité locomotrice, qui ne diffèrent pas entre les quatre groupes d'animaux avant l'intervention chirurgicale, sont significativement augmentés dans les groupes lésés à tous les stades post-lésionnels ($P<0,01$). Elle s'explique également par l'atténuation de l'hyperactivité post-lésionnelle observée chez les rats traités avec l'AGP.



B) Atténuation des déficits sensorimoteurs après traitement à l'AGP

Les performances au test de franchissement de la barre ont été évaluées 1 semaine avant, et 3 et 11 semaines après l'intervention chirurgicale, dans le but d'évaluer la coordination sensorimotrice des animaux (Figure 28).



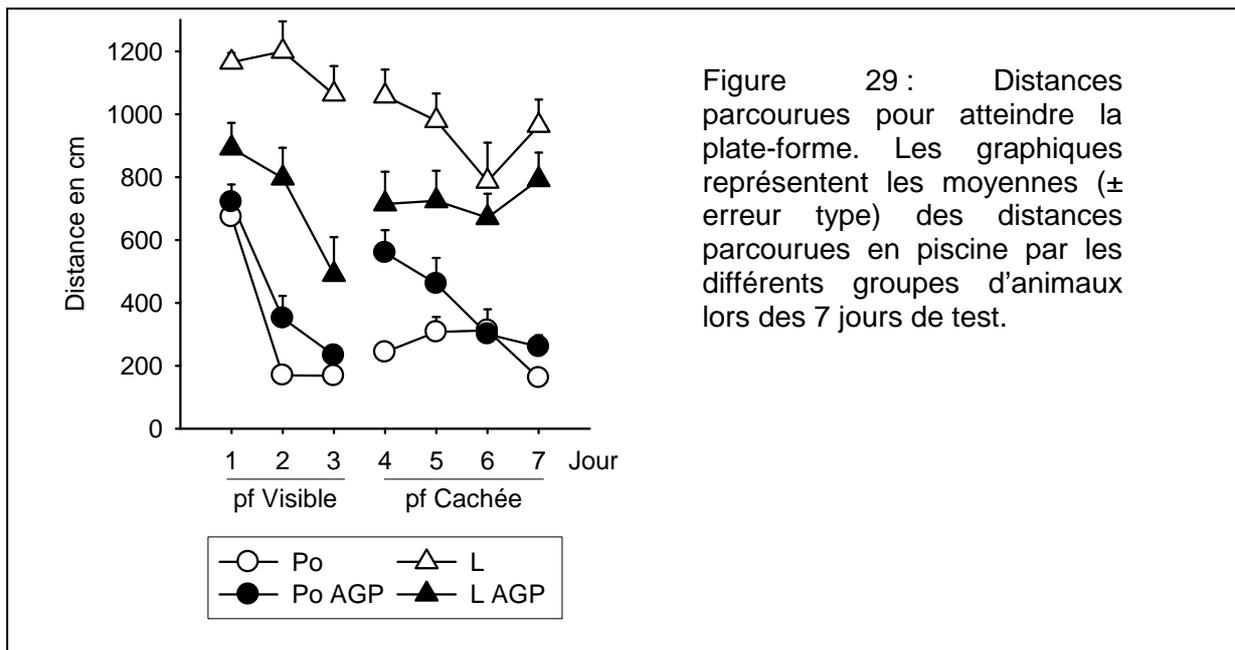
La lésion provoque un chute marquée et persistante des scores au test de franchissement de la barre ($F_{1,20}=16,28$ $P < 0,001$). L'interaction Groupe x Semaine ($F_{2,40}=26,08$ $P < 0,001$) est significative, reflétant une stabilité au cours du temps des scores dans les groupes pseudo-opérés par opposition à la détérioration des performances observée dans le groupe Lésé. Sans effet significatif sur les performances des animaux pseudo-opérés, le traitement à l'AGP réduit le déficit sensorimoteur chez les animaux lésés (traitement, $F_{1,20}=4,85$ $P < 0,05$). Ceci est particulièrement évident 11 semaines après la lésion, où les performances des rats L-AGP ne sont plus différentes de celles des animaux pseudo-opérés. Les interactions significatives Temps x Traitement ($F_{2,40}=4,3$ $P < 0,05$) et Groupe x Semaine x Traitement ($F_{2,40}=3,4$ $P < 0,05$) reflètent la détérioration des performances induite par la lésion et l'atténuation des déficits chez les animaux traités à l'AGP.

C) Amélioration partielle des performances des rats lésés dans la piscine de Morris après traitement à l'AGP

Le test de la piscine Morris a été réalisé 14 semaines après la lésion. La plateforme, qui est maintenue à la même position pendant toute la durée du test, est visible les 3 premiers jours, puis immergée les 4 jours suivants.

1) Distances parcourues

Les distances moyennes parcourues dans la piscine entre le point de lâcher et la plate-forme sont illustrées dans la figure 29.



Lors des trois premiers jours de test avec la plate-forme visible, on observe une forte augmentation des distances parcourues par les animaux lésés, qui est également significative bien que moins prononcée dans le groupe traité à l'AGP (effet majeur du groupe, $F_{1,24}=78,4$ $P<0,001$; traitement $F_{1,24}=6,5$ $P<0,05$). L'interaction significative Groupe x Traitement ($F_{1,24}=17,2$ $P<0,001$) reflète des distances parcourues élevées chez les rats L-NaCl en comparaison avec les trois autres groupes ($P<0,001$), ainsi que chez les L-AGP en comparaison avec les animaux pseudo-opérés.

L'effet principal du Jour ($F_{2,48}=41,8$ $P<0,001$) et l'interaction Groupe x Jour ($F_{2,48}=12,2$ $P<0,001$) est significative, en raison de la diminution des distances parcourues au cours des jours dans les groupes pseudo-opérés et le groupe lésé traité à l'AGP. En revanche, les distances parcourues par les rats lésés traités au NaCl restent élevées tout au long du test.

Quand la plate-forme est invisible, les rats lésés traités à l'AGP ont de meilleures performances que leurs homologues traités au NaCl (effet majeur du Groupe, $F_{1,24}=67,1$ $P<0,001$; interaction Groupe x Traitement, $F_{1,24}=8,3$ $P<0,01$). Cependant, les performances dans ces deux groupes restent relativement stables au cours du temps, ne montrant pas d'amélioration malgré les entraînements quotidiens (Effet Jour, $F_{3,72}=4,1$ $P<0,01$; Interaction Groupe x Jour, $F_{3,72}=3,3$ $P<0,01$; interaction Groupe x Jour x Traitement, $F_{3,72}=3,9$ $P<0,05$).

2) Latence d'accès à la plate-forme.

L'analyse du temps nécessaire pour atteindre la plate-forme montre des résultats similaires à ceux obtenus pour les distances parcourues. (figure 30)

Les rats lésés ont une latence d'accès à la plate-forme très élevée, que la plate-forme soit visible ou non. Cette latence est significativement plus faible ($P < 0,05$) dans le groupe traité à l'AGP. Lorsque la plate-forme est invisible, les performances restent stables au cours du temps dans les deux groupes lésés, sans amélioration notable malgré les entraînements quotidiens (effet majeur du Groupe $F_{1,24} = 61,1$ $P < 0,001$; l'interaction Groupe x Traitement, $F_{1,24} = 7,9$ $P < 0,01$; l'interaction Groupe x Jour, $F_{3,72} = 3,2$ $P < 0,05$).

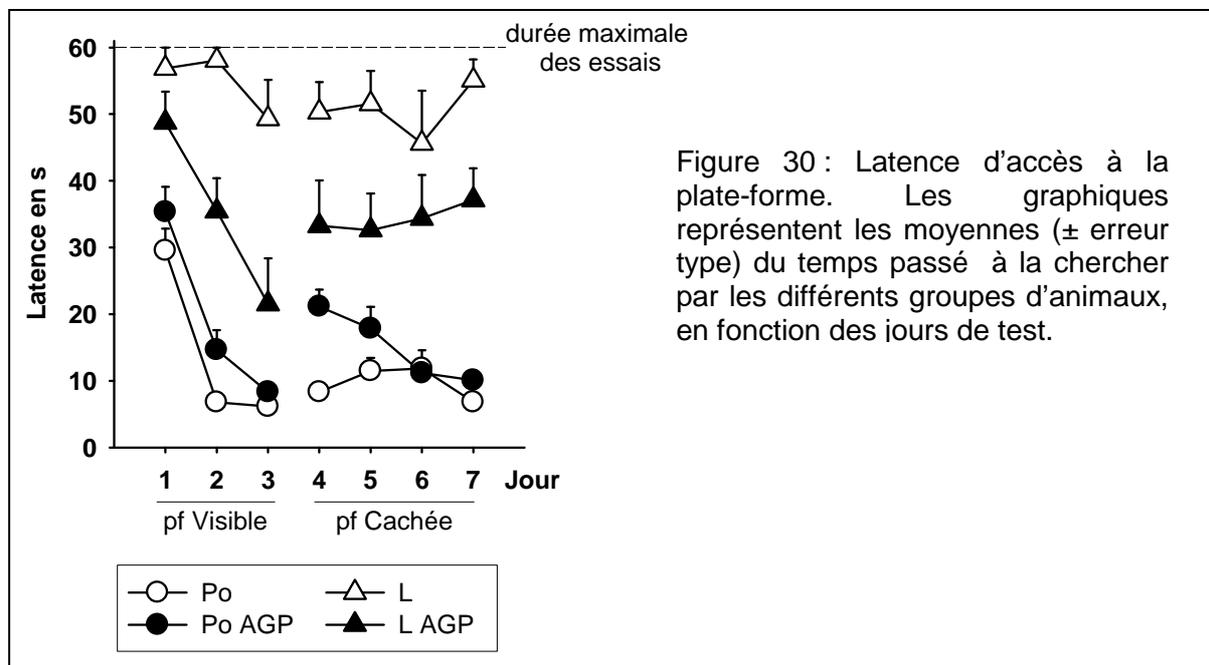
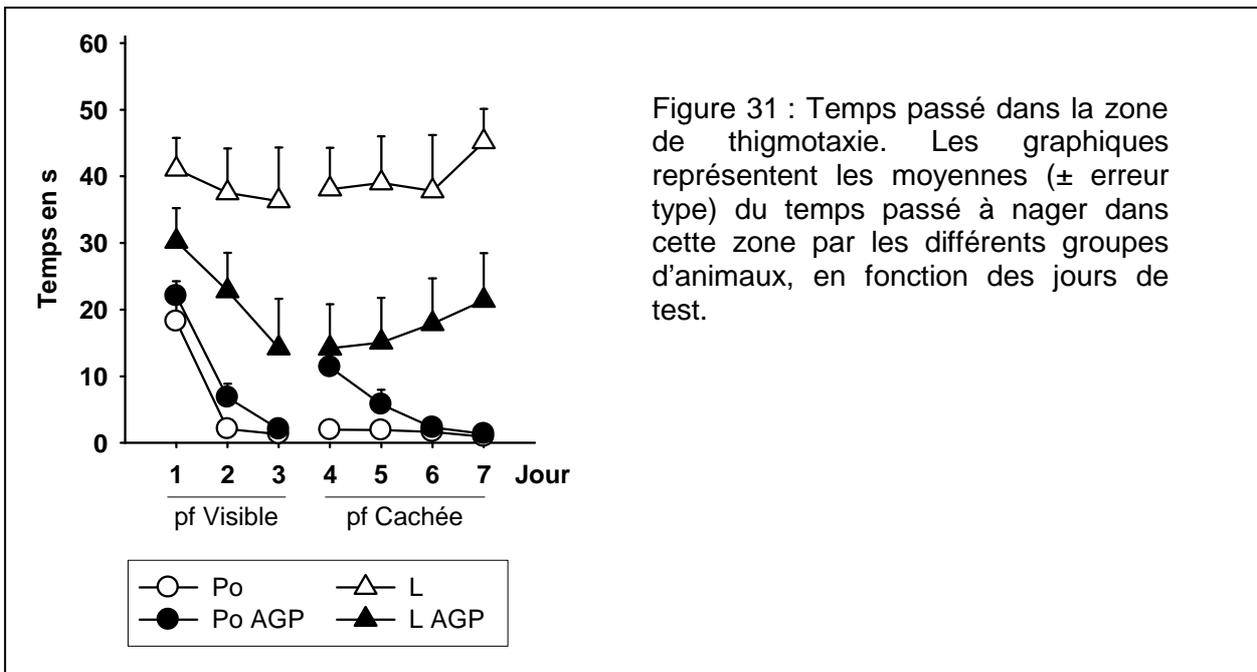


Figure 30 : Latence d'accès à la plate-forme. Les graphiques représentent les moyennes (\pm erreur type) du temps passé à la chercher par les différents groupes d'animaux, en fonction des jours de test.

3) Thigmotaxie

La thigmotaxie correspond au temps passé à nager le long des parois de la piscine, dans la couronne extérieure de 10 cm de largeur (Figure 31).

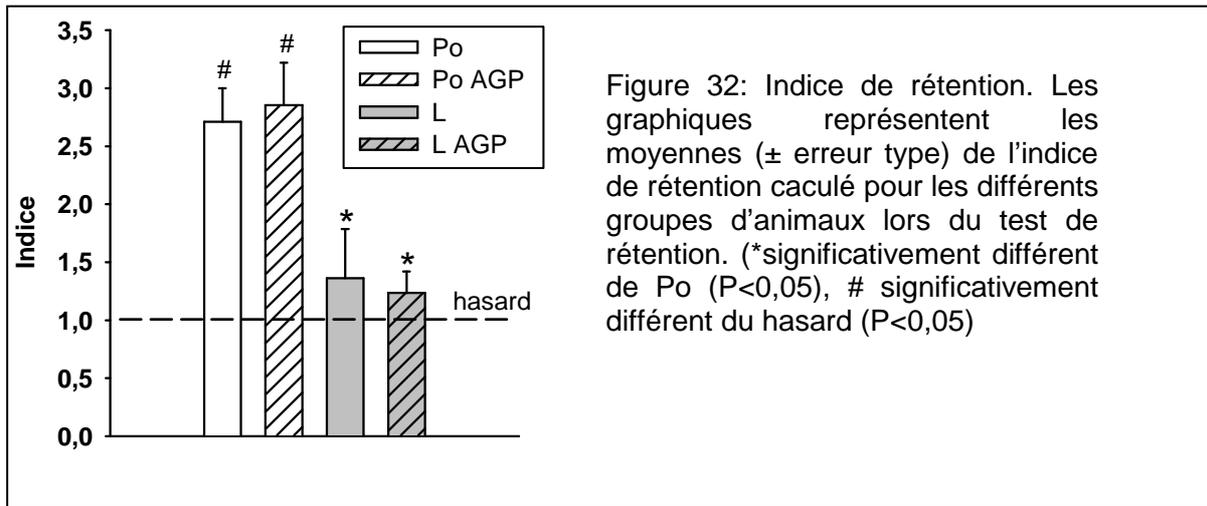
La lésion provoque un comportement thigmotaxique marqué, mais cette réponse est significativement ($P < 0,05$) réduite après traitement à l'AGP.



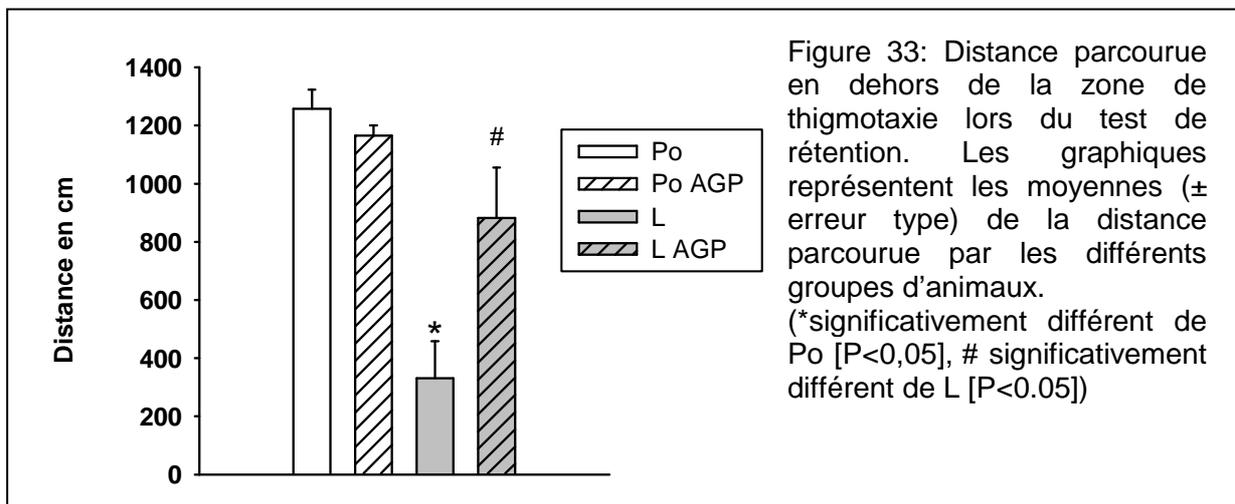
4) Test de rétention

Lors du dernier essai du 7ème jour, la plate-forme est retirée de la piscine. Les déplacements du rat sont suivis pendant 60 secondes, dans le but d'évaluer sa stratégie de recherche de la plate-forme, et sa capacité à s'en rappeler la localisation (Figure 32).

L'indice de rétention dans les deux groupes d'animaux lésés est significativement inférieur à celui des homologues pseudo-opérés (effet Lésion, $F_{1,23}=15,4$, $P<0,001$). Aucun effet du traitement à l'AGP n'est détecté (effet Groupe, $F_{1,23}= 0,98$, interaction Groupe x Traitement $F_{1,24}= 0,47$). De plus, l'indice de rétention chez les animaux lésés ne diffère pas de la valeur 1 (L, $P=0,43$ et L-AGP, $P=0,24$), ce qui indique que ces animaux ne manifestent pas de préférence pour un quadrant particulier, contrairement aux animaux pseudo-opérés qui se concentrent sur le quadrant cible (Po, $P<0,01$ et Po-AGP, $P<0,01$).



Nous nous sommes intéressés à la distance parcourue dans la zone centrale de la piscine, en retranchant à la distance totale celle parcourue dans la zone de thigmotaxie (Figure 33). Les rats lésés traités à l'AGP parcourent une distance significativement plus importante dans la partie centrale de la piscine que leurs homologues traités au NaCl. A ce niveau, leur performance n'est pas significativement différente de celle des animaux témoins pseudo-opérés (Effet majeur de la lésion, $F_{1,24} = 24,9$ $P < 0,001$; interaction Lésion x Traitement, $F_{1,24} = 7,1$ $P < 0,05$).



II) Analyse morphologique

A) Aire lésionnelle

L'étendue de la lésion est évaluée par quantification morphométrique de l'aire occupée par la cavité lésionnelle par rapport au reste du cerveau. Cette évaluation est réalisée sur des coupes parasagittales réalisées à deux niveaux de l'axe medio-latéral (1,4 et 1,9mm, Paxinos & Watson, 1997 ; Figure 34). Aucun effet du traitement à l'AGP ne peut être détecté.

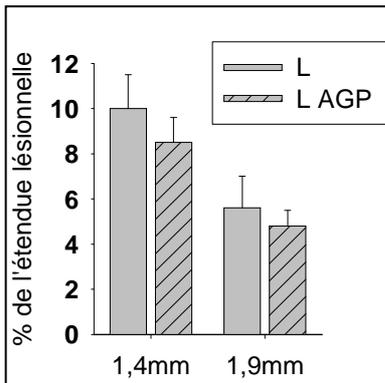


Figure 34: Etendue de l'aire lésionnelle. Les graphiques représentent les moyennes (\pm erreur type) de l'aire couverte par la lésion par rapport à la surface totale de la coupe, dans les groupes lésés (L), traités ou non à l'AGP, à deux niveaux parasagittaux.

Chez tous les rats lésés, de larges zones de nécrose sont observées dans dans les noyaux thalamiques dorsolatéral, antéroventral, postérieur, ventrolatéral et ventral postérolatéral (Figure 35). D'autres sont également observées à proximité de l'hippocampe. L'étendue dorso-ventrale des zones de nécrose thalamique est significativement ($P < 0,05$) réduite (30%) après traitement à l'AGP.

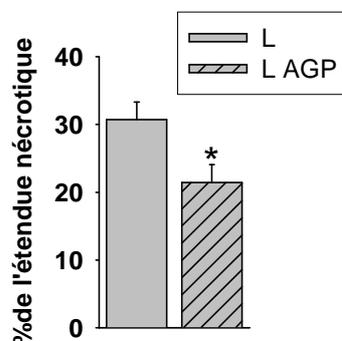
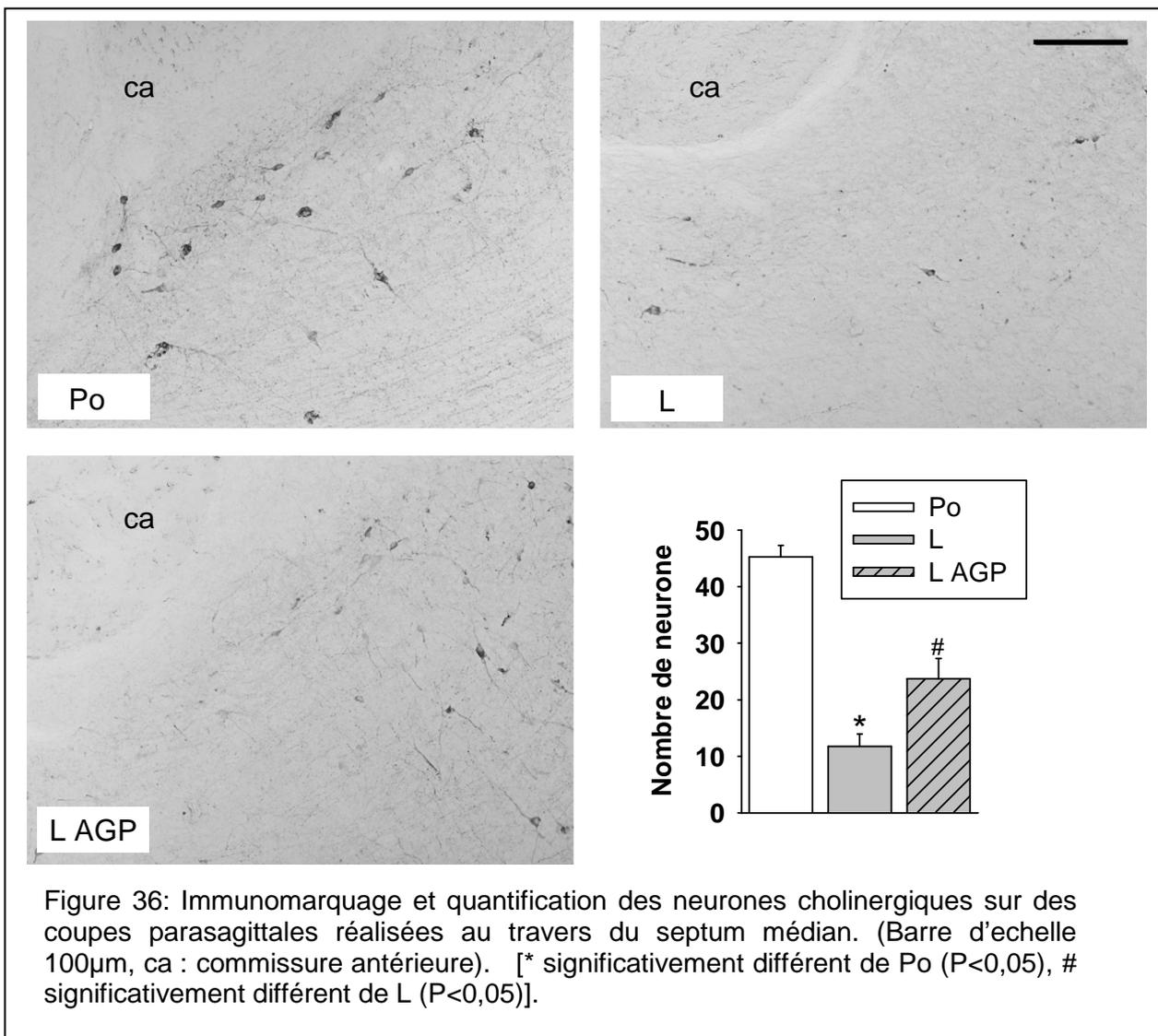


Figure 35: Etendue dorso-ventrale des zones de nécrose thalamique. Les graphiques représentent les moyennes (\pm erreur type) du pourcentage couvert par les zones nécrotiques par rapport à la hauteur totale du thalamus, dans les 2 groupes lésés (L) traités ou non à l'AGP. (*significativement différent de L)

B) Effets bénéfiques du traitement à l'AGP sur les neurones cholinergiques du septum médian

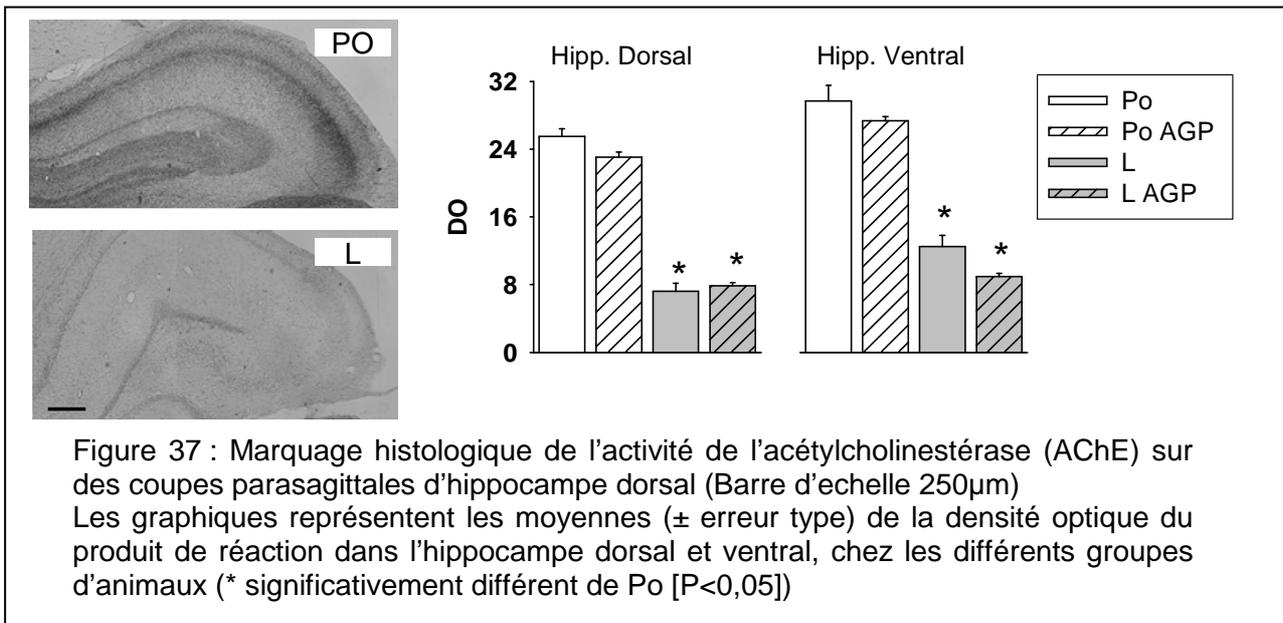
Le nombre de neurones immunoréactifs pour la ChAT est déterminé sur des coupes parasagittales sériées réalisées au travers du septum médian (Figure 36). Le nombre de neurones dans les deux groupes pseudo-opérés ne différant pas l'un de l'autre, ils ont été regroupés lors de l'analyse statistique. La lésion réduit de près de 70% le nombre de neurones ChAT-positifs dans le groupe lésé traité au NaCl, et seulement de 50% dans celui traité à l'AGP.

L'effet majeur Groupe ($F_{1,12}=25,2$ $P<0,001$) reflète la chute significative du nombre de neurones ChAT-positifs dans les deux groupes d'animaux lésés par rapport à leurs homologues pseudo-opérés ($P<0,001$), mais aussi l'effet du traitement à l'AGP, qui stimule significativement l'expression de la ChAT par les neurones septaux ($P<0,05$).



C) Augmentation du nombre de fibres cholinergiques dans l'hippocampe dorsal desafférenté

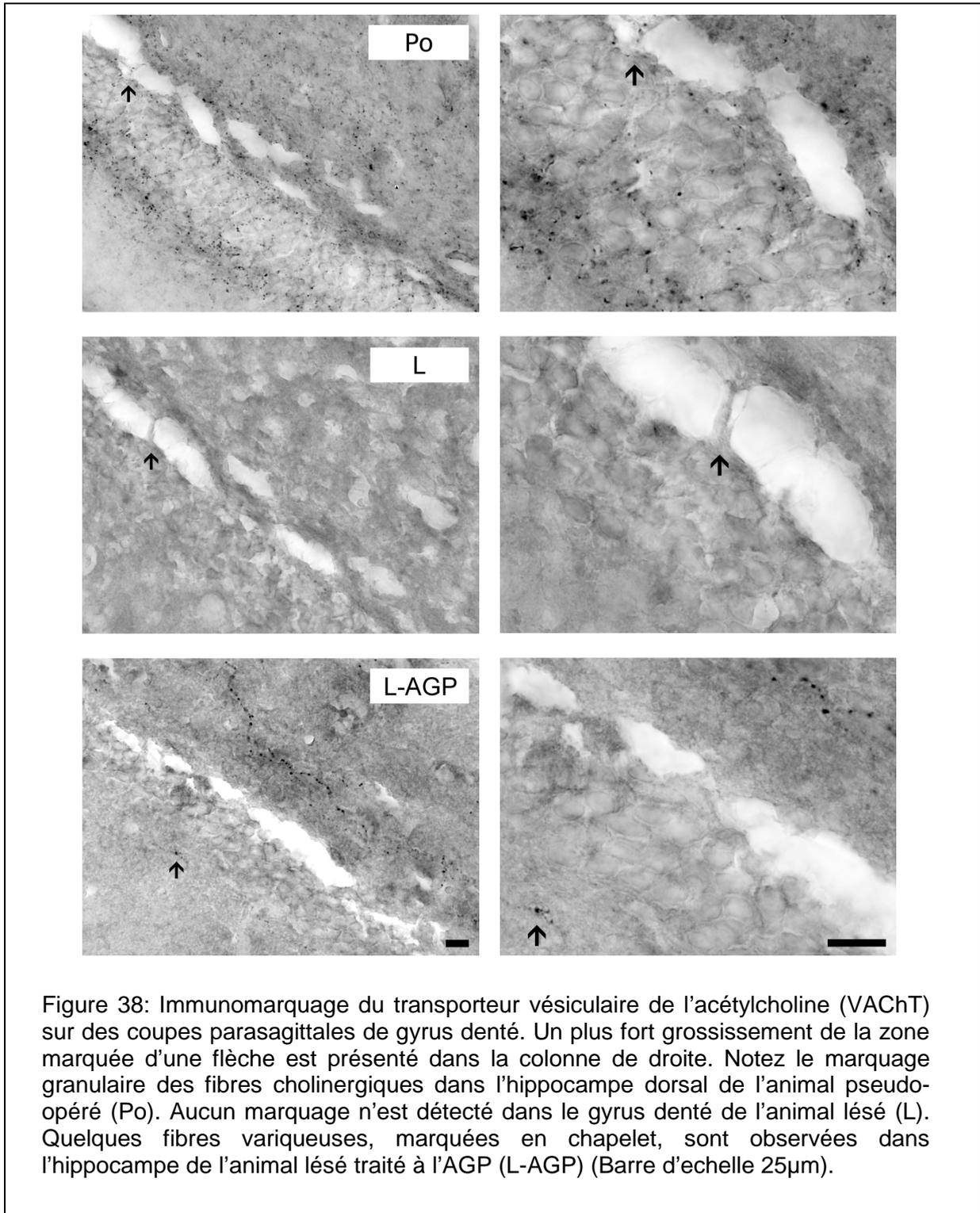
Nous nous sommes aussi intéressés à l'activité de l'AChE, indice de la densité de l'innervation cholinergique issue du SM/vBD de Broca et projetant dans l'hippocampe.



Comme illustré dans la figure 37, un important marquage est observé dans l'hippocampe dorsal des animaux pseudo-opérés. Un tel marquage est presque complètement absent chez les rats lésés.

La quantification de l'activité de l'AChE par la mesure de la densité optique de son produit de réaction souligne la forte diminution du marquage dans l'hippocampe dorsal et ventral chez les animaux lésés (Effet de la Lésion dorsal, $F_{1,12}=510,4$ $P < 0,001$; ventral, $F_{1,7}= 156,3$ $P < 0,001$). Aucun effet significatif du traitement à l'AGP n'est observé (Figure 37).

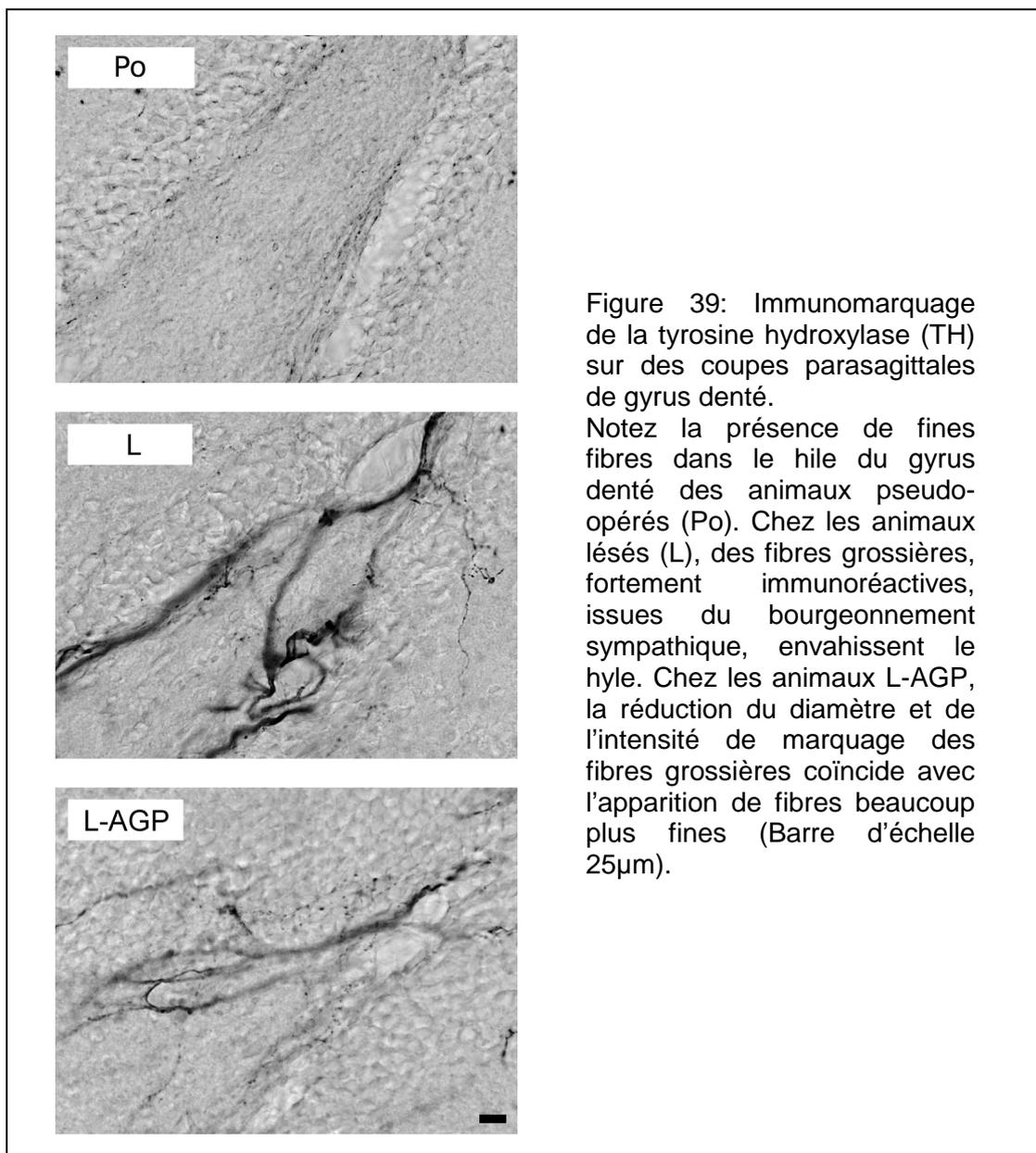
Cependant, le marquage du transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VACHT), présent dans les terminaisons synaptiques cholinergiques, permet d'observer quelques fibres immunoréactives, marquées en chapelet, dans le gyrus denté des animaux lésés traités à l'AGP. Ces fibres sont totalement absentes dans l'hippocampe des animaux traités au NaCl (Figure 38).



D) Diminution du bourgeonnement sympathique dans l'hippocampe dorsal desafférenté

L'immunoréactivité de la tyrosine hydroxylase (TH), première enzyme de synthèse des catécholamines, révèle (Figure 39) la présence d'un réseau dense de

fines fibres monoaminergiques dans le gyrus denté des animaux témoins pseudo-opérés, concentrées au voisinage de la couche granulaire (*stratum granulosum*). Ce réseau est absent chez les animaux lésés, chez qui il est remplacé par des fibres grossières, fortement immunoréactives, qui envahissent le hile du gyrus denté. Ces fibres sont issues du bourgeonnement sympathique classiquement décrit après désafférentation de l'hippocampe. Cependant, après traitement à l'AGP, on peut observer une réduction du diamètre et de l'intensité de marquage des fibres sympathiques TH-positives, corrélée à la réapparition de quelques fibres beaucoup plus fines, et marquées en chapelet, comparables à celles observées chez les animaux Po.



Partie II

Récupération fonctionnelle et structurale après implantation d'un hydrogel d'alginate, en association avec le traitement combiné d'Aminoguanidine et de Putrescine

Cette partie de mon travail de thèse a eu pour but l'étude des effets comportementaux et morphologiques du traitement à l'AGP, administré quotidiennement lors des 5 jours suivant la lésion, en combinaison avec l'implantation d'un hydrogel d'alginate pour combler la cavité lésionnelle.

Pour tout ce qui concerne la partie "hydrogels", j'ai travaillé en étroite collaboration avec Frédéric Vallée, alors doctorant au laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire de l'Institut National Polytechnique de Lorraine à Nancy, qui a soutenu sa thèse le 20 décembre 2007.

Je me suis basé sur les travaux préliminaires réalisés au laboratoire au cours du stage de Master 2 de Heike Herberth (2005), portant sur les premières implantations à court terme d'hydrogels d'alginate. Les données étaient encourageantes. Bien tolérés par le tissu hôte, les hydrogels d'alginate ne provoquent pas de réaction inflammatoire manifeste, épousent les parois de la cavité sans la comprimer, et montrent une bonne interface avec le tissu cérébral.

Pour évaluer, de façon préliminaire, la stabilité des hydrogels in vivo, Frédéric Vallée avait préparé un hydrogel d'alginate ester fluorescent, par greffage de fluorescéine sur le squelette d'alginate. Bien que cette manipulation modifie légèrement les propriétés physico-chimiques du biomatériau, elle nous permettait de pouvoir le retrouver facilement sur les coupes cérébrales, par observation directe en épifluorescence, et d'évaluer globalement sa résistance aux conditions de l'environnement cérébral.

L'hydrogel fluorescent a ainsi été implanté sur un lot d'animaux euthanasiés à différents stades, et jusqu'à 4 semaines post-lésionnelles. Retrouvé en bordure de la cavité, en contact étroit avec le tissu hôte (Figure 40) l'hydrogel d'alginate ester a cependant montré des signes de dégradation rapide, se fragmentant en amas irréguliers éliminés de la partie centrale de la cavité dès quelques jours après l'implantation in vivo.

Pour des implantations à plus long terme, afin de permettre l'envahissement cellulaire du biomatériau, la synthèse a été revue, et deux types d'hydrogels d'alginate ont été préparés : l'un d'alginate ester, comme précédemment, l'autre d'alginate amide, moins sensible aux dégradations par les estérases endogènes.

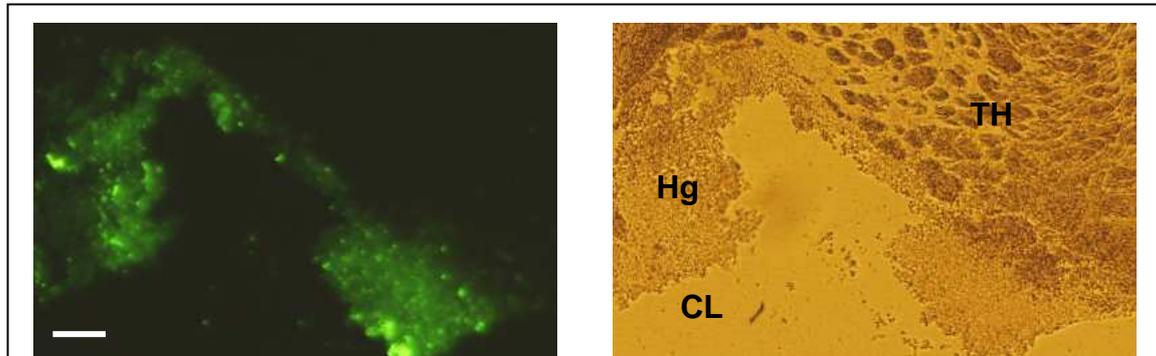


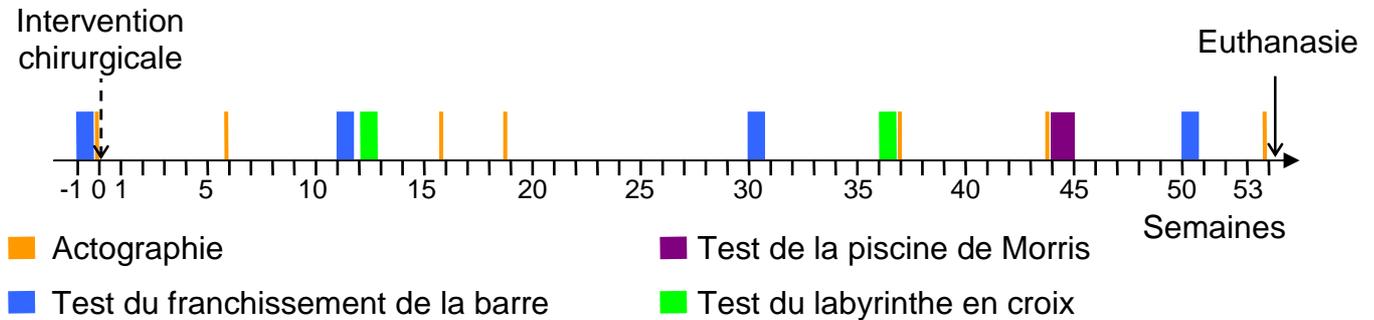
Figure 40: Coupe longitudinale au travers d'un hydrogel d'alginate fluorescent (Hg), implanté depuis 1 mois dans la cavité lésionnelle (CL) réalisée dans le cerveau d'un rat. A gauche: observation en épifluorescence, montrant la présence d'amas d'hydrogel présentant une fluorescence non homogène. A droite, observation en lumière transmise de la même zone, montrant la bordure d'hydrogel en contact étroit avec le tissu cérébral (TH). Noter la détérioration du biomatériau à l'intérieur de la cavité. (barre d'échelle 300 µm)

Huit groupes expérimentaux ont été constitués pour cette étude :

Chirurgie	Traitement NaCl/AGP	Hydrogel	Groupe
Pseudo-opération	NaCl (excipient)		Po
	AGP		Po-AGP
Lésion	NaCl	Sans hydrogel	L
		Hydrogel d'alginate amide	L Amide
		Hydrogel d'alginate ester	L Ester
	AGP	Sans hydrogel	L-AGP
		Hydrogel d'alginate amide	L Amide-AGP
		Hydrogel d'alginate ester	L Ester-AGP

Les animaux ont été suivis pendant 53 semaines sur le plan comportemental, selon le protocole expérimental décrit ci-dessous, avant d'être euthanasiés en vue de l'analyse histologique et immunohistochimique des cerveaux.

Protocole expérimental



I) Analyse Comportementale

A) Activité locomotrice

L'activité locomotrice est enregistrée en cage de d'élevage, une semaine avant l'intervention chirurgicale et 5, 15, 18, 36, 43, et 53 semaines après, pendant les phases diurnes et nocturnes du nyctémère (Figure 41)

Après l'intervention chirurgicale, on observe chez les rats lésés une exacerbation de l'activité locomotrice lors des périodes diurne et nocturne (effet majeur du groupe, $F_{3,76} = 9,98$ $P < 0,001$ [diurne] $F_{3,76} = 16,77$ $P < 0,001$ [nocturne]). Cette hyperactivité locomotrice est très marquée lors des premières semaines qui suivent la lésion, puis diminue significativement ($P < 0,001$) à partir de la semaine 15 pour la période nocturne et de la semaine 18 pour la période diurne (Période diurne : effet du facteur semaine, $F_{5,380} = 28,72$ $P < 0,001$, interaction Groupe x Semaine $F_{15,380} = 2,53$ $P < 0,001$; Période nocturne : effet du facteur Semaine $F_{5,380} = 47,22$ $P < 0,001$, interaction Groupe x Semaine $F_{15,380} = 4,62$ $P < 0,001$).

A partir de la 36^{ème} semaine post-lésionnelle, l'activité locomotrice des animaux lésés ne diffère plus significativement de celle des animaux pseudo-opérés, à l'exception des rats ayant reçu l'implantation du gel d'alginate ester. Ces derniers présentent une hyperactivité significative ($P < 0,05$) jusqu'à la fin de l'expérience.

Chez les animaux lésés traités à l'AGP, comparativement à ceux traités au NaCl, on observe une réduction significative de l'activité locomotrice lors des

premières semaines qui suivent la lésion (interaction AGP x Semaine $F_{5,380}=2,33$ $P<0,05$ et AGP x Semaine x Groupe $F_{15,380}=2,29$ $P<0,01$).

En résumé, l'activité locomotrice des animaux, fortement augmentée après la lésion chirurgicale, a tendance à se rétablir spontanément avec le temps, pour devenir quasiment indifférentiable de celle des animaux témoins à partir de 8 à 10 mois post-lésionnels. L'effet bénéfique du traitement à l'AGP est particulièrement marqué au cours des quatre premiers mois post-lésionnels. Par contre, l'implantation des hydrogels d'alginate ester, mais pas d'alginate amide, semble avoir potentialisé les effets de la lésion.

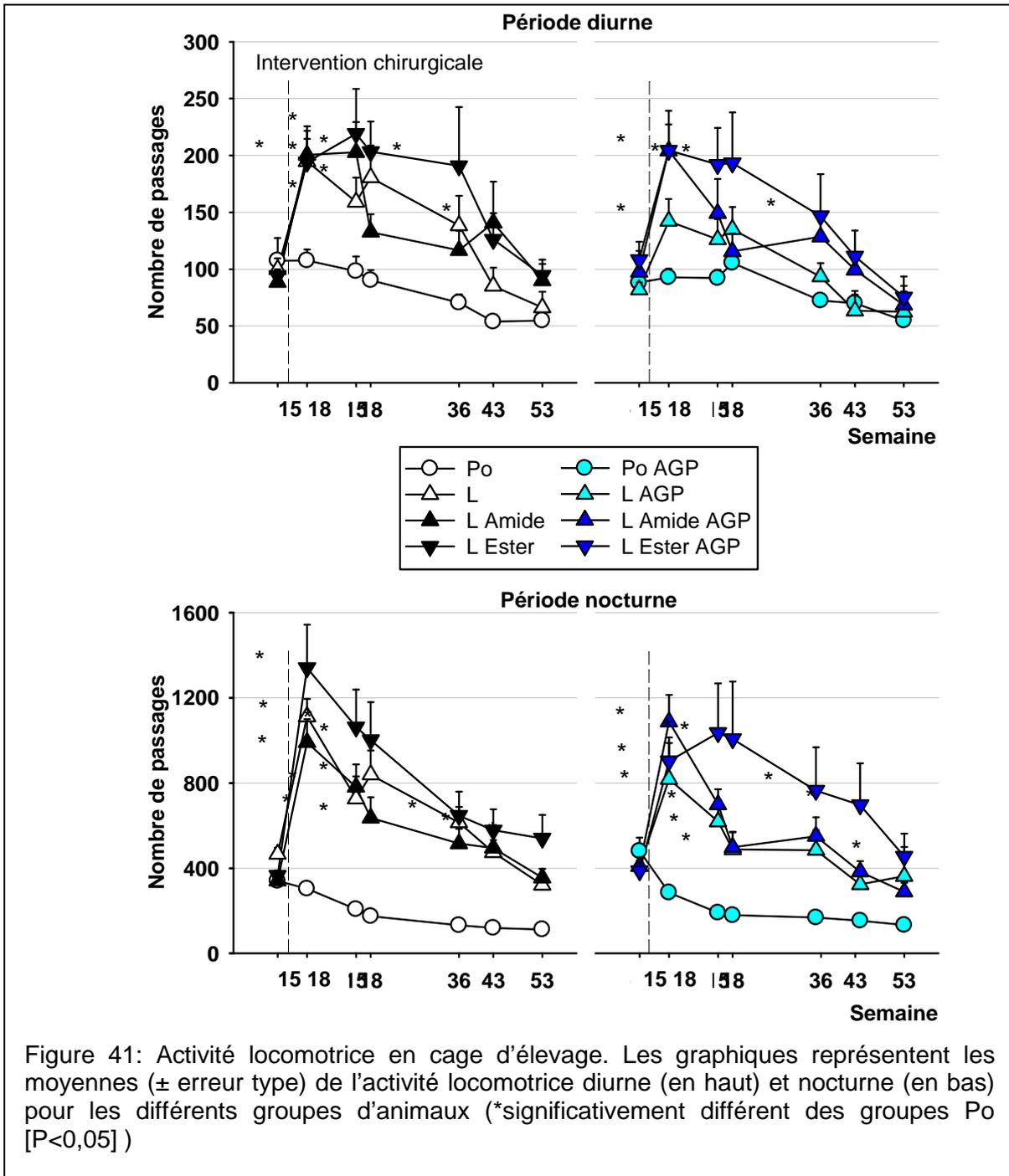


Figure 41: Activité locomotrice en cage d'élevage. Les graphiques représentent les moyennes (± erreur type) de l'activité locomotrice diurne (en haut) et nocturne (en bas) pour les différents groupes d'animaux (*significativement différent des groupes Po [P<0,05])

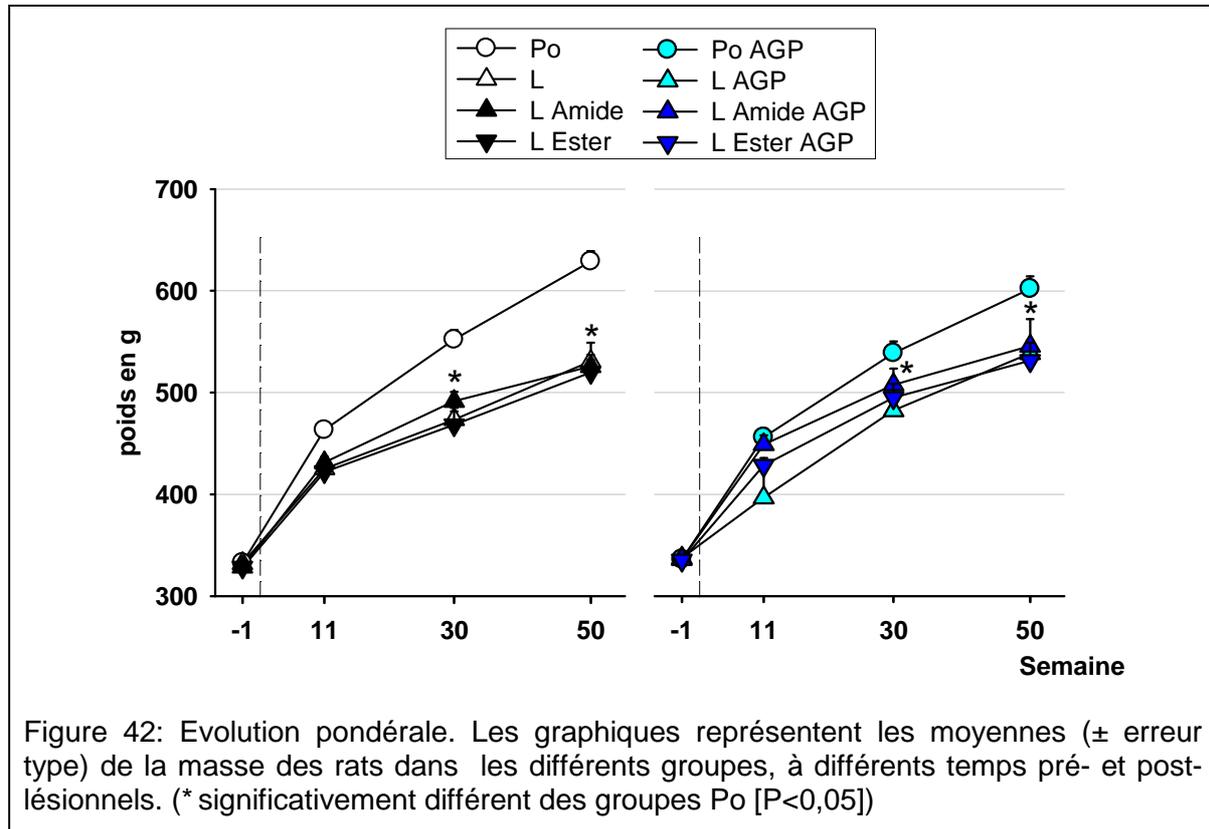
B) Evolution pondérale

La masse des animaux a été relevée 1 semaine avant, et 11, 30 et 50 semaines après la chirurgie, pour suivre l'évolution de la prise pondérale (Figure 42)

L'ensemble des animaux présente une augmentation régulière de poids en fonction du temps (effet du facteur Semaine $F_{2,166}=653,26$). Cependant, chez tous les rats lésés, la masse corporelle reste plus réduite que celle observée chez les

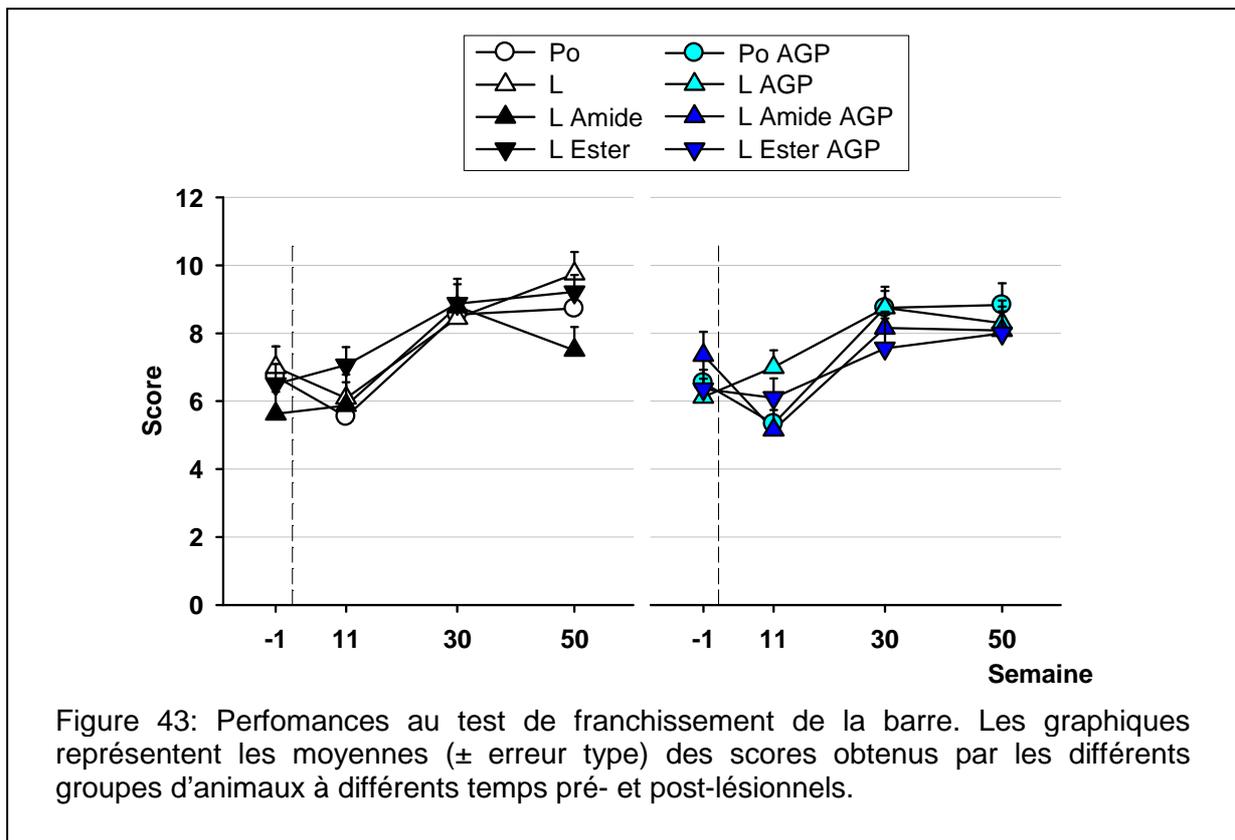
animaux pseudo-opérés (effet majeur du groupe, $F_{3,83}=12,90$ $P<0,001$). L'écart de masse entre les deux groupes devient significatif à partir de 30 semaines ($P<0,001$) (Interaction Groupe x Semaine $F_{1,24}=17,2$ $P<0,001$).

Aucun effet du traitement à l'AGP ou des hydrogels n'a pu être relevé sur l'évolution pondérale des animaux.



C) Coordination sensorimotrice

Les performances au test de franchissement de la barre ont été évaluées 1 semaine avant, et 11, 30 et 50 semaines après l'intervention chirurgicale, pour suivre l'évolution de la coordination sensorimotrice des animaux (Figure 43)



Aucun déficit sensorimoteur particulier n'a été détecté chez les animaux lésés lors du passage de ce test, l'ensemble des rats présentant des scores relativement réguliers et homogènes (effet groupe $F_{3,82}=1,54$ $P=0,20$, interaction AGP x groupe $F_{1,82}=1,07$ $P=0,30$). Il est à noter que l'amélioration des performances, observée pour tous les groupes à partir de la semaine 30, s'explique par un élargissement de la barre. Cet élargissement a été rendu nécessaire par la prise de poids des rats pseudo-opérés, trop gros pour poser leurs pattes correctement sur la barre utilisée en début de protocole (effet du facteur semaine, $F_{2,164}=61,32$ $P<0,001$).

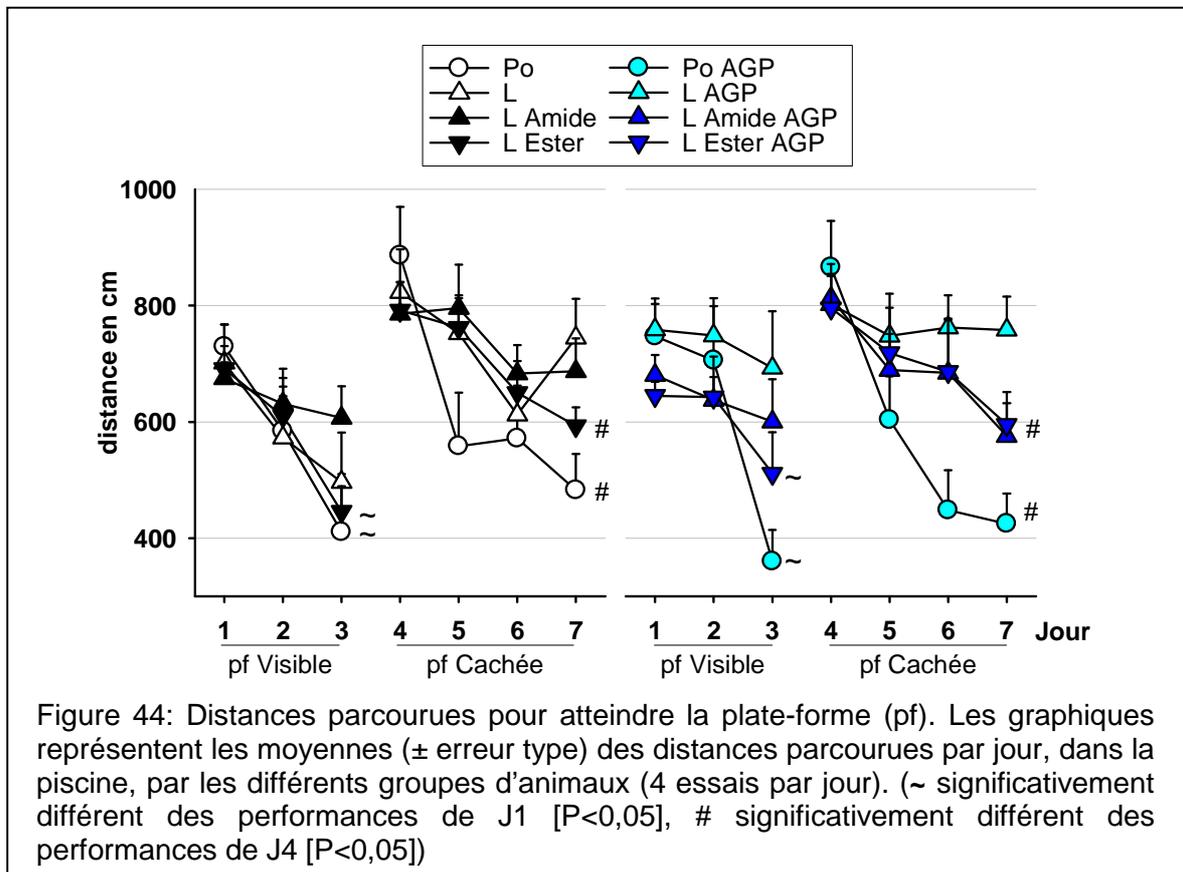
D) Test de mémoire spatiale

Le test de la piscine Morris a été réalisé 44 semaines après la lésion. La plateforme, qui est maintenue à la même position pendant toute la durée du test, est visible les 3 premiers jours puis immergée les 4 jours suivants.

Cette version du test, particulièrement facile, a été choisie pour s'adapter aux déficits cognitifs importants attendus chez les rats lésés.

1) Distances parcourues

Les distances moyennes parcourues dans la piscine entre le point de lâcher et la plate-forme sont illustrées dans la figure 44.

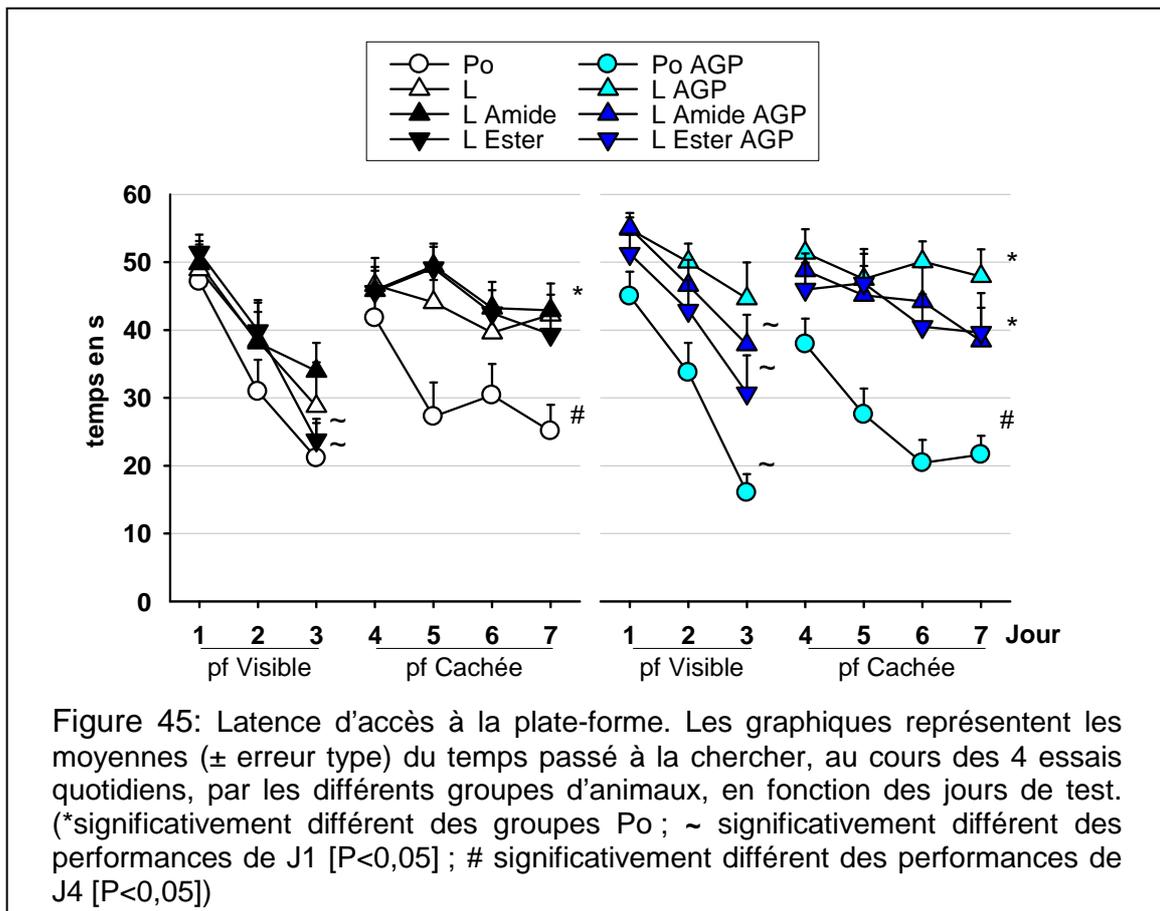


Dans cette version du test, l'apprentissage des animaux pseudo-opérés est très rapide et se manifeste par une réduction quotidienne significative ($P < 0,05$) de la distance parcourue pour atteindre la plate-forme (effet principal Jour $F_{2,162} = 27.7$ $P < 0,001$, interaction Groupe x Jour $F_{6,162} = 2,16$, $P < 0,05$). Si ces animaux éprouvent quelque difficulté à retrouver la plate-forme lors du premier jour de son immersion (J4), ils s'y dirigent sans hésitation lors des essais suivants, avec des performances comparables à celles obtenues lors des derniers jours de test avec la plate-forme visible (effet majeur du groupe, $F_{3,81} = 3,30$ $P < 0,05$; effet du Jour, $F_{3,243} = 28.74$ $P < 0,001$, Interaction Groupe x Jour, $F_{9,243} = 4,36$ $P < 0,001$). Les animaux lésés, quant à eux, présentent de sérieuses difficultés. L'amélioration de leur performance au fil des jours n'est pas significative, que la plate-forme soit visible ou immergée. Les animaux ayant reçu l'implantation d'un hydrogel présentent des performances intermédiaires, qui se démarquent significativement de celles de leurs homologues

sans hydrogels, notamment en ce qui concerne le groupe L ester (Interaction Groupe x Jour, $F_{9,243}=4,36$ $P<0,001$). Dans ce groupe, les animaux présentent des performances comparables à celles des animaux pseudo-opérés lorsque la plate-forme est visible, et des performances détériorées, mais cependant significativement meilleures que celles de leurs homologues sans hydrogel, lorsque la plate-forme est immergée.

2) Latence d'accès à la plate-forme

Les latences moyennes dans la piscine, entre le point de lâcher et la montée sur la plate-forme, sont illustrées dans la figure 45. Les résultats sont globalement comparables à ceux obtenus en considérant la distance parcourue.



Lorsque la plate-forme est visible, on observe une amélioration des performances en fonction des jours de test (Effet jour, $F_{2,162}=91,57$, $P<0,001$), qui se traduit par une diminution de la latence d'accès à la plate-forme chez tous les animaux, à l'exception du groupe L-AGP qui ne ressort pas significativement. La

rapidité pour retrouver la plate-forme est cependant plus marquée chez les rat Po (effet du groupe $F_{3,81}=5,40$, $P<0,05$).

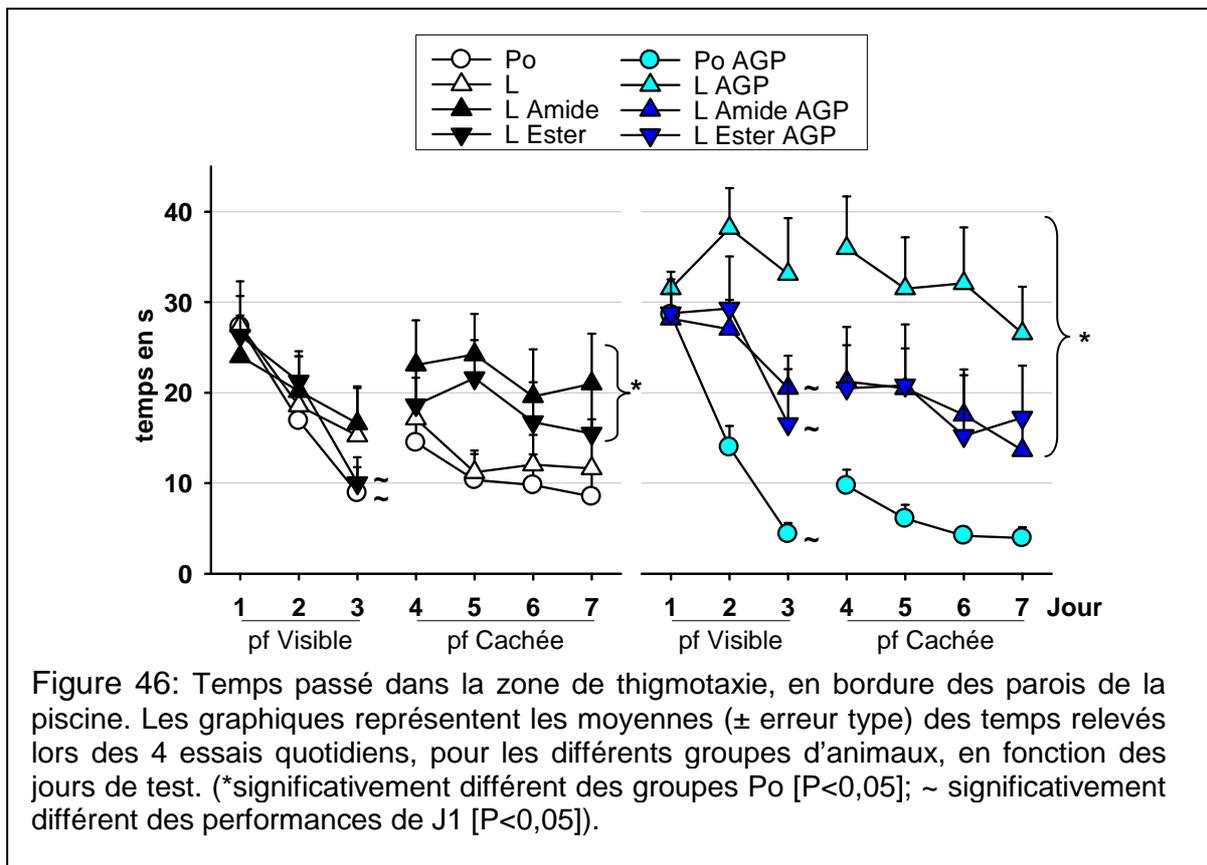
Lorsque la plate-forme est invisible, les animaux pseudo-opérés sont les seuls à améliorer significativement leur performance en fonction du temps, les latences d'accès à la plate-forme étant relativement stables et relativement homogènes pour tous les rats lésés (effet du Groupe, $F_{3,81}=13,75$ $P<0,05$; Jour, $F_{3,243}=14,32$ $P<0,001$; Interaction Groupe x Jour, $F_{9,243}=4,37$ $P<0,001$). Les mauvaises performances des rats L-AGP font ressortir un effet négatif significatif du traitement à l'AGP (Effet AGP $F_{1,61}=6,3$ $P<0,01$), non retrouvé dans les autres groupes ayant reçu ce traitement.

3) Temps passé dans la zone de thigmotaxie

Les animaux présentant un comportement thigmotaxique nagent en bordure de la piscine, sans s'éloigner des parois extérieures. Pendant ce temps, aucune stratégie de recherche de la plate-forme ne peut être développée.

Lors des trois premiers jours du test (Figure 46), le temps passé dans la zone de thigmotaxie diminue globalement pour l'ensemble des animaux, de façon significative dans les groupes Po, L Ester et L Amide (Effet du Jour, $F_{2,162}=39,93$, $P<0,001$, interaction Groupe x Jour $F_{6,162}=3,77$, $P<0,01$).

Lorsque la plate-forme est cachée, le temps passé dans la zone de thigmotaxie est significativement supérieur pour tous les groupes lésés par rapport aux animaux Po (effet majeur du groupe, $F_{3,81}=3,88$, $P<0,05$). L'écart entre le temps relativement réduit passé dans la zone thigmotaxique par les animaux du groupe L, et celui, particulièrement long, des animaux L-AGP, fait ressortir un effet négatif significatif du traitement à l'AGP (Effet AGP plate-forme visible $F_{1,81}=9,83$, $P<0,01$, interaction AGP x Groupe plate-forme invisible $F_{1,82}=2,78$, $P<0,05$).



4) Test de rétention

Lors du dernier essai du 7^{ème} jour, la plate-forme est retirée, et le rat nage 60 secondes dans la piscine (Figure 47). En calculant le temps passé dans le quadrant où se trouvait la plate-forme par rapport à la moyenne du temps passé dans les trois autres quadrants, nous avons déterminé un indice de rappel. Cet indice, élevé chez les animaux pseudo-opérés, est plus faible dans l'ensemble des groupes lésés (effet du groupe, $F_{3,83}=10,10$, $P < 0,001$). Un indice proche de la valeur 1 indique que les animaux n'ont pas de préférence pour un quadrant particulier, et n'ont donc pas appris la localisation de la plate-forme. C'est ce que l'on observe pour tous les groupes de rats lésés, contrairement aux animaux pseudo-opérés dont l'indice de rappel est significativement supérieur à 1 (Po, $P < 0,05$ et Po-AGP, $P < 0,01$).

Aucun effet du traitement à l'AGP n'est détectable sur ce paramètre (AGP, $P=0,29$; l'interaction Groupe x AGP $P=0,07$).

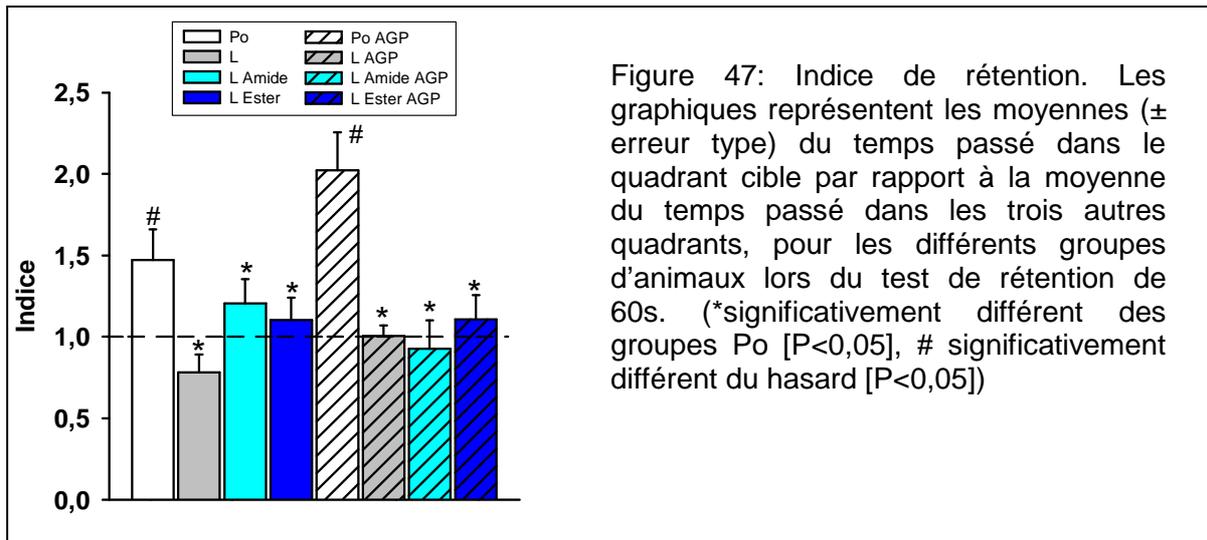


Figure 47: Indice de rétention. Les graphiques représentent les moyennes (\pm erreur type) du temps passé dans le quadrant cible par rapport à la moyenne du temps passé dans les trois autres quadrants, pour les différents groupes d'animaux lors du test de rétention de 60s. (*significativement différent des groupes Po [$P < 0,05$], # significativement différent du hasard [$P < 0,05$])

Pour évaluer la stratégie de recherche de la plate-forme lors de cet essai, nous avons retranché la distance parcourue dans la zone de thigmotaxie à la distance totale parcourue dans la piscine (Figure 48). Tous les rats des groupes L parcourent une distance significativement moins importante dans la partie centrale de la piscine que leurs homologues pseudo-opérés (effet du groupe $F_{3,81} = 3,43$ $P < 0,05$)

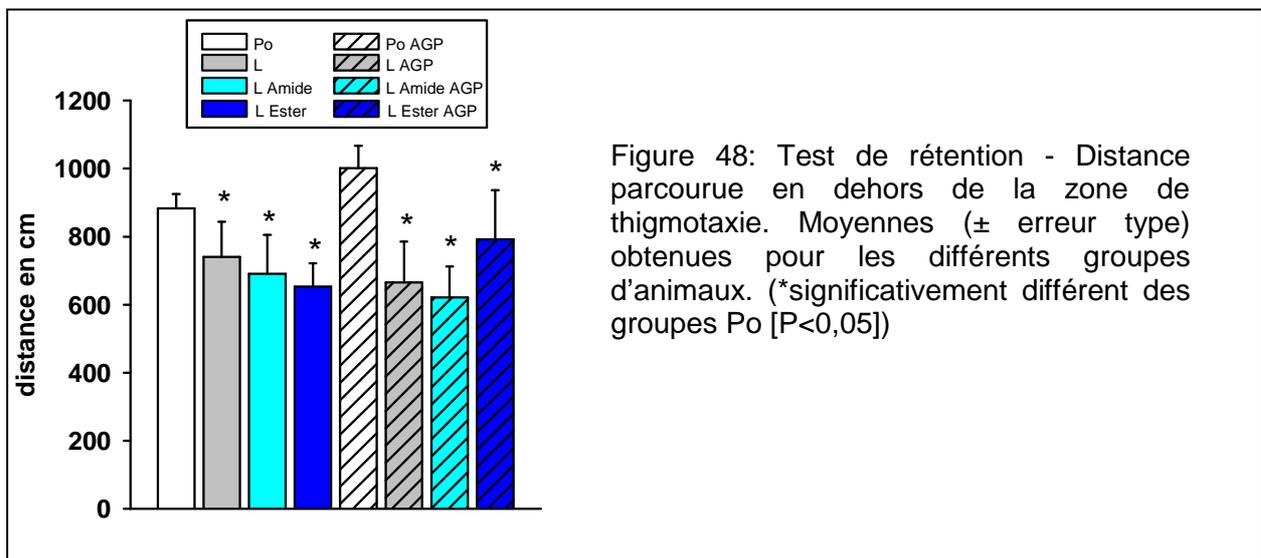


Figure 48: Test de rétention - Distance parcourue en dehors de la zone de thigmotaxie. Moyennes (\pm erreur type) obtenues pour les différents groupes d'animaux. (*significativement différent des groupes Po [$P < 0,05$])

En résumé des résultats obtenus dans la piscine de Morris, on peut remarquer que les performances observées pour les animaux lésés sont très diminuées. Le traitement à l'AGP n'exerce aucun effet bénéfique pour ces animaux. L'implantation des hydrogels semble entraîner une amélioration des performances, mais celle-ci est

indépendante de la mise en place d'une stratégie spatiale, et semble due, plutôt, à une diminution du temps passé dans la zone de thigmotaxie, augmentant ainsi les chances des animaux de retrouver la plate-forme par hasard.

E) Test d'anxiété : labyrinthe en croix surélevé

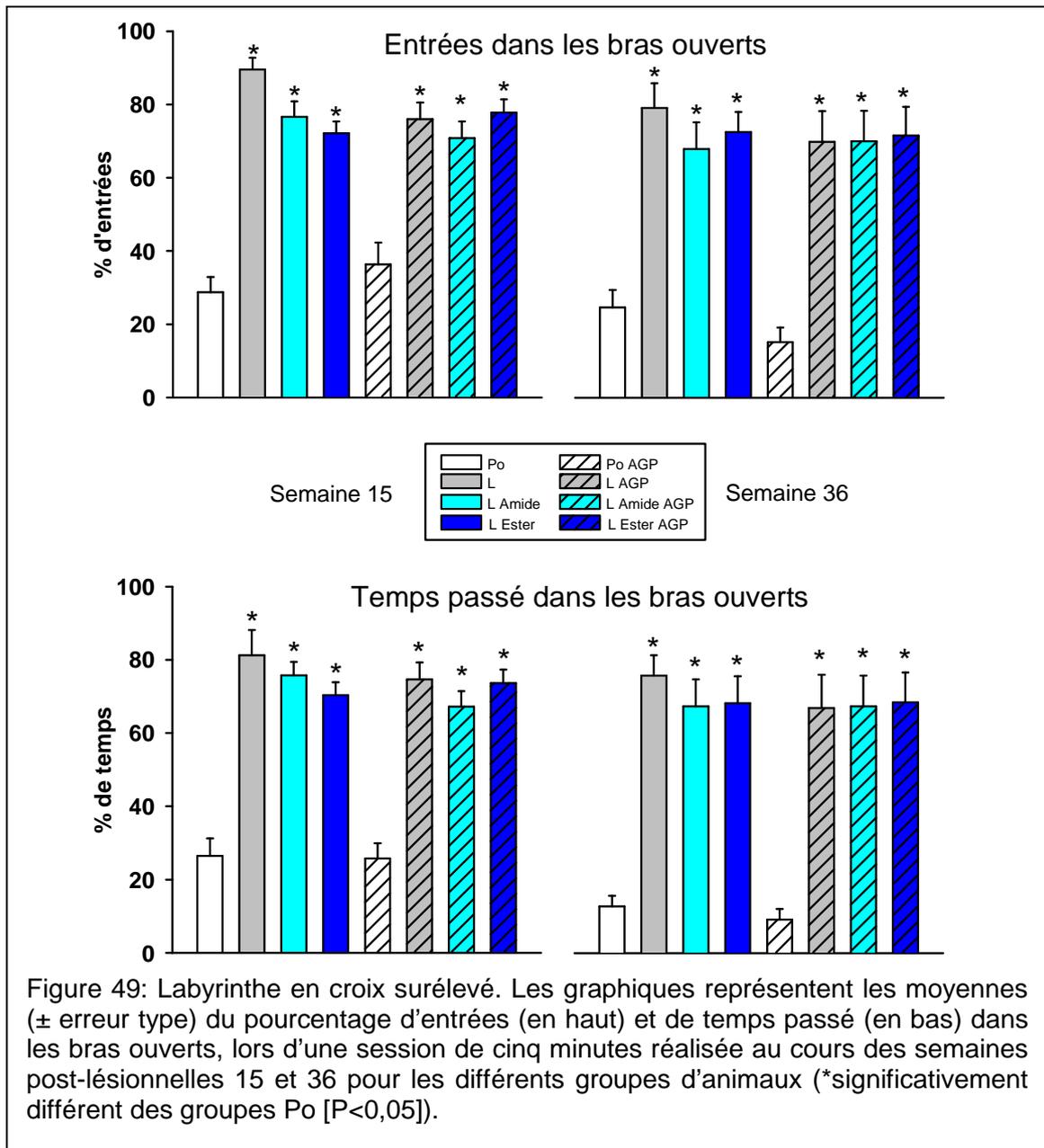
Le niveau d'anxiété des animaux a été évalué 15 et 36 semaines après l'intervention chirurgicale (Figure 49). Les bras ouverts du labyrinthe, sans parois latérales, sont spontanément anxiogènes pour des rats naïfs, qui préfèrent la pénombre et l'espace confiné des bras fermés. Ainsi, le nombre d'entrées dans les bras ouverts par rapport au nombre total d'entrées dans les différents bras, ainsi que le temps passé dans les bras ouverts par rapport au temps total passé dans tous les bras, permettent d'évaluer le niveau d'anxiété des animaux. On considère qu'un comportement traduit une certaine anxiété des animaux lorsque le pourcentage d'entrées ou de temps passé dans les bras ouverts est inférieur à 50%, qui correspond aux performances atteintes par les animaux lorsqu'ils ne sont pas influencés par la nature des bras du labyrinthe au moment de leur exploration et s'y déplacent donc sans marquer de préférence.

Comme l'on s'y attendait, les animaux pseudo-opérés font relativement peu d'entrées dans les bras ouverts, qui représentent 20 à 40 % des entrées totales et sont donc significativement inférieures ($P < 0,05$) à 50%. En revanche, tous les animaux des groupes lésés entrent de façon préférentielle dans les bras ouverts (70 et 90% des entrées totales) (Effet du groupe $F_{3,86} = 52.47$, $P < 0,001$), et dépassent largement le niveau d'anxiolyse ($P < 0,05$).

Pour l'ensemble des groupes, la proportion du nombre de visites dans les bras ouverts diminue lors de la deuxième période de test, près de 5 mois plus tard (effet Semaine $F_{1,86} = 7.03$, $P < 0,01$).

Les résultats concernant le temps passé dans les bras ouverts sont tout à fait similaires (Effet du groupe $F_{3,86} = 62,07$, $P < 0,001$, effet de la semaine $F_{1,86} = 5,76$, $P < 0,05$). Aucune différence significative n'est observée entre les différents groupes de rats lésés.

Ni le traitement à l'AGP, ni l'implantation d'un hydrogel ne semblent avoir influencé les effets induits par la lésion.

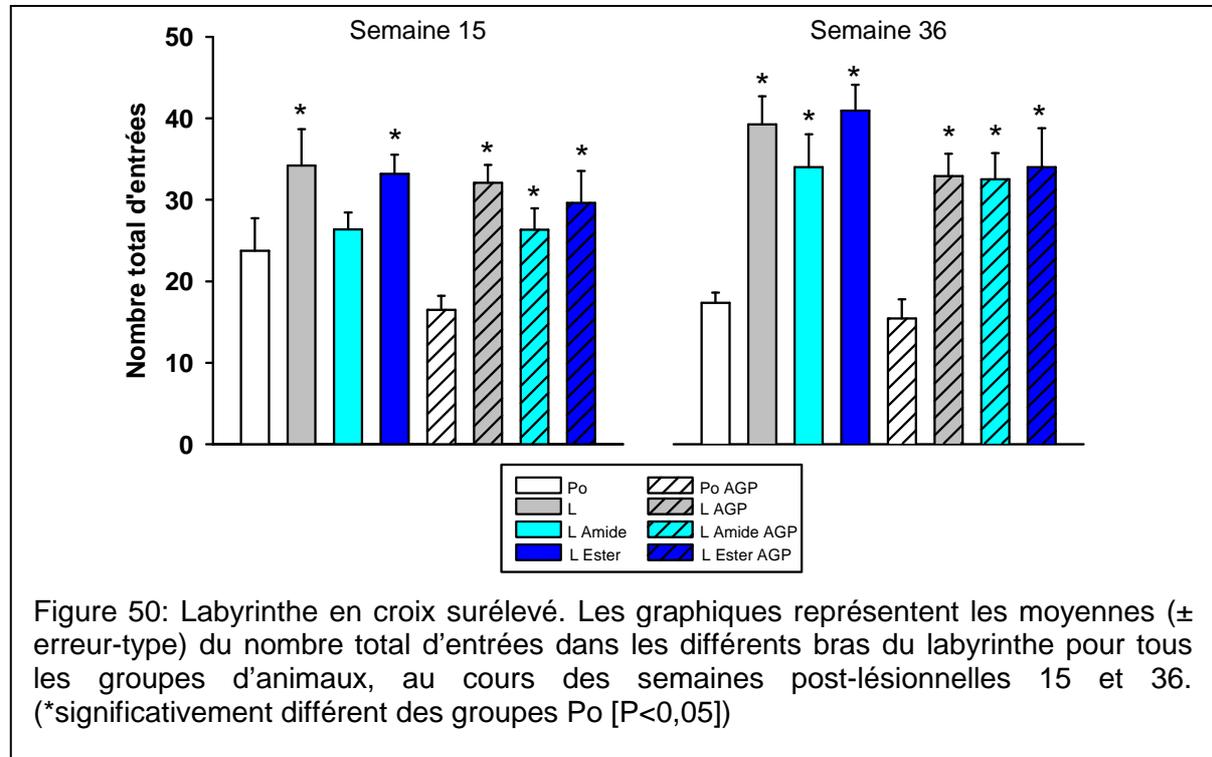


Le labyrinthe en croix surélevé permet également d'évaluer l'activité locomotrice et exploratoire en réponse à un environnement nouveau. Nous avons donc quantifié le nombre total d'entrées dans l'ensemble des bras du labyrinthe (Figure 50).

Les rats pseudo-opérés réalisent une vingtaine d'entrées dans les bras pendant la durée totale du test, alors que les animaux lésés en réalisent plus de 30 (effet du groupe $F_{3,86}=14,96$, $P < 0,001$). Renforçant les données de l'actographie, une augmentation du niveau d'activité locomotrice est ainsi observée chez tous les rats lésés. Cette activité exploratoire face à un environnement nouveau a même tendance à augmenter lors de la deuxième passation du test, alors qu'elle tend à être

réduite chez les rats pseudo-opérés ($P=0,06$).

Aucun effet du traitement à l'AGP ou de l'implantation des hydrogels n'a été observé dans cette expérience.



II) Analyse morphologique

A) Taille de la cavité lésionnelle

L'étude morphologique a été réalisée 54 semaines après l'intervention chirurgicale.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'étendue de la lésion, par évaluation morphométrique de l'aire de la cavité sur des coupes parasagittales à trois niveaux de l'axe médio-latéral (0,40mm, 0,90mm et 1,90mm ; Paxinos & Watson, 1997 ; Figure 51). Nous avons ainsi déterminé l'aire occupée par la lésion par rapport à la surface totale de la coupe de cerveau correspondante.

On peut observer que la taille de la lésion a tendance à diminuer chez les animaux ayant reçu l'implantation d'un l'hydrogel. Cette diminution est renforcée et devient significative avec le traitement à l'AGP, à l'exception de ce qui est observé dans le groupe L-amide AGP (Effet AGP, $F_{1,36}=5,51$ $P < 0,05$).

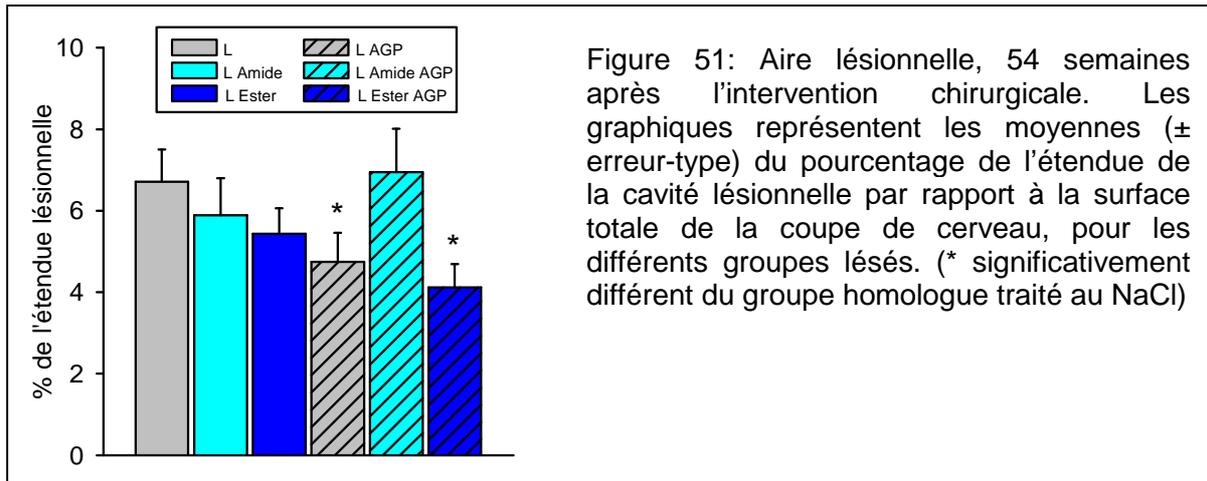


Figure 51: Aire lésionnelle, 54 semaines après l'intervention chirurgicale. Les graphiques représentent les moyennes (\pm erreur-type) du pourcentage de l'étendue de la cavité lésionnelle par rapport à la surface totale de la coupe de cerveau, pour les différents groupes lésés. (* significativement différent du groupe homologue traité au NaCl)

B) Activité cholinergique dans l'hippocampe

Nous avons évalué l'activité de l'AChE à 3 niveaux parasagittaux de l'hippocampe dorsal, pour avoir un indice de l'innervation cholinergique de cette structure (Figure 52).

L'important marquage obtenu après révélation de l'activité de l'AChE dans l'hippocampe dorsal des animaux pseudo-opérés est presque complètement absent chez les rats lésés. La quantification de ce marquage par mesure de la densité optique du produit de réaction montre un effet du groupe ($F_{3,46}=30,10$ $P<0,001$). Aucun effet des traitements n'est observé avec une ANOVA incluant les animaux pseudo-opérés. Cependant, en se focalisant sur les animaux lésés, on peut observer que l'activité de l'AChE est significativement plus importante chez les animaux L ester ($P<0,001$) que dans les deux autres groupes L et L amide (effet du groupe $F_{2,41}= 3,28$ $P<0,05$).

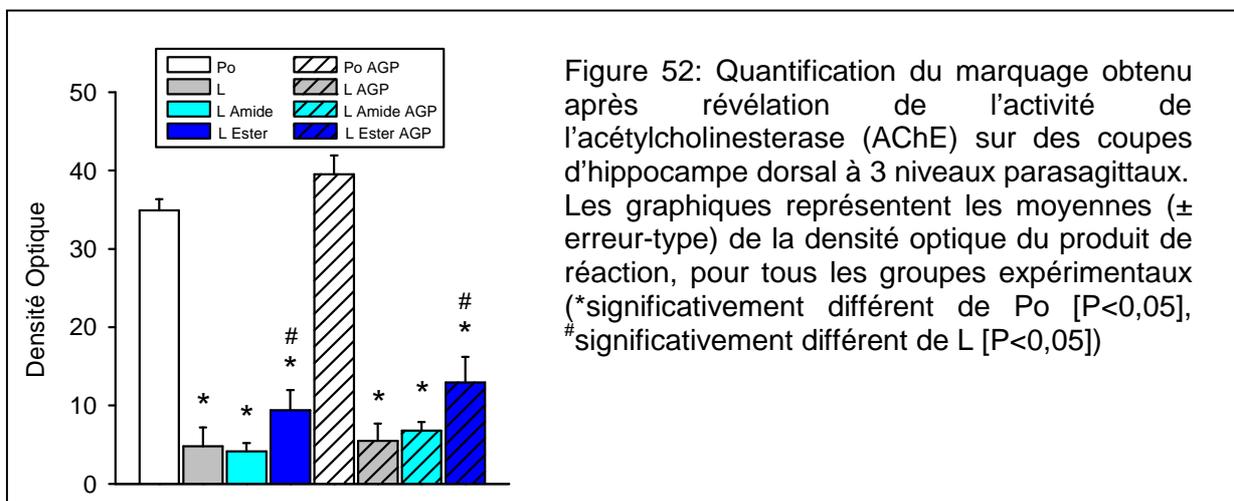


Figure 52: Quantification du marquage obtenu après révélation de l'activité de l'acétylcholinesterase (AChE) sur des coupes d'hippocampe dorsal à 3 niveaux parasagittaux. Les graphiques représentent les moyennes (\pm erreur-type) de la densité optique du produit de réaction, pour tous les groupes expérimentaux (*significativement différent de Po [$P<0,05$], #significativement différent de L [$P<0,05$])

C) Colonisation cellulaire de l'hydrogel

Les hydrogels d'alginate, tels que synthétisés, se sont révélés difficilement compatibles avec les études morphologiques classiques.

Par leur réseau associatif, en l'absence de liaisons covalentes entre les chaînes d'alginate, ils sont en fait solubles dans les milieux aqueux, limitant ainsi les protocoles de fixation des tissus et interdisant les méthodes par perfusion intracardiaque des animaux.

Nous avons alors choisi de congeler les cerveaux sans fixation après euthanasie des animaux, et de fixer les coupes par immersion dans le formol tamponné, en limitant les temps d'incubation et l'agitation des milieux.

Pour limiter au maximum la dégradation des hydrogels d'alginate, nous avons essayé de les stabiliser en rajoutant du calcium dans les solutions. Le tampon phosphate, chélateur de calcium, a été remplacé par un tampon cacodylate, et différentes concentrations de calcium ont été rajoutées dans tous les milieux. Malheureusement, la présence de calcium perturbe les interactions antigène/anticorps, et seule la concentration de 5 mM a pu être retenue pour nos marquages immunocytochimiques.

Dans ces conditions, nous avons pu réaliser quelques immunomarquages, en particulier pour la GFAP, marqueur des cellules gliales, et les filaments phosphorylés (marqueur des axones). Les marquages concernant la ChAT, la tyrosine hydroxylase et le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VACHT) se sont révélés inobservables.

54 semaines après leur implantation *in vivo*, des fragments d'hydrogel sont retrouvés en contact étroit avec le tissu hôte, en périphérie de la cavité lésionnelle. Par contre, l'intérieur de la cavité n'est jamais comblé.

Les marquages immunocytochimiques soulignent plusieurs éléments intéressants (Figure 53). L'immunoréactivité de la GFAP révèle, chez tous les groupes lésés traités à l'AGP, une diminution de la cicatrice gliale en bordure de lésion. Le traitement à l'AGP permet également de stimuler la colonisation de l'hydrogel amide par des neurites, révélés par le marquage des neurofilaments phosphorylés. Dans l'ensemble, l'hydrogel ester semble moins favorable à la pénétration de matériel biologique.

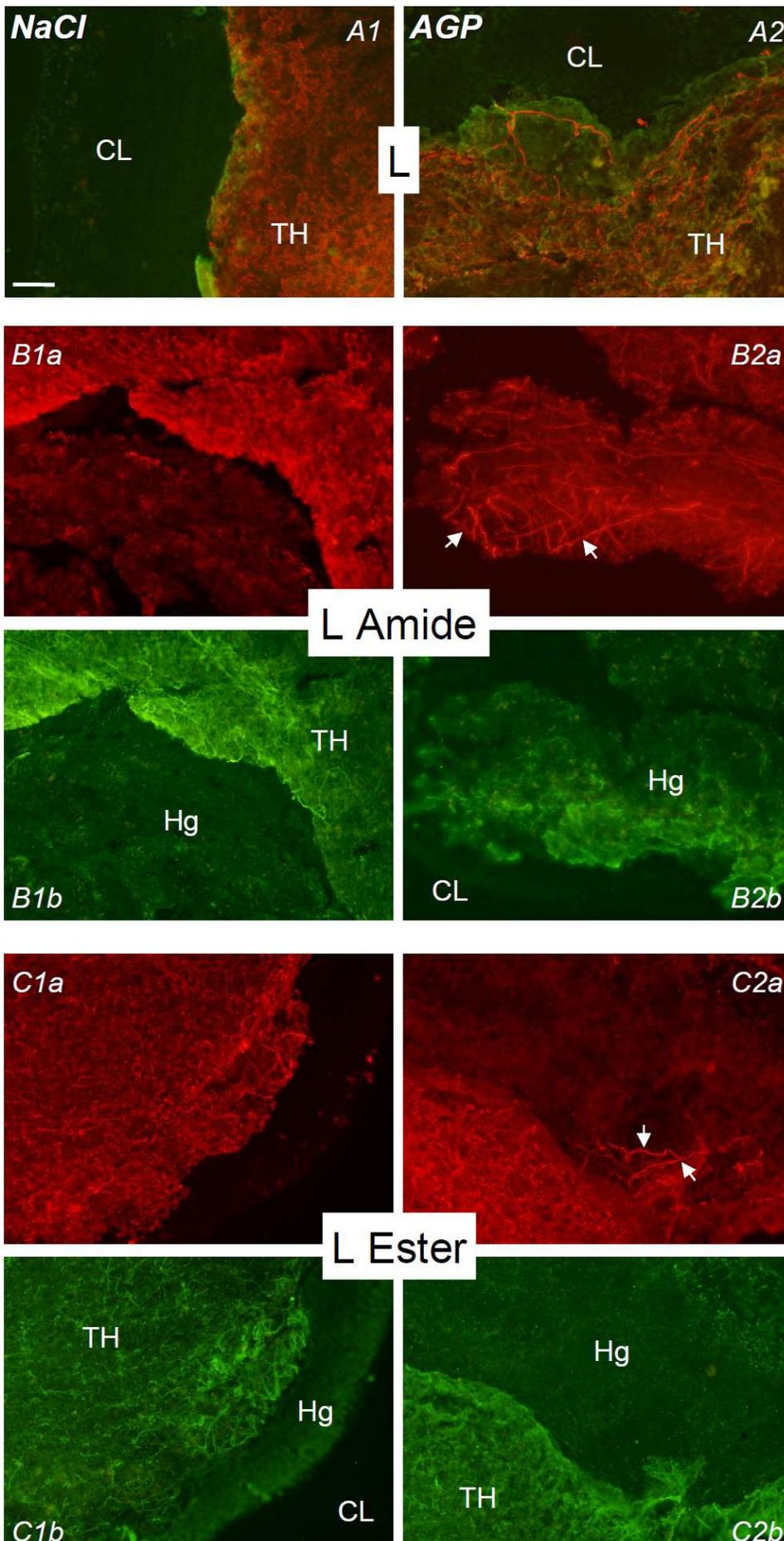


Figure 54:

Immunomarquages de la GFAP (en vert) et des neurofilaments phosphorylés (en rouge) en bordure de la cavité lésionnelle, sur des coupes parasagittales de cerveau de rat, 54 semaines après l'intervention chirurgicale.

A. Superposition des marquages. Animaux lésés (L), traités au NaCl (1) ou à l'AGP (2). Notez, dans le tissu hôte (TH), la présence d'une accumulation de cellules gliales, marquées en vert, en bordure de la cavité lésionnelle (CL), et l'infiltration de neurites (marqués en rouge) entre ces cellules.

B et C. Animaux ayant reçu l'implantation d'un hydrogel d'alginate (Amide, B ; Ester, C). La cicatrice gliale est plus importante au contact de l'hydrogel Amide (B1b) que de l'hydrogel Ester (C1b). Le traitement AGP stimule la colonisation des hydrogels par des neurites (flèches) et des cellules gliales, surtout en ce qui concerne l'hydrogel Amide (B2a)

(Barre d'échelle 100µm).

Après 54 semaines d'implantation, les hydrogels d'alginate présentent une bonne interface avec le tissu hôte, suggérant qu'au moment de leur implantation ils avaient des propriétés physico-chimiques appropriées pour épouser parfaitement les parois de la cavité lésionnelle. Bien que colonisés par des cellules gliales et des neurites au voisinage du tissu hôte chez les animaux traités à l'AGP, ils ne permettent pas de combler l'ensemble de la cavité lésionnelle, ce qui rend impossible leur fonction de pont de régénération.

Des travaux d'optimisation physico-chimique de ces hydrogels étaient donc indispensables, notamment pour réduire la biodégradabilité *in vivo*.

En attendant que les chimistes du LPCM de Nancy améliorent la résistance mécanique des hydrogels d'alginate, nous avons recherché un autre biomatériau, capable de s'adapter parfaitement à la paroi de la cavité lésionnelle au moment de l'implantation et présentant une bonne stabilité dans le temps.

Nous nous sommes orientés vers le Matrigel qui, liquide à 4°C, et donc injectable, devient solide avec l'augmentation de la température, une fois implanté dans la cavité lésionnelle. Nos essais préliminaires ont montré que le Matrigel est bien toléré *in vivo* sans provoquer d'inflammation, qu'il épouse les parois de la cavité après un mois d'implantation, qu'il semble mécaniquement plus résistant que les hydrogels d'alginate, et se prête avec plus de facilité aux protocoles de préparation des tissus pour les études morphologiques.

Pour notre dernière expérience d'implantation à long terme, nous avons donc utilisé le Matrigel en temps que pont de régénération pour combler la cavité lésionnelle.

Partie III

Récupération fonctionnelle et structurale après traitement combiné d'AGP, de Matrigel et de facteurs de régénération (RGTA), en fonction des conditions d'élevage en environnement Standard ou Enrichi.

Cette partie de mes travaux avait pour objectif de reproduire l'expérience précédente en essayant de renforcer et/ou de compléter les effets du traitement à l'AGP par sa combinaison avec d'autres traitements.

Deux approches complémentaires, ciblant les facteurs neurotrophiques, ont ainsi été rajoutées. La première concerne l'enrichissement des conditions d'élevage post-opératoire, connu pour ses propriétés neuroprotectrices et stimulantes de la plasticité cérébrale. La deuxième consiste en l'administration de RGTA, molécules capables de rétablir la signalisation moléculaire au niveau du site de lésion et empêchant la formation d'un tissu cicatriciel. Les RGTA n'ayant encore jamais été testés dans un modèle de lésion traumatique du SNC, nous avons étudié à la fois leurs effets propres et leurs effets combinés au traitement à l'AGP.

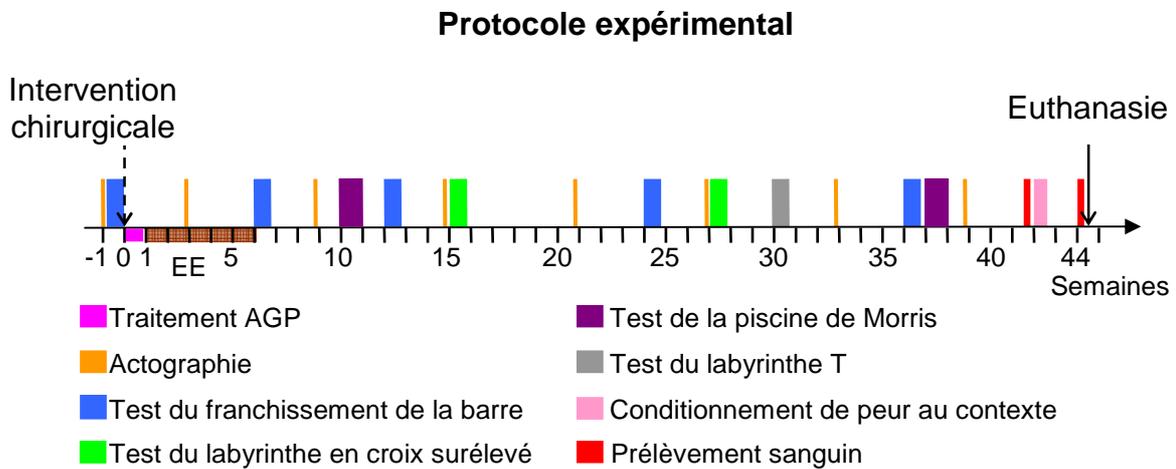
Les hydrogels d'alginate ont été remplacés par du Matrigel, en guise de matrice permissive comblant la cavité lésionnelle.

Enfin, tous les groupes expérimentaux ont été scindés en deux sous-groupes, définis par la condition d'élevage post-opératoire en milieu standard ou enrichi.

14 groupes expérimentaux ont ainsi été constitués:

Lésion	Traitement NaCl / AGP	Traitement NaCl / RGTA	Matrigel	Groupe A	Groupe B + EE
Pseudo-opéré	NaCl (excipient)	NaCl (excipient)	X	Po	Po-EE
	AGP	RGTA		Po-AR	Po-AR-EE
Lésé	NaCl	NaCl	Sans	L	L-EE
		NaCl	Matrigel	LM	LM-EE
		RGTA	Matrigel	LMR	LMR-EE
	AGP	NaCl	Matrigel	LMA	LMA-EE
		RGTA	Matrigel	LMAR	LMAR-EE

Les animaux ont été suivis pendant 44 semaines sur le plan comportemental selon le protocole expérimental décrit ci-dessous, avant d'être euthanasiés en vue de l'analyse histologique et immunohistochimique des cerveaux.



I) Analyse Comportementale

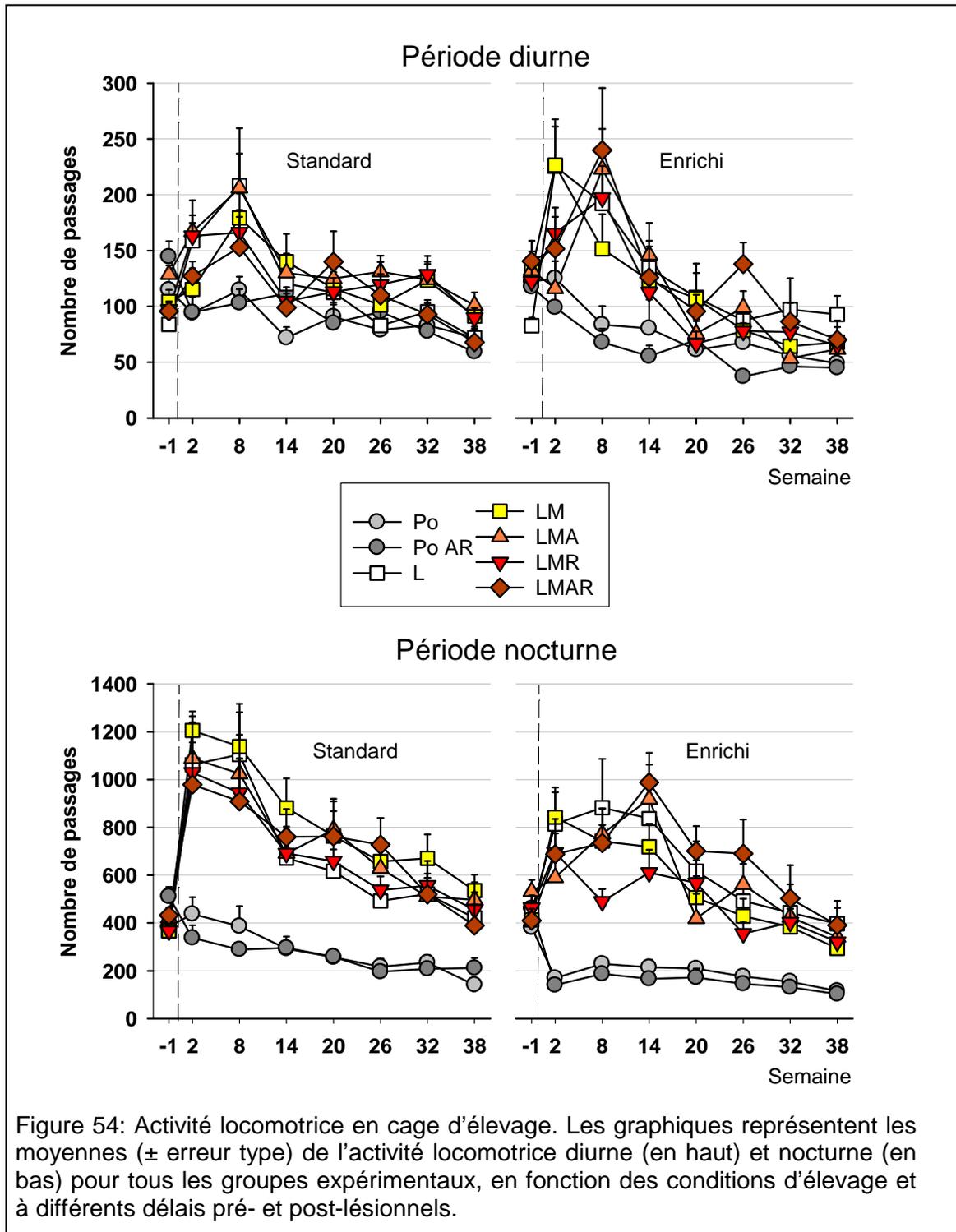
A) Mesure de l'activité locomotrice

L'activité locomotrice est enregistrée en cage de élevage, une semaine avant et à 1, 2, 8, 14, 20, 26, 32 et 38 semaines post-lésionnelles, pendant les phases diurnes et nocturnes du nyctémère (Figure 54).

Après l'intervention chirurgicale, on retrouve chez les rats lésés l'exacerbation de l'activité locomotrice lors des périodes diurnes et nocturnes (effet majeur du groupe, $F_{6,102}=6,29$ $P<0,001$ [Diurne] $F_{6,104}=11,10$ $P<0,001$ [Nocturne]). Comme dans l'expérience précédente, l'activité des animaux est très élevée lors des premières semaines qui suivent la lésion, puis diminue significativement à partir de la semaine 8 ($P<0,01$) pour la période diurne, et de la semaine 14 pour la période nocturne ($P<0,05$), avant de se stabiliser jusqu'à la fin de l'expérience (effet du temps, $F_{6,612}=34,59$ $P<0,001$ [Diurne], $F_{6,624}=57,55$ $P<0,001$ [Nocturne] ; interaction Groupe x Semaine, $F_{36,612}=1,75$ $P<0,01$ [Diurne], $F_{36,624}=2,61$ $P<0,001$ [Nocturne]).

Aucun des traitements (AGP, RGTA, Matrigel) ou combinaison de traitements ne semble exercer d'effet significatif. Tous les animaux lésés sont significativement hyperactifs par rapport aux rats pseudo-opérés. Par contre, chez les animaux lésés

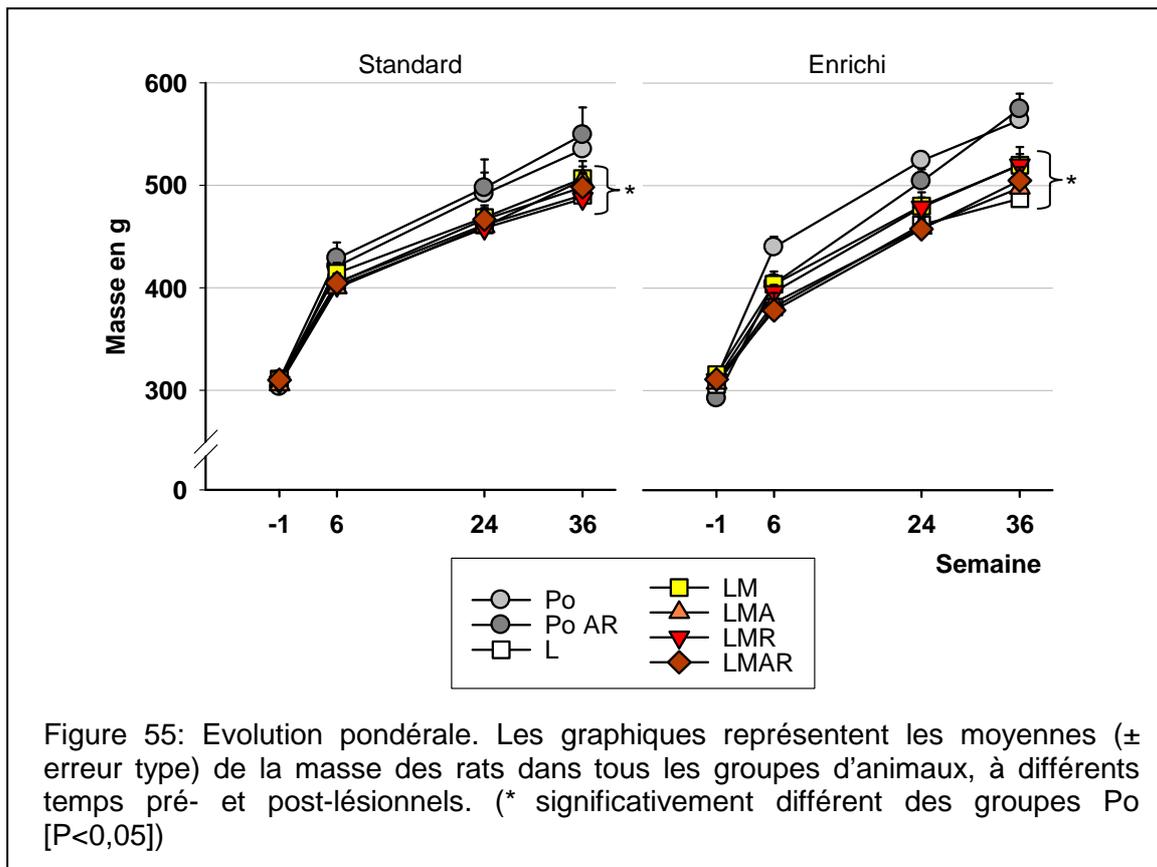
élevés en milieu enrichi, l'hyperactivité nocturne est significativement diminuée (Elevage $F_{1,104}=8,71$, $P<0,001$) pendant les 5 premiers mois qui suivent l'intervention chirurgicale. Elle se nivèle ensuite avec celle des animaux élevés en milieu standard (Interaction Elevage x Semaine, $F_{6,624}=8,68$, $P<0,001$).



B) L'évolution pondérale

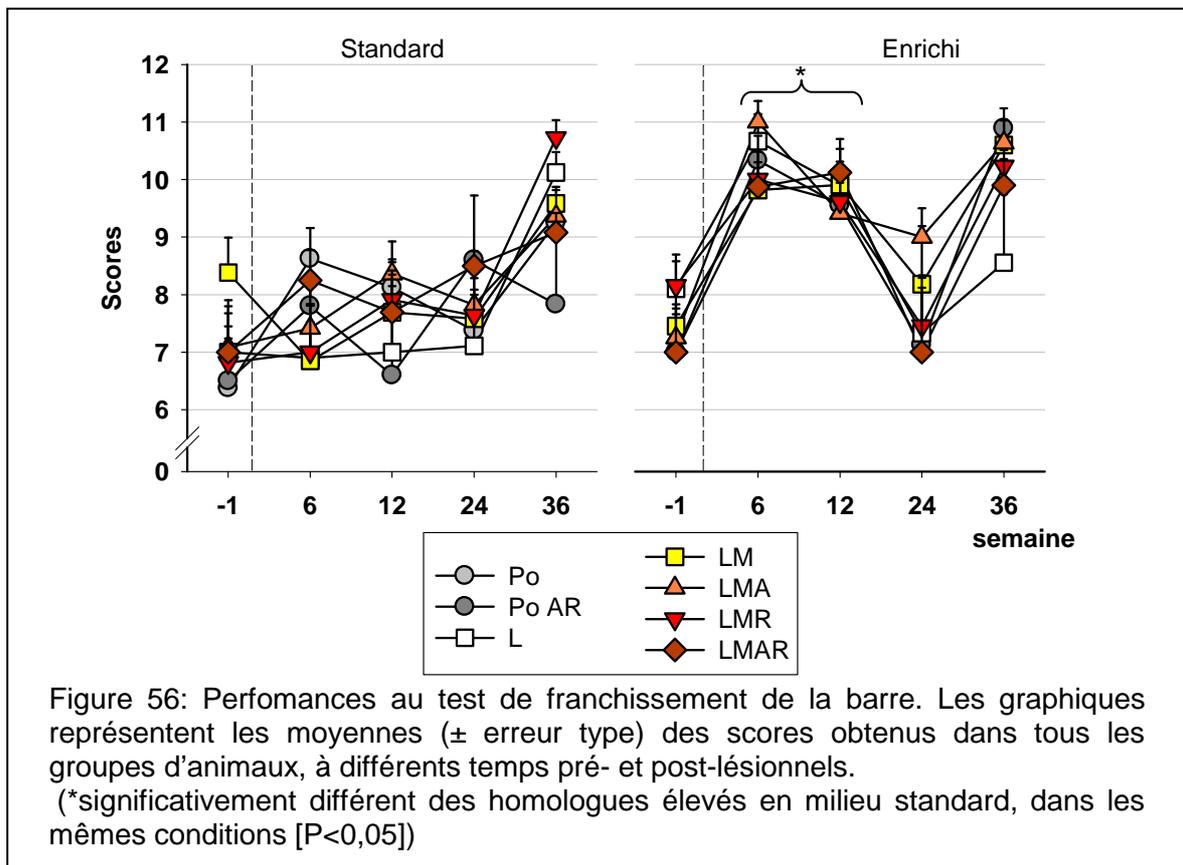
La masse des animaux a été relevée une semaine avant et 6, 24, 36 semaines après la chirurgie pour suivre l'évolution pondérale (Figure 55).

L'ensemble des animaux présente une augmentation régulière de poids en fonction du temps (Effet du temps $F_{2,216}=911,2$ $P<0,001$). Cependant, chez tous les animaux lésés, la masse corporelle reste plus réduite que celle observée chez leurs homologues pseudo-opérés (effet du groupe, $F_{6,108}=3,03$, $P<0,01$).



C) Coordination sensorimotrice

Les performances au test du franchissement de la barre ont été notées 1 semaine avant et 6, 12, 24, 36 semaines après la chirurgie dans le but d'évaluer la coordination sensorimotrice des animaux (Figure 56).



Comme dans l'expérience précédente, aucun déficit sensorimoteur marqué n'apparaît chez les animaux lésés, qui ne présentent pas de chute de score au test de franchissement de la barre ($F_{6,101}=0,2$, $P=0,97$). L'élevage en environnement enrichi améliore les performances de tous les groupes (effet de l'élevage, $F_{1,101}=42,24$ $P < 0,001$) au cours des 5 premiers mois post-lésionnels (interaction Temps x Elevage [$F_{3,303}=14,63$ $P < 0,001$]).

La prise de poids des animaux (surtout des Po) et leurs difficultés à marcher sur la barre a nécessité l'élargissement de la barre lors de la 36^{ème} semaine post-lésionnelle, entraînant une augmentation significative des performances chez tous les animaux (effet du temps, $F_{3,303}= 14,63$, $P < 0,001$).

D) Evaluation du niveau d'anxiété

Le niveau d'anxiété des animaux a été évalué 15 et 36 semaines après l'interaction chirurgicale, dans le labyrinthe en croix surélevé (Figure 57).

A notre surprise, et contrairement aux résultats obtenus lors de l'expérience précédente, les animaux pseudo-opérés n'ont manifesté, lors de la première session de ce test réalisée à la 15^{ème} semaine post-lésionnelle, aucune anxiété particulière envers les bras ouverts du labyrinthe, pourtant normalement spontanément

anxiogènes pour des rats naïfs. Leur score d'entrées dans ces bras avoisine en effet 50%. Par contre, et en accord avec les résultats précédents, tous les rats lésés manifestent une préférence significative pour les bras ouverts (Effet du groupe $F_{6,120}=12,64$, $P<0,001$), dans lesquels ils réalisent 80 à 90% d'entrées.

Pour augmenter le caractère anxigène du test, lors de la deuxième session réalisée près de 3 mois plus tard, nous avons triplé l'intensité lumineuse éclairant les bras ouverts (de 10 à 30 Lux). Seuls les animaux pseudo-opérés élevés en milieu enrichi ont alors manifesté un comportement d'évitement envers ces bras, avec un nombre d'entrées significativement ($P<0,05$) inférieur à 50% (effet de l'Elevage $F_{1,120}=24,05$ $P<0,001$, interaction Semaine x Elevage $F_{1,120}=25,69$ $P<0,001$, interaction Groupe x Elevage x Semaine $F_{6,120}=2,18$ $P<0,05$). Il faut cependant noter une diminution du nombre d'entrées dans les bras ouverts pour tous les animaux élevés en milieu enrichi.

Les résultats concernant le temps passé dans les bras ouverts sont tout à fait similaires (Effet majeur du groupe, $F_{6,120}=16,66$ $P<0,001$; effet de l'Elevage, $F_{1,120}=22,64$ $P<0,001$; effet Semaine, $F_{1,120}=18,67$, $P<0,001$; interaction Semaine x Elevage, $F_{6,120}=19,23$, $P<0,001$).

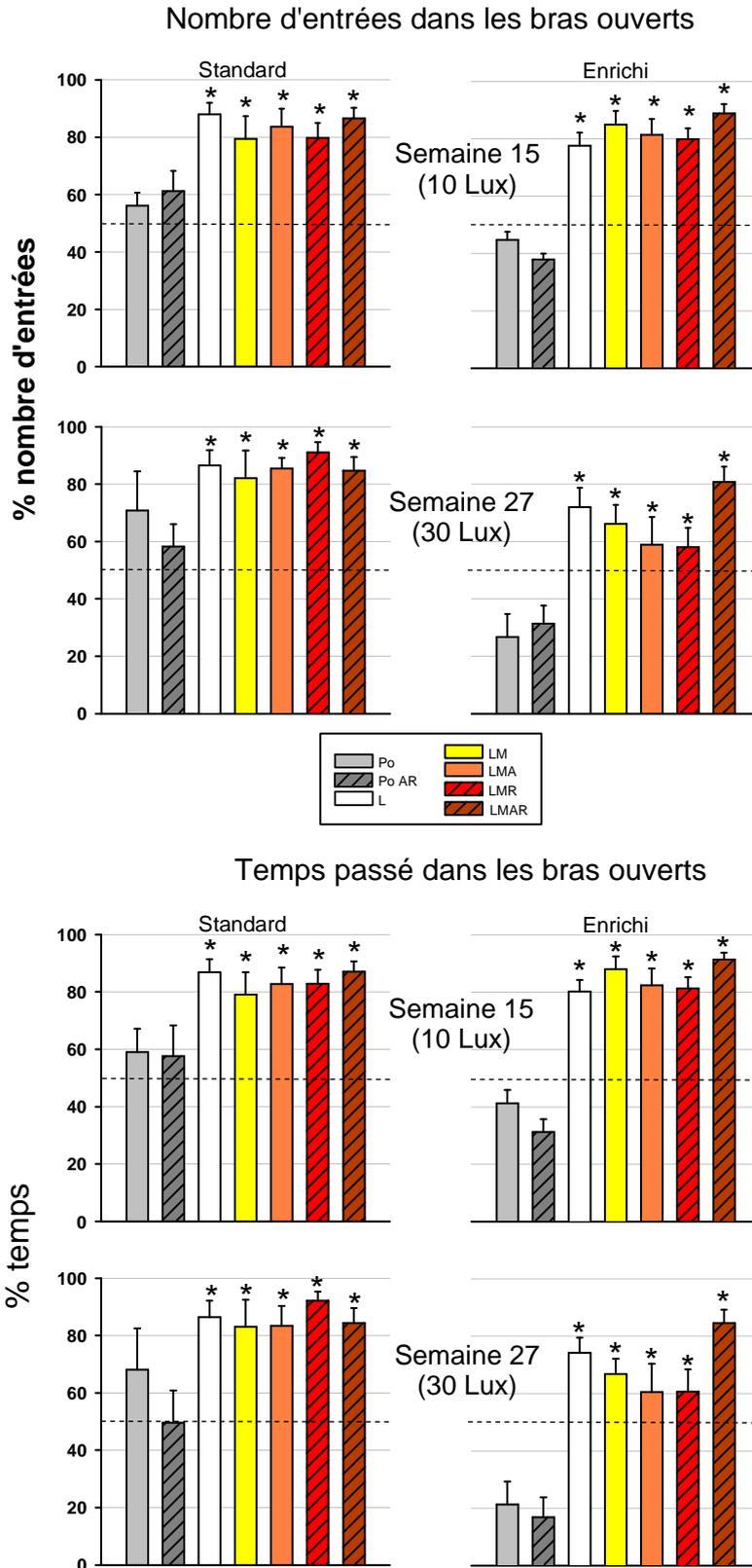
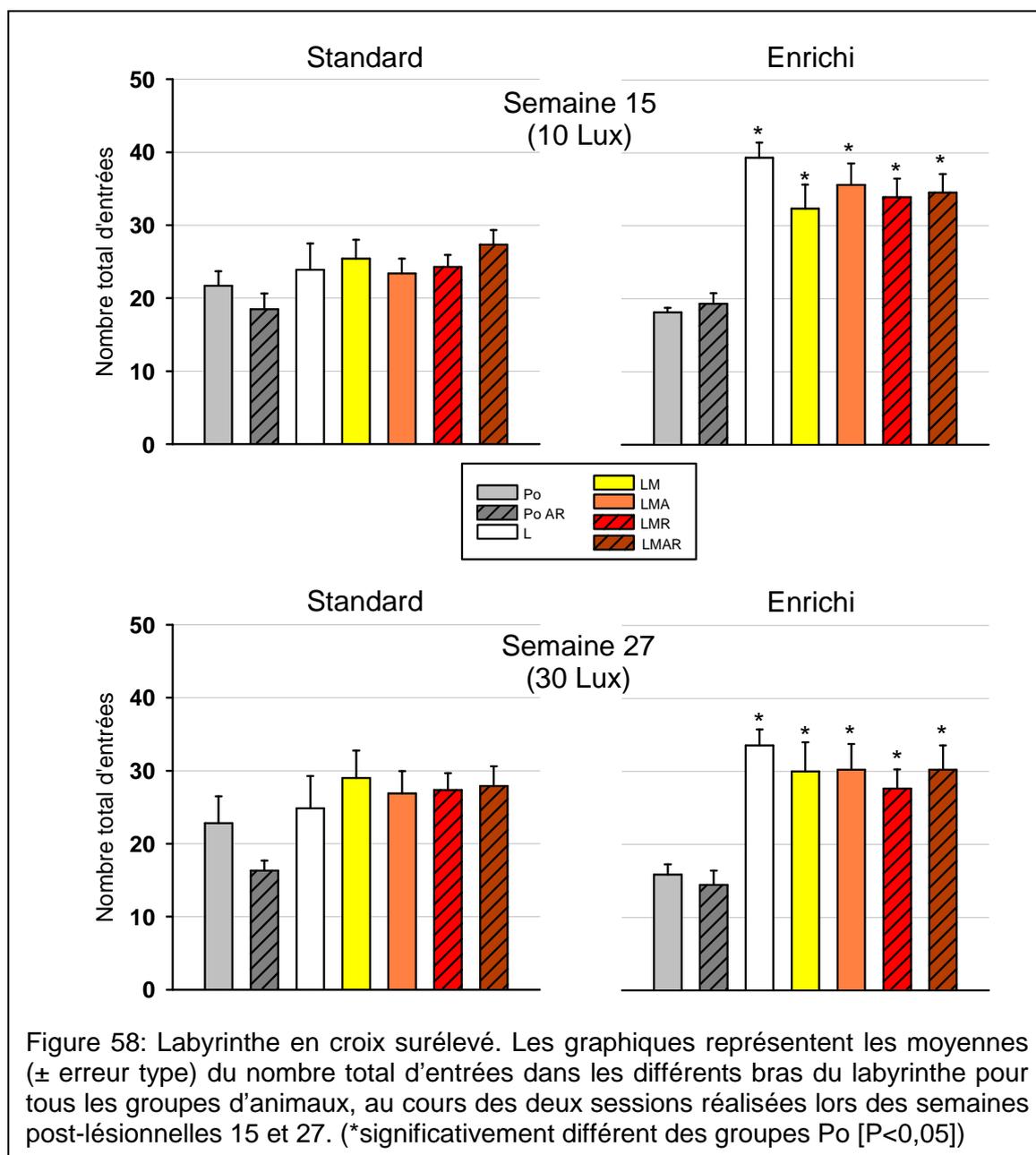


Figure 57: Labyrinthe en croix surélevé. Les graphiques représentent les moyennes (\pm erreur type) des pourcentages d'entrées (en haut) et de temps passé dans les bras ouverts (en bas) par les différents groupes d'animaux, lors des deux sessions de passation du test (semaines post-lésionnelles 15 et 36). (*significativement différent des groupes Po [$P < 0,05$])

Pour évaluer l'activité exploratoire en réponse à un environnement nouveau, nous avons quantifié le nombre d'entrées dans l'ensemble des bras du labyrinthe (figure 58).

Alors que l'activité exploratoire est à peu près identique pour tous les groupes élevés en milieu standard lors des deux sessions de test, celle des animaux lésés élevés en milieu enrichi est supérieure à celle de leurs homologues pseudo-opérés (effet du groupe $F_{6,120}=6,99$, $P<0,001$; effet de l'élevage, $F_{1,120}=7,66$ $P<0,001$; effet Semaine, $F_{1,120}=6,74$, $P<0,05$; interaction Semaine x Groupe, $F_{1,120}=21,06$ $P<0,001$; interaction Traitement x Elevage proche de la significativité $F_{6,120}=2,10$, $P=0,057$).



E) Test de mémoire spatiale

Le test de la piscine Morris, dans la même version simplifiée que celle utilisée dans l'expérience précédente, a été réalisé 10 et 37 semaines après l'intervention chirurgicale. La place de la plate-forme a été changée entre les deux sessions.

1) Distances parcourues

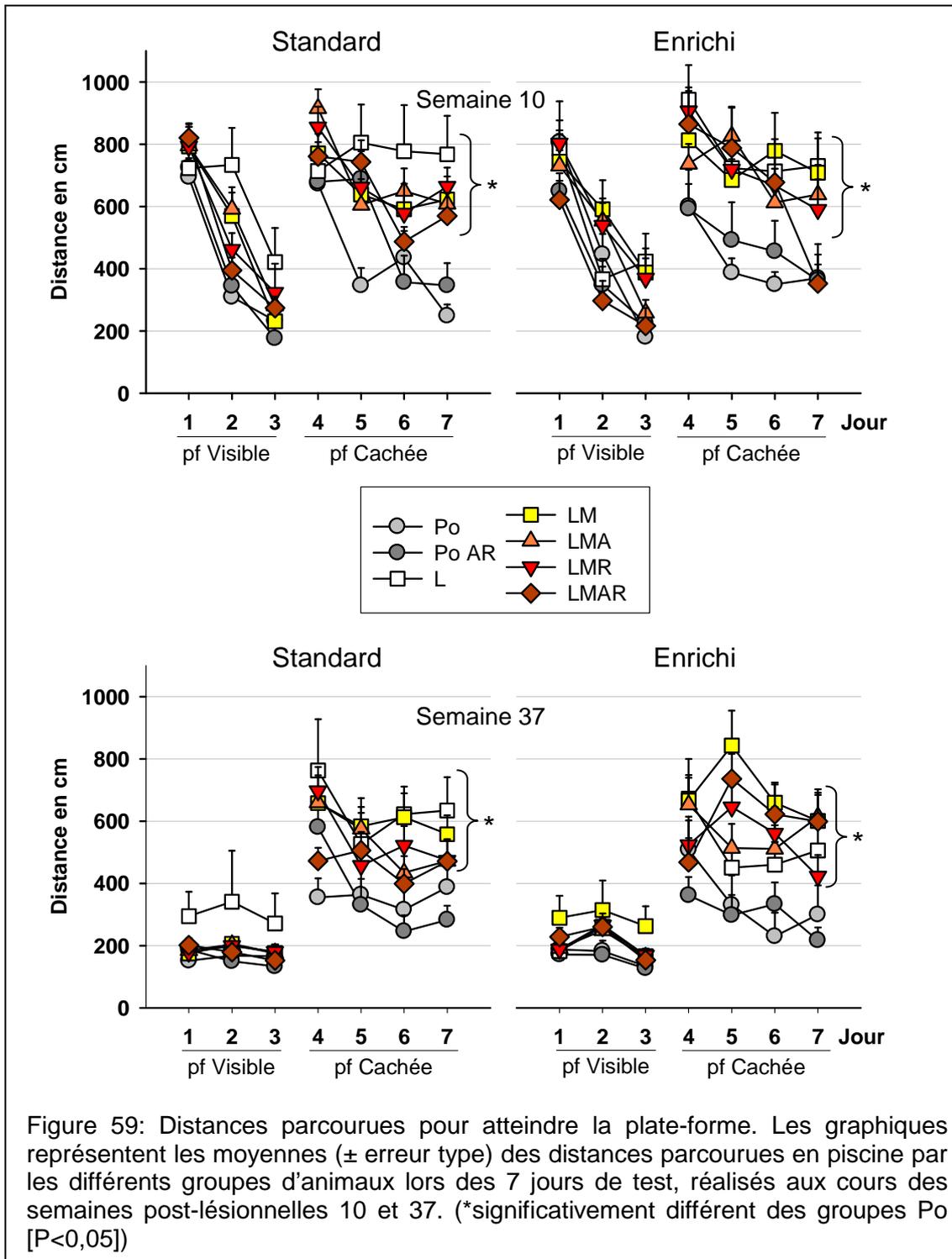
Lors de la première session du test, réalisée à la 10^{ème} semaine post-lésionnelle, les performances de tous les groupes d'animaux s'améliorent en fonction des jours (effet du Jour, [plate-forme visible, $F_{2,256}=214,80$, $P<0,001$], [plate-forme cachée $F_{3,372}=24,01$, $P<0,001$]).

Lorsque la plate-forme est visible, les performances des groupes lésés sont globalement comparables à celles de leurs homologues pseudo-opérés, à l'exception des animaux du groupe L dont la distance est significativement supérieure ($P<0,05$) à celle des animaux Po (effet groupe, $F_{6,122}=2,82$ $P<0,05$).

Quand la plate-forme est invisible, tous les animaux lésés parcourent une distance plus importante que celle des groupes pseudo-opérés (effet majeur du groupe, $F_{6,120}=8,82$ $P<0,001$). Cependant, lors du dernier jour du test, les animaux LMAR élevés en milieu enrichi présentent des performances très améliorées, qui sont similaires à celles des animaux pseudo-opérés et différent significativement de celles des autres groupes lésés (L, LM, LMA, LMR, $P<0,05$). Cet effet n'est cependant pas retrouvé lors de la deuxième période du test, en semaine post-lésionnelle 37.

Lors de la répétition du test, alors que la plate-forme a changé de place, tous les animaux améliorent leur performance ([plate-forme visible] effet du Temps ; $F_{1,120}=50,37$, interaction Temps x Traitement, $F_{6,120}=2,44$, interaction Temps x Jour, $F_{3,360}=3,60$, [plate-forme cachée] effet du temps $F_{1,122}=405,93$, $P<0,001$, interaction Temps x Jour, $F_{2,244}=165,82$, $P<0,001$).

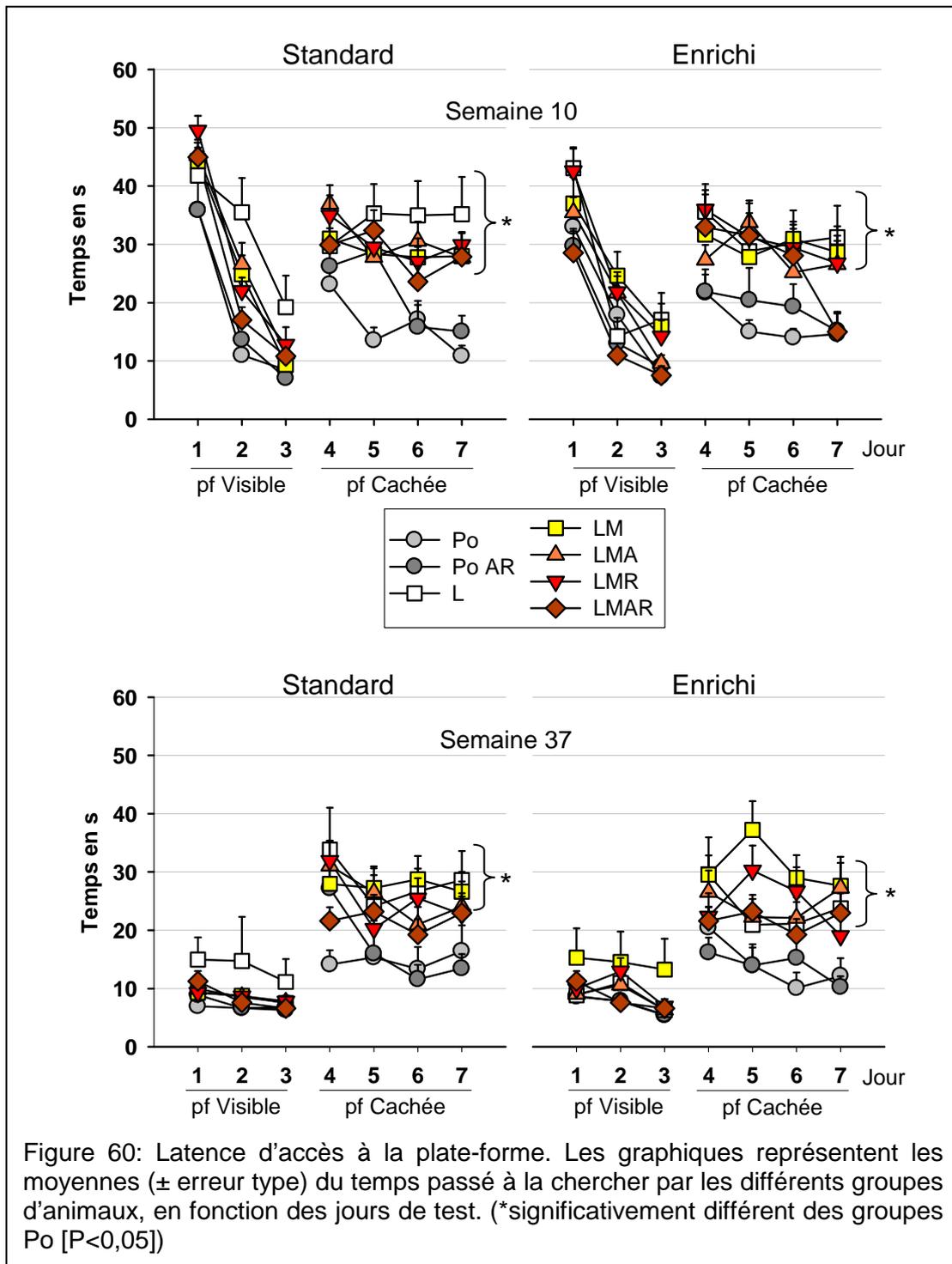
Très proches de celles des pseudo-opérés lorsque la plate-forme est invisible, les performances de tous les animaux lésés sont détériorées par rapport à celles de leurs homologues pseudo-opérés quand la plate-forme est invisible (effet groupe, $F_{6,122}=6,02$).



2) Latence d'accès à la plate-forme

Les performances des animaux, estimées à partir de la latence d'accès à la plate-forme, sont tout à fait similaires à celles observées pour les distances parcourues. La seule différence concerne les animaux élevés en milieu enrichi, qui mettent significativement moins de temps que leurs homologues élevés en milieu

standard pour rejoindre la plate-forme (Effet de l'élevage $F_{1,128}=5,48$, $P<0.05$). Les distances parcourues étant similaires, les animaux élevés en milieu enrichi ont donc une vitesse de nage supérieure à celle des animaux élevés en milieu standard. Cette observation peut être corrélée à l'amélioration de leurs scores de coordination sensorimotrice observés lors de la semaine post-lésionnelle 12.

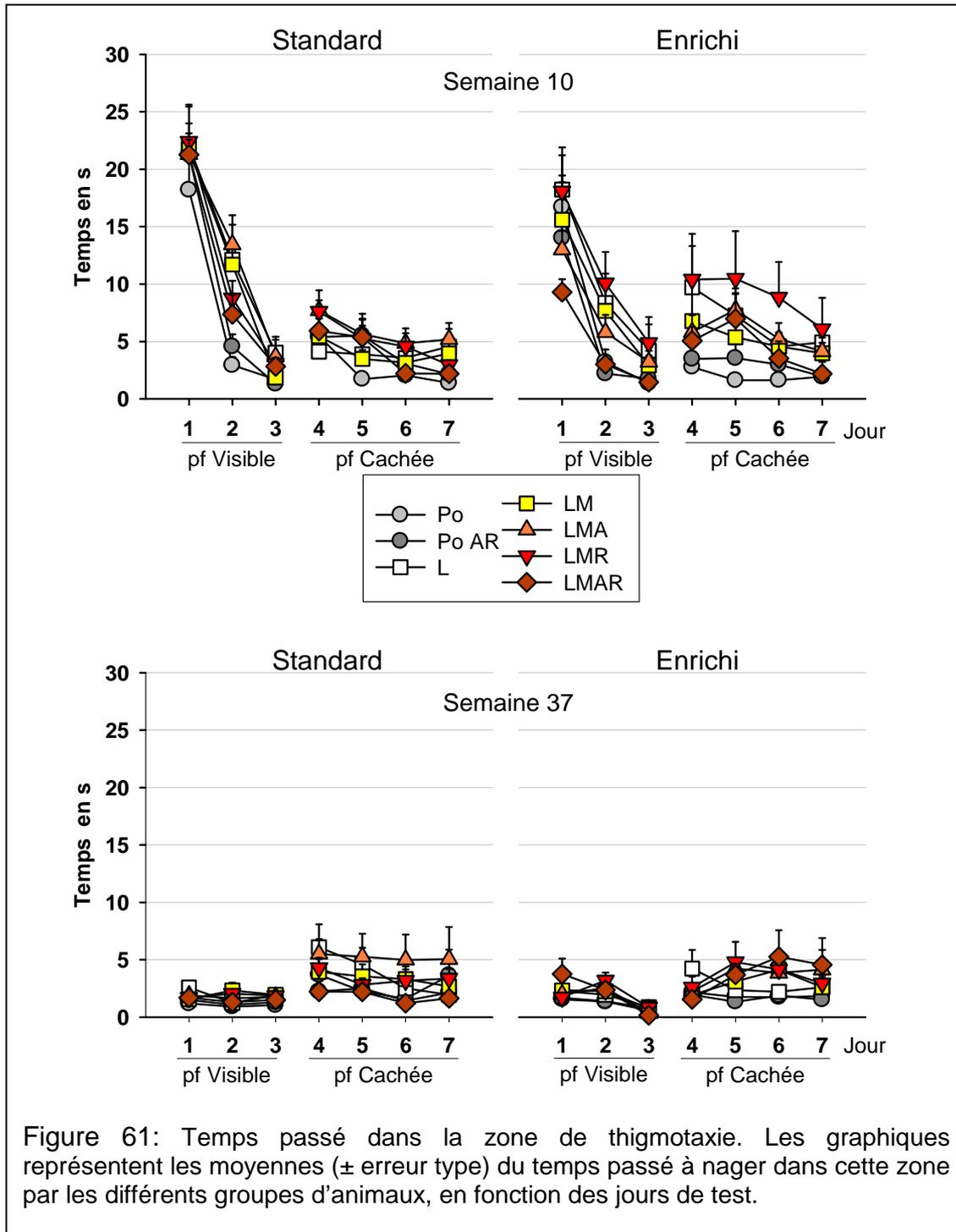


3) Thigmotaxie

Une diminution du temps passé dans la zone de thigmotaxie, en fonction des jours de test, est observée pour tous les groupes d'animaux au cours de la semaine 10 (effet Jour [plate-forme visible, $F_{2,238}=399,65$, $P>0,001$], [plate-forme cachée $F_{3,354}=11,85$, $P<0,001$]), particulièrement marquée lorsque la plate-forme est visible. Le fait que la plate-forme soit invisible à partir du 4^{ème} jour de test ne renforce pas significativement le comportement thigmotaxique des animaux lésés. On peut également observer qu'au premier jour de test, les animaux élevés en milieu enrichi passent moins de temps dans la zone thigmotaxique que leurs homologues élevés en milieu standard (effet de l'élevage $F_{1,119}=10,49$ $P<0,01$, interaction Jour x Elevage $F_{2,238}=11,76$, $P<0,001$).

Lors de la 2^{ème} période du test, à la semaine post-lésionnelle 37, le temps passé dans la zone de thigmotaxie par tous les groupes d'animaux est extrêmement réduit (effet du temps [plate-forme visible $F_{1,119}=266,79$], [plate-forme cachée, $F_{1,118}=14,30$ $P<0,001$]). Manifestement, les animaux présentent une certaine familiarité avec le test de la piscine et ses règles générales.

Aucun effet des traitements n'est observé à ce délai post-lésionnel.

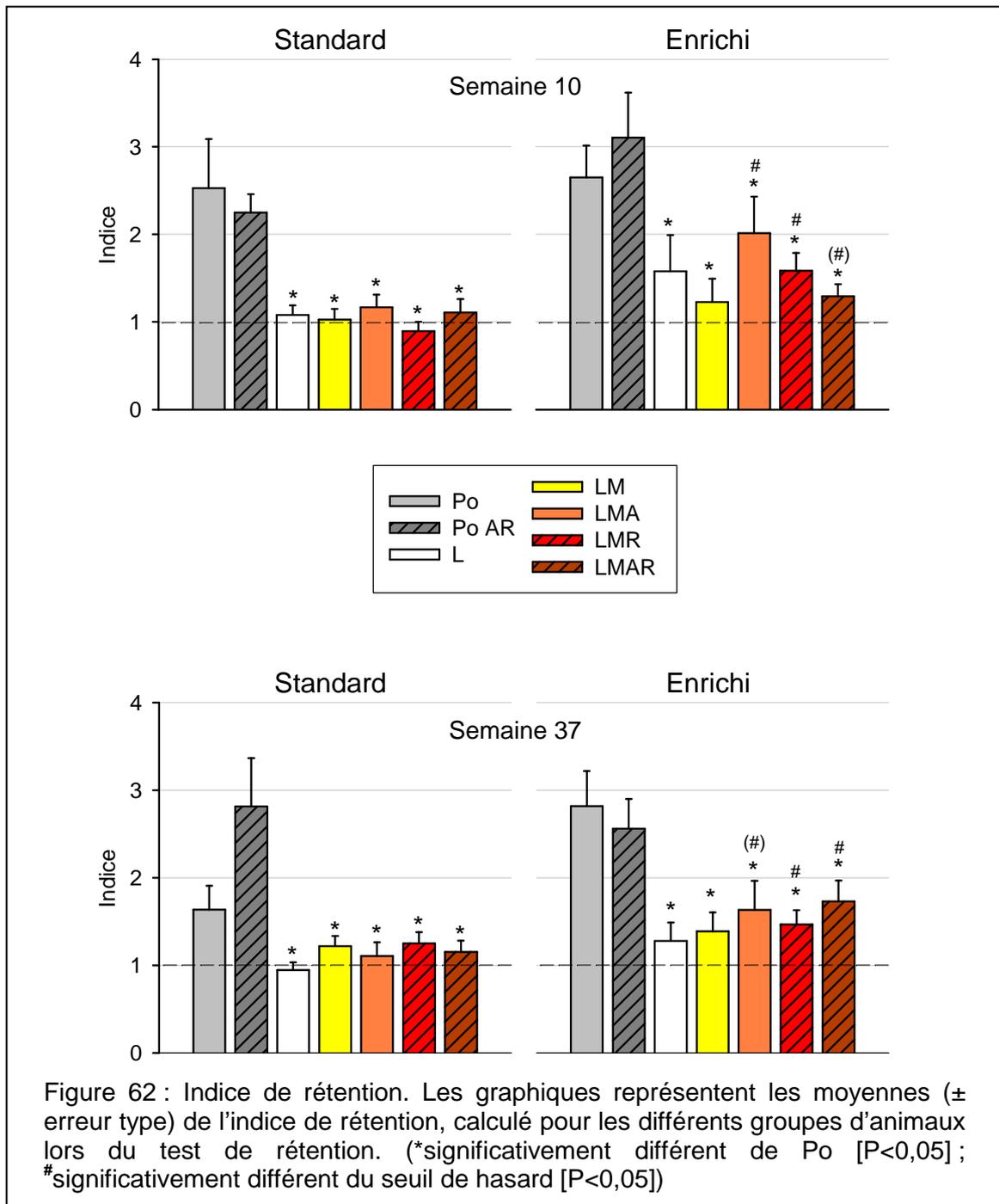


4) Test de rétention

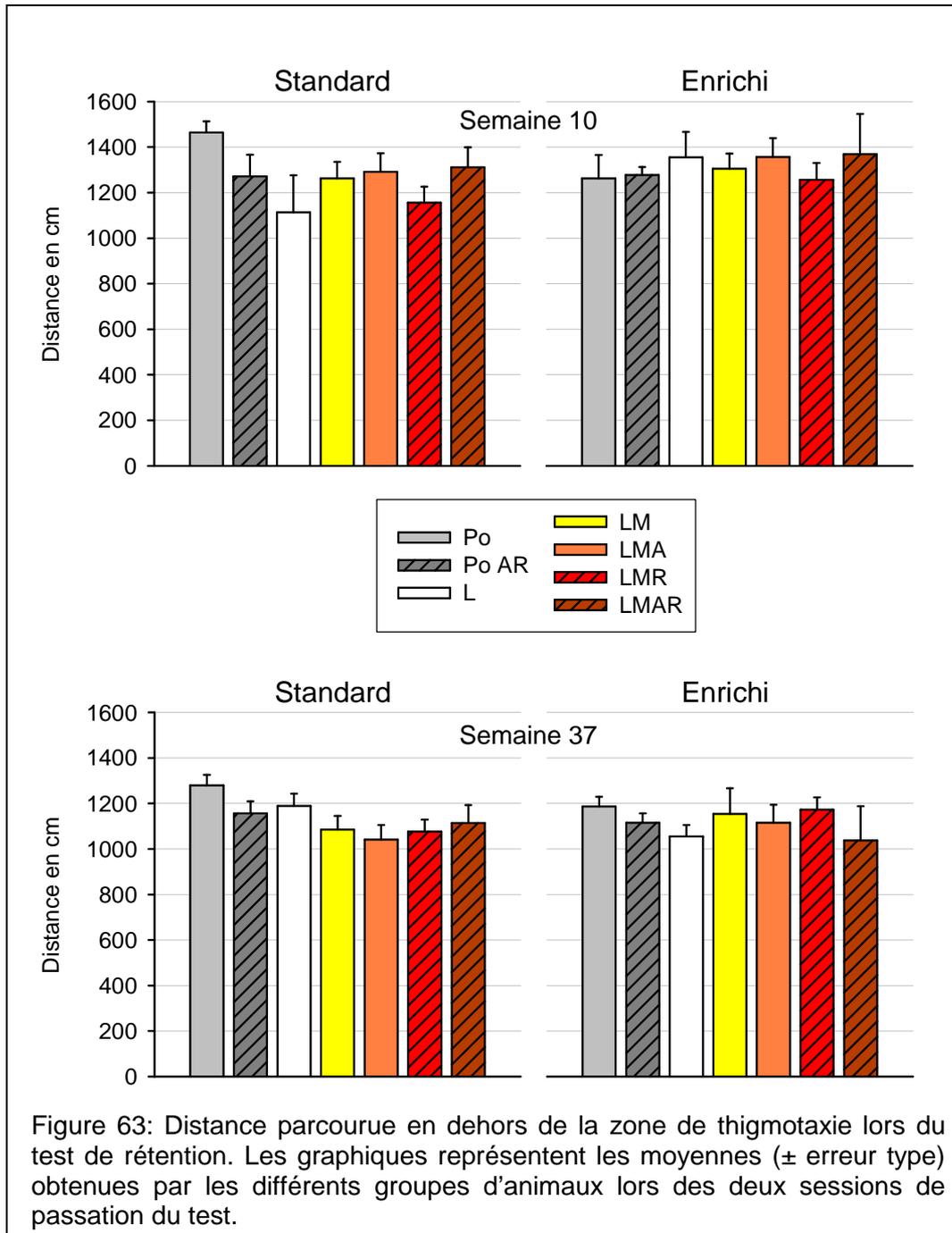
Lors du dernier essai du 7^{ème} jour, la plate-forme est retirée de la piscine et le parcours des rats est suivi pendant 60 secondes, afin d'évaluer la stratégie de recherche de la plate-forme par les animaux, et leur capacité à s'en rappeler la localisation.

L'indice de rappel, calculé par le temps passé dans le quadrant où se trouvait

la plate-forme par rapport à la moyenne du temps passé dans les trois autres quadrants, est plus faible dans l'ensemble des groupes lésés que chez leurs homologues pseudo-opérés (effet du groupe, $F_{6,121}=14,84$, $P<0,01$). Proche de la valeur 1 pour les animaux des groupes lésés élevés en milieu standard, il indique que ces derniers n'ont pas de préférence pour un quadrant particulier. Cependant, chez les animaux lésés élevés en milieu enrichi, cet indice tend à différer ou diffère significativement (groupes LMA, LMR et LMAR) du seuil de hasard (valeur 1), indiquant que ces animaux montrent une préférence pour le quadrant cible.



Nous nous sommes également intéressés, lors de cet essai, à la distance parcourue au centre de la piscine (en dehors de la zone de thigmotaxie). Aucune différence significative n'est observée entre les différents groupes d'animaux (Figure 63).



F) Labyrinthe en T: test d'alternance spontanée

Ce test, basé sur la tendance naturelle des rats à explorer un nouvel environnement, commence lorsque le rat est placé dans une boîte « départ », située à la base du «T» du labyrinthe. L'animal va avancer jusqu'à l'intersection et choisir d'entrer spontanément dans l'un des deux bras du labyrinthe. Il est alors replacé dans la boîte de départ pour un deuxième passage, au cours duquel on note s'il visite le même bras que précédemment ou s'il alterne. Les rats naïfs présentent spontanément un pourcentage d'alternance supérieur au hasard, soit 50%. Deux essais par jour ont été réalisés pendant 5 jours (Figure 64).

Dans notre expérience, les animaux lésés présentent un pourcentage d'alternance plus faible que celui de leurs homologues pseudo-opérés (effet du groupe, $F_{6,124}=10,09$, $P<0,01$). Elevés en milieu standard, ils présentent des performances inférieures à 50%, ce qui signifie que ces animaux choisissent de façon préférentielle le bras déjà visité. Chez tous les animaux élevés en milieu enrichi, on observe une augmentation de l'alternance, aussi bien dans les groupes pseudo-opérés que lésés (effet de l'élevage, $F_{1,124}=28,00$, $P<0,01$). Dans ce contexte, les animaux lésés présentent un taux d'alternance avoisinant 50%, c'est-à-dire qu'ils choisissent au hasard la seconde branche à visiter.

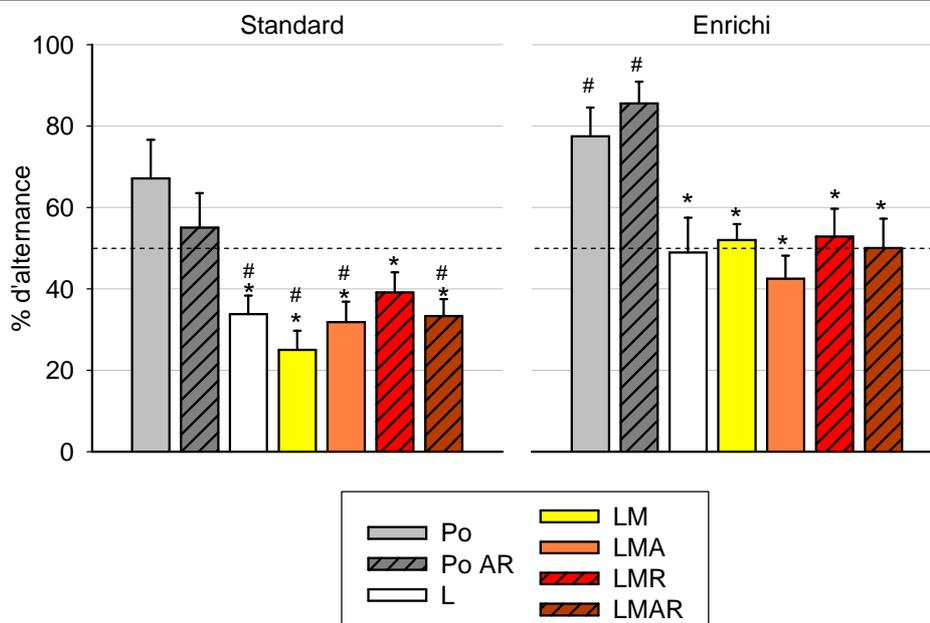
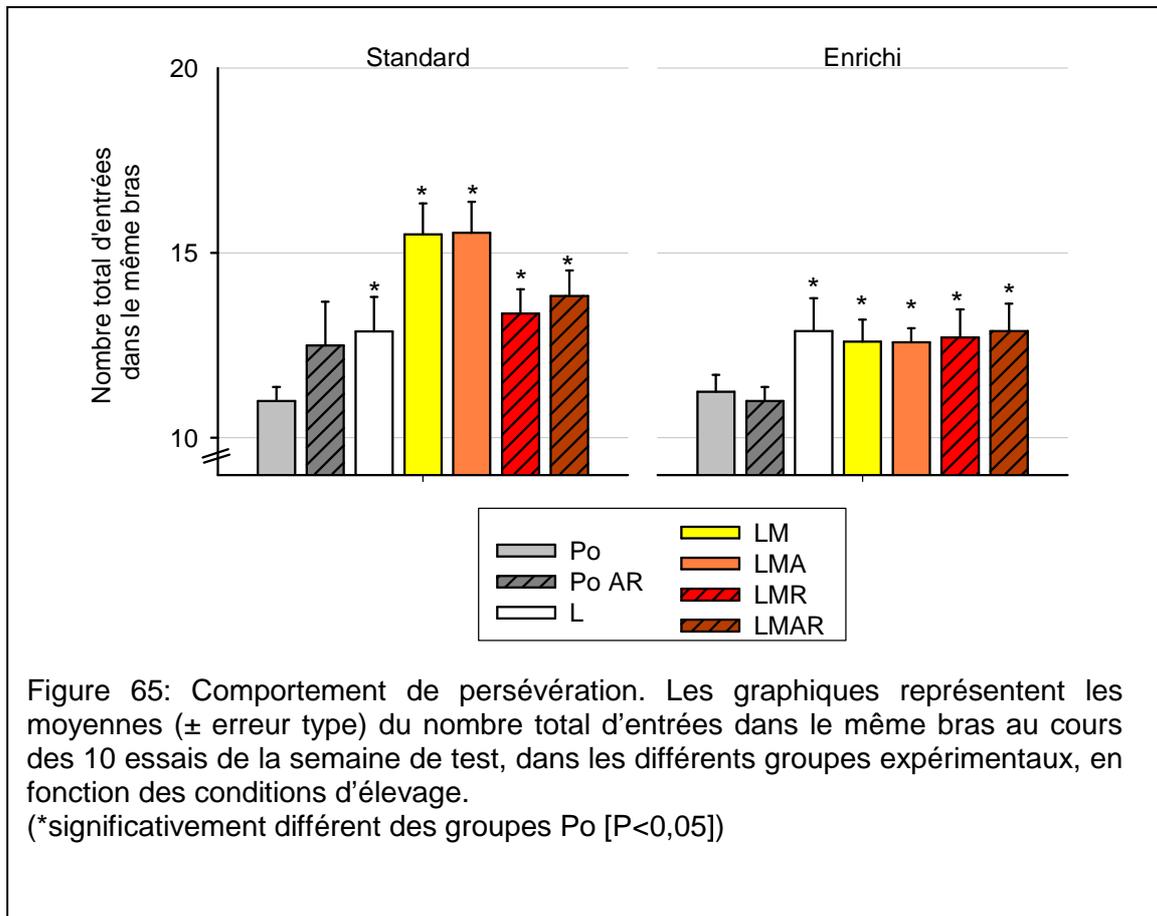


Figure 64: Pourcentage d'alternance spontanée dans le labyrinthe en T. Les graphiques représentent les pourcentages moyens (\pm erreur type) d'alternance obtenus au cours de 2 essais quotidiens pendant 5 jours, pour les différents groupes expérimentaux en fonction des conditions d'élevage.

(*significativement différent des groupes Po [$P<0,05$]; #significativement différent de 50% [$P<0,05$])

Nous avons ainsi relevé le nombre total d'entrées dans le même bras au cours des 5 jours de test (2 essais quotidiens, à raison de 2 passages par essai ; Figure 65)

Les animaux pseudo-opérés ne montrent pas de comportement persévératif, leur nombre total d'entrées dans le même bras avoisinant les 50%. Les animaux des groupes LM et LMA élevés en milieu standard manifestent une forte préférence (75% de leurs entrées) pour l'un des bras (effet du groupe $F_{6,124}=4,05$, $P<0,01$). Ce comportement persévératif n'est plus observé après élevage en milieu enrichi (Effet de l'élevage, $F_{1,124}=9,63$, $P<0,05$).



G) Conditionnement de peur

La capacité à mettre en place un apprentissage de type associatif a été évaluée à l'aide d'un protocole de conditionnement de peur au contexte, 43 semaines après l'intervention chirurgicale.

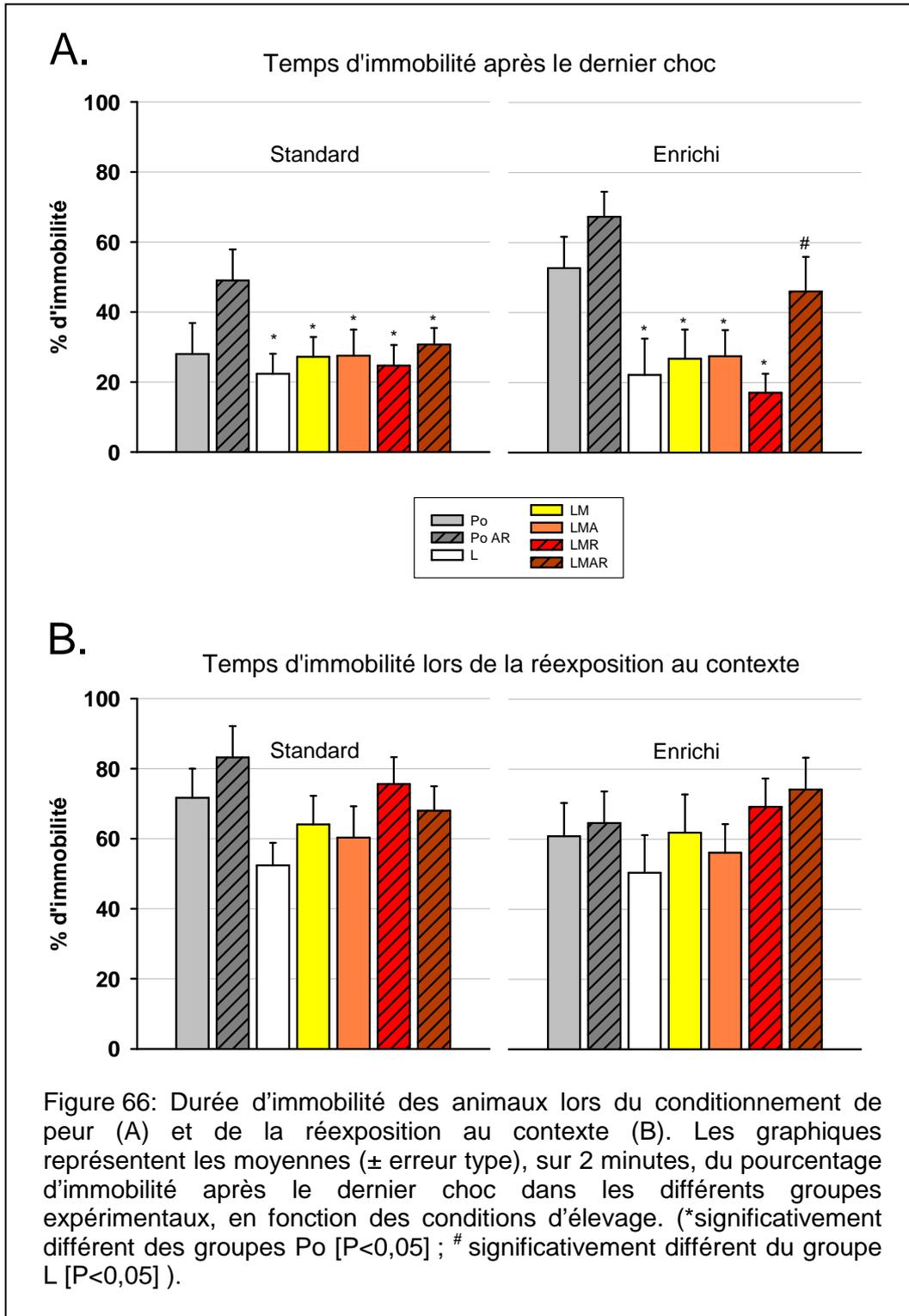
La première étape de cette expérience concerne le conditionnement en tant que tel. Au cours d'une séance de 40 minutes dans la boîte de conditionnement, les rats vont recevoir, à intervalles irréguliers, 5 chocs électriques aux pattes. Après le dernier choc, le comportement des rats sera observé pendant 2 minutes, au cours desquelles le temps passé en immobilité complète sera mesuré (Figure 66A). On considère que ce temps est proportionnel au niveau de conditionnement atteint par les animaux.

La durée d'immobilité est plus réduite chez les animaux lésés que chez les homologues Po (effet du groupe $F_{6,120}=6,62$ $P<0,001$). Parmi ces derniers, ceux élevés en milieu enrichi tendent à atteindre un niveau de conditionnement supérieur à celui de leurs homologues standard (effet de l'élevage $F_{6,120}=2,75$ $P=0,09$).

Les différents groupes d'animaux lésés présentent des performances globalement similaires, à l'exception du groupe ayant reçu la combinaison de tous les traitements. En effet, les rats LMAR élevés en milieu enrichi atteignent un niveau de conditionnement comparable à celui de leurs homologues Po, et significativement ($P<0,05$) supérieur à celui de tous les autres animaux lésés (effet groupe ne tenant compte que des animaux lésés : $F_{4,95}=2,63$, $P<0,05$).

La deuxième étape de l'expérience concerne la réexposition au contexte. 24 heures après leur conditionnement, les animaux sont replacés dans la même boîte, et leur temps d'immobilité y est comptabilisé pendant 2 minutes (Figure 66 B).

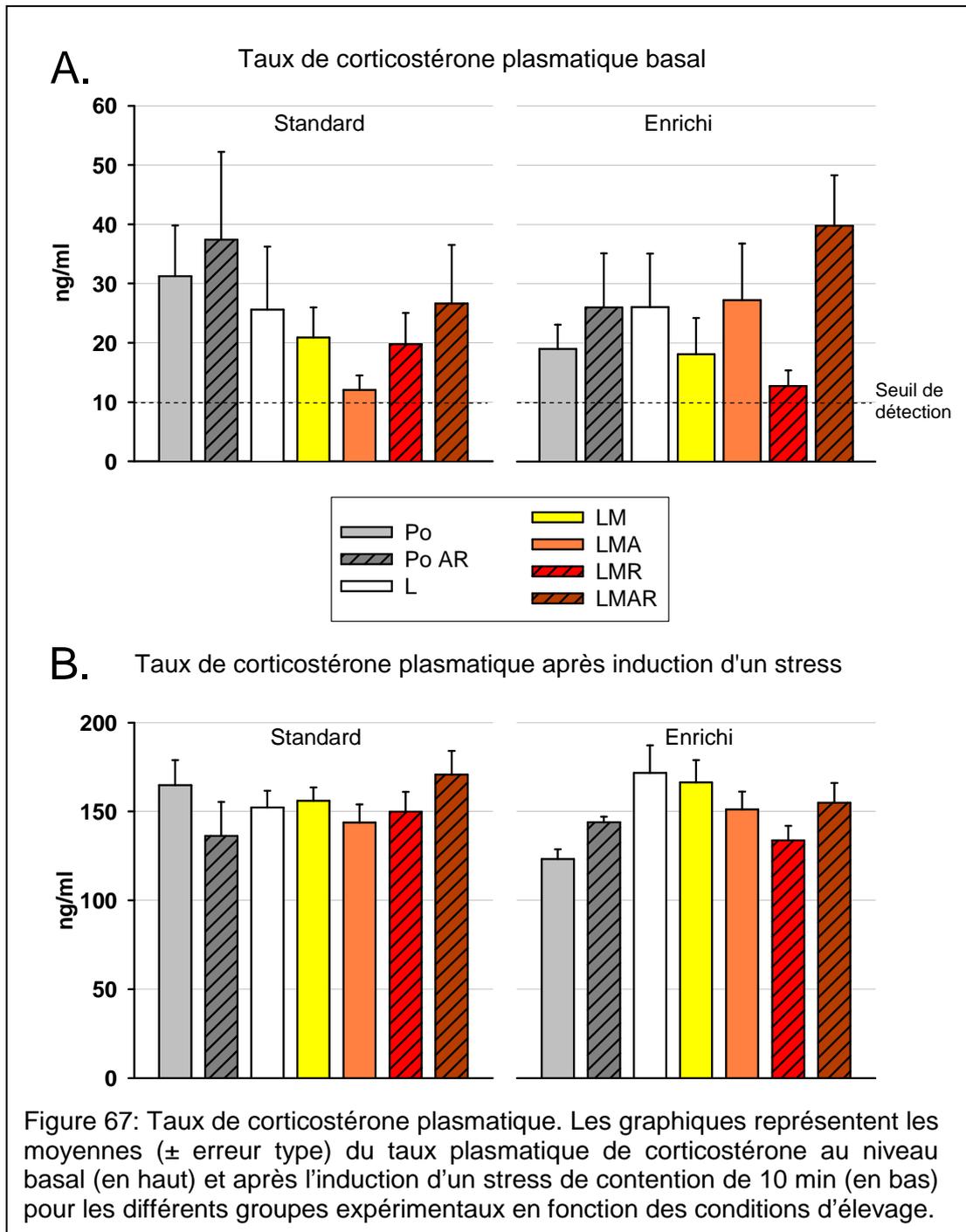
Bien que, dans ces conditions, le temps d'immobilité soit très augmenté pour l'ensemble des groupes, on peut remarquer que les animaux des groupes LMR et LMAR tendent à rester plus longtemps immobiles que ceux des autres groupes lésés, qu'ils aient été élevés en milieu standard ou en milieu enrichi (dans les deux cas $P=0,06$).



H) Dosage de la corticostérone

La concentration plasmatique de corticostérone a été évaluée, dans nos différents groupes d'animaux, à partir de prélèvements sanguins réalisés à la même heure dans deux conditions : une condition minimisant le stress de l'animal, lors de la 42^{ème} semaine post-lésionnelle, pour évaluer le niveau hormonal basal des rats

(Figure 67 A), la deuxième après un stress de contention de 10 minutes réalisé 2 semaines plus tard (Figure 67 B).



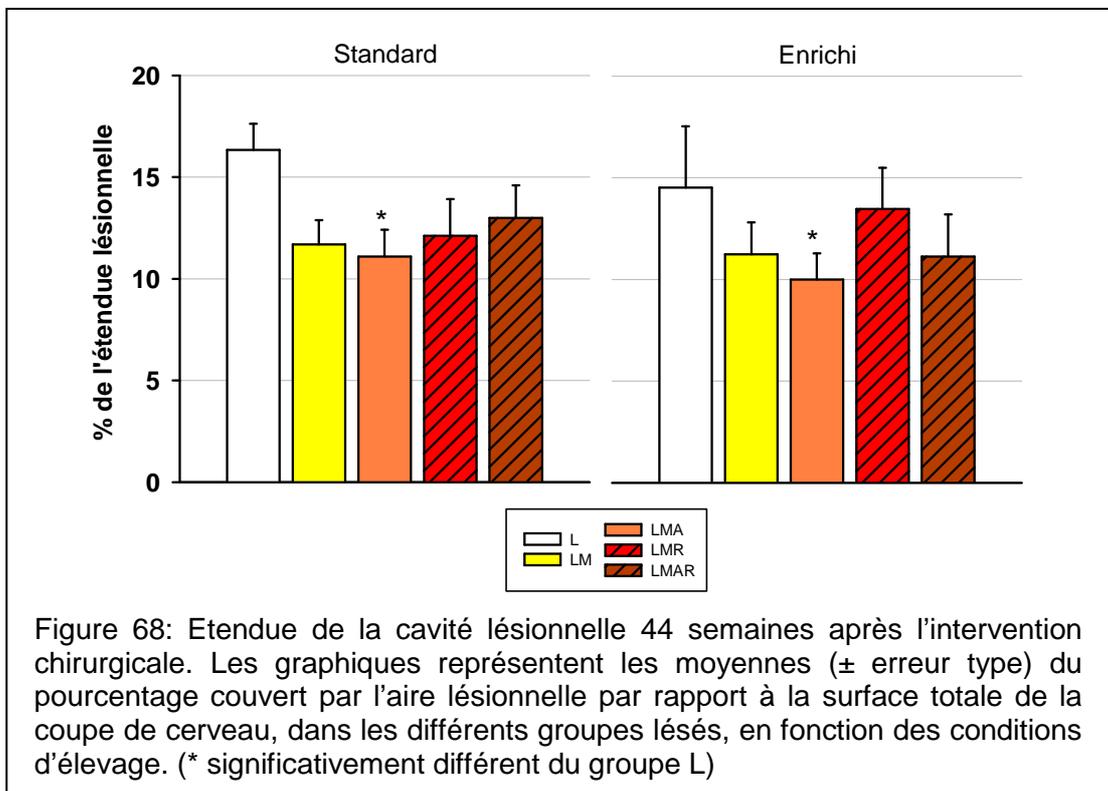
On observe une fluctuation importante du niveau plasmatique basal de corticostérone en fonction des groupes d'animaux. Aucune différence significative ne ressort de l'analyse, si ce n'est la forte augmentation de la concentration plasmatique hormonale induite par le stress de contention chez tous les animaux (effet du stress $F_{1,102}=1330.25$, $P<0,001$).

II) Analyse morphologique

A) Taille de la cavité lésionnelle

L'étude morphologique a été réalisée 44 semaines après l'intervention chirurgicale.

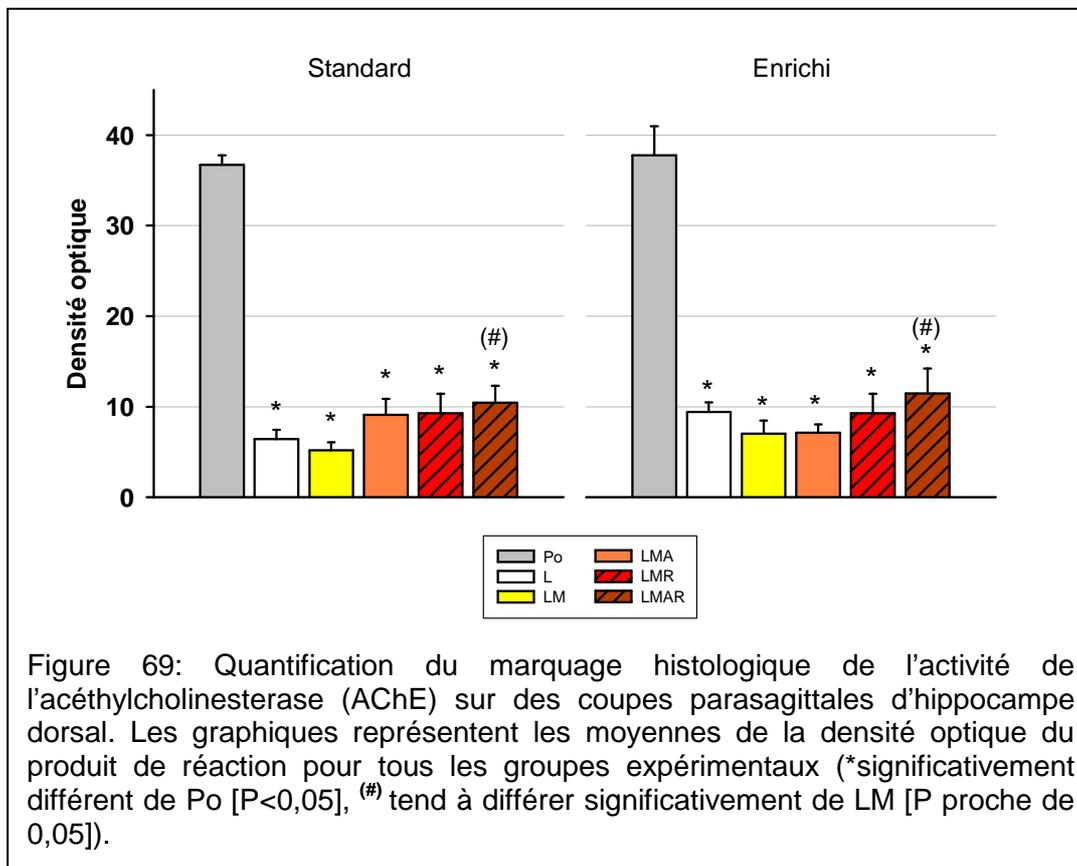
L'évaluation morphométrique de l'aire de la cavité, sur des coupes parasagittales à deux niveaux de l'axe medio-latéral (1,90mm et 2,40mm ; Paxinos & Watson, 1997 ; Figure 68), montre que l'aire couverte par la lésion est plus réduite dans les groupes ayant reçu l'implantation de Matrigel, et en particulier dans les groupes LMA, élevés en milieu standard ou enrichi, où elle est significativement diminuée ($P < 0,05$) par rapport aux groupes L.



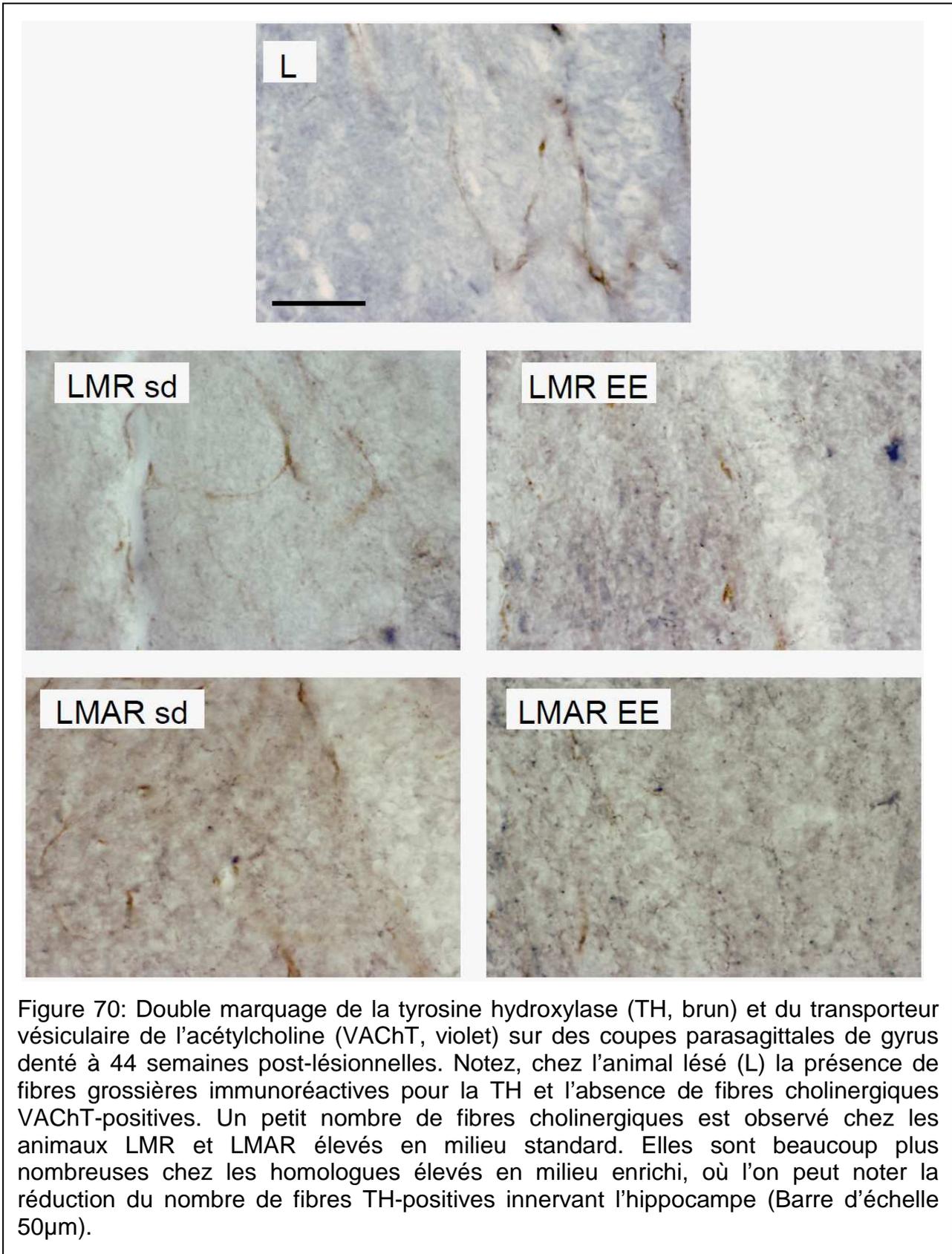
B) Activité cholinergique dans l'hippocampe dorsal

La quantification de l'activité de l'AChE (Figure 69) par la mesure de la densité optique du produit de réaction montre la réduction drastique du nombre de fibres cholinergiques dans l'hippocampe dorsal des animaux lésés (Effet du groupe, $F_{5,83}=69,84$, $P < 0,001$). Aucun effet des traitements n'est observé avec une ANOVA incluant les animaux pseudo-opérés. L'ANOVA focalisée sur les animaux lésés tend

vers la significativité ($F_{4,70}=2,14$ $P=0,08$), l'analyse post-hoc indiquant que la DO quantifiée dans l'hippocampe du groupe LMAR tend à être significativement supérieure à celle des animaux LM ($P=0,07$).

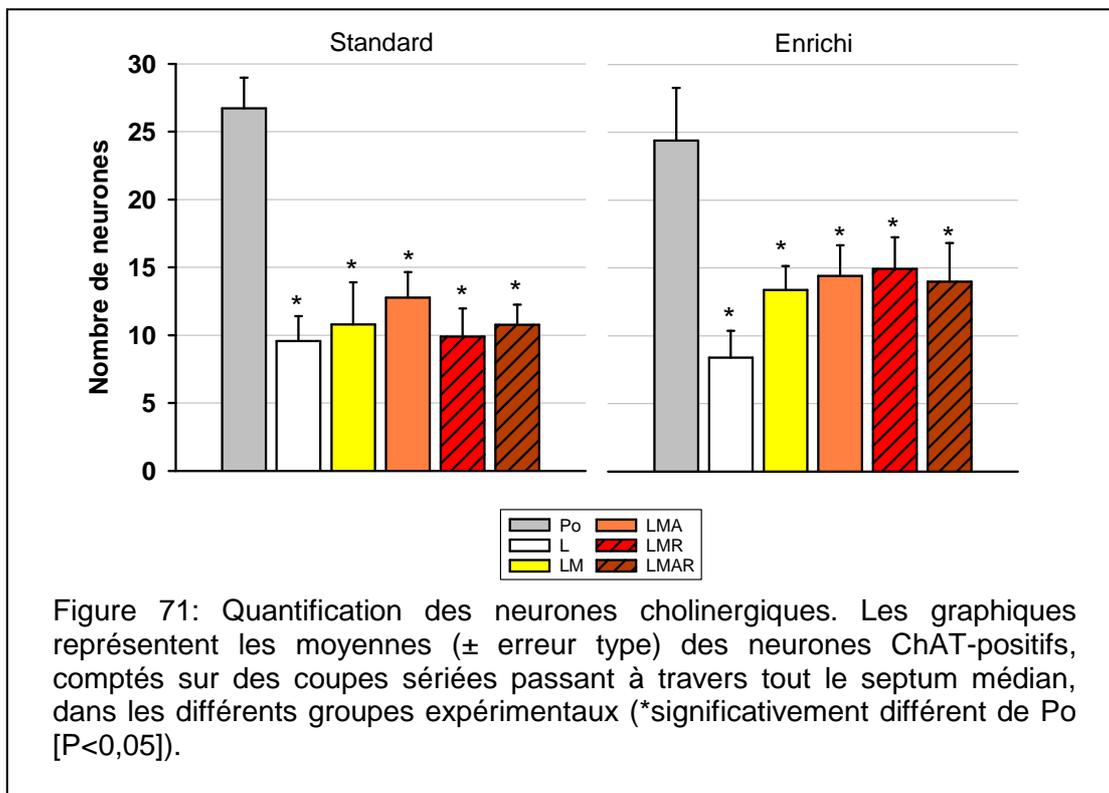


Ces données sont confirmées par l'observation du transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VACHT), présent au niveau des terminaisons synaptiques des neurones cholinergiques (Figure 70). On peut en effet observer, dans l'hippocampe dorsal des animaux des groupes LMR et LMAR, et comparativement à celui des autres animaux lésés, une augmentation du nombre de fibres cholinergiques, particulièrement frappante chez les animaux élevés en milieu enrichi.



Nous avons également quantifié le nombre de neurones cholinergiques, ChAT-positifs, sur des coupes sériées passant au travers du septum médian. Le nombre de neurones dans les 2 groupes pseudo-opérés ne différant pas l'un de l'autre, ils ont été regroupés lors de l'analyse statistique (Figure 71).

La lésion réduit d'environ 60% le nombre de neurones exprimant la ChAT dans tous les groupes expérimentaux ($F_{5,71}=9,16$ $P<0,001$). Aucun effet significatif des traitements n'est observé, bien qu'une légère tendance à l'augmentation du nombre de neurones ChAT-positifs semble apparaître chez les animaux élevés en milieu enrichi.



Ces données sont à rapprocher de celles obtenues dans une expérience préliminaire, visant à mettre au point le protocole concernant l'environnement enrichi et à évaluer ses effets à court terme. Des animaux, traités au NaCl ou à l'AGP, ont ainsi été euthanasiés directement à l'issue des 5 semaines passées en environnement enrichi. Le marquage de la ChAT, réalisé sur des coupes de septum médian, a révélé (Figure 72) l'augmentation du nombre de neurones exprimant cette enzyme chez les animaux traités à l'AGP. Le même résultat est observé chez les rats élevés en milieu enrichi, et les effets se potentialisent lorsque les deux

traitements sont associés.

Il est intéressant de noter que ces effets ne sont plus retrouvés à long terme, près de 9 mois après l'arrêt des traitements.

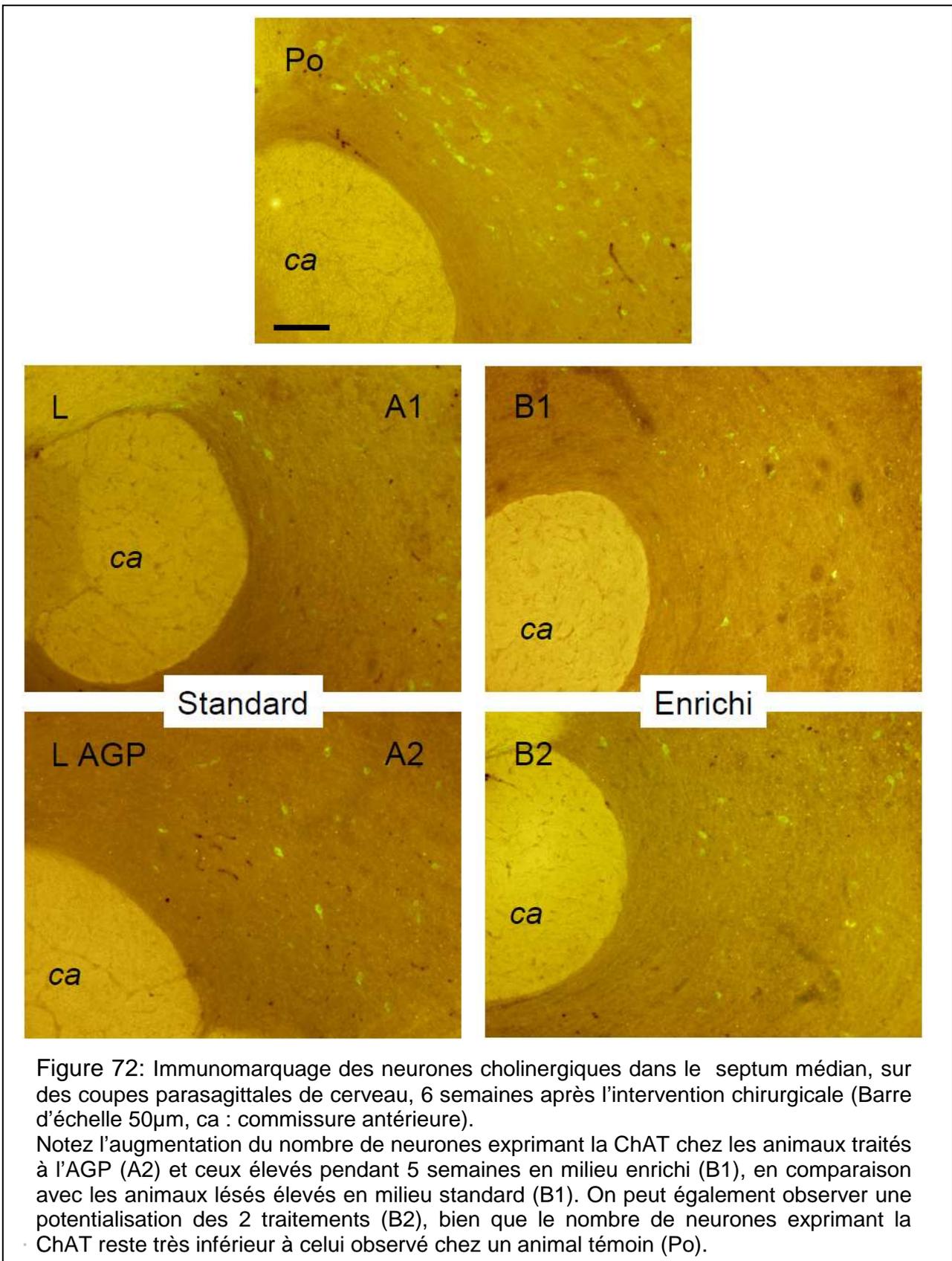


Figure 72: Immunomarkage des neurones cholinergiques dans le septum médian, sur des coupes parasagittales de cerveau, 6 semaines après l'intervention chirurgicale (Barre d'échelle 50µm, ca : commissure antérieure).

Notez l'augmentation du nombre de neurones exprimant la ChAT chez les animaux traités à l'AGP (A2) et ceux élevés pendant 5 semaines en milieu enrichi (B1), en comparaison avec les animaux lésés élevés en milieu standard (B1). On peut également observer une potentialisation des 2 traitements (B2), bien que le nombre de neurones exprimant la ChAT reste très inférieur à celui observé chez un animal témoin (Po).

Le marquage immunocytochimique de la tyrosine hydroxylase (Figure 70) révèle les fibres monoaminergiques qui envahissent l'hippocampe suite à sa désafférentation chez tous les animaux lésés. On peut cependant noter une diminution de leur nombre dans le gyrus denté des groupes LMR et LMAR après élevage en milieu enrichi, qui coïncide avec l'augmentation de l'innervation cholinergique déjà mentionnée.

C) *Interaction Matrigel tissu hôte*

Les interactions tissu hôte et matrigel ont été observées à l'aide d'immunomarquages dirigés contre la GFAP et les neurofilaments phosphorylés (Figure 73).

Nous avons pu constater que le matrigel était toujours présent au bord de la cavité lésionnelle après 44 semaines in vivo. La zone de contact entre l'hydrogel et le tissu hôte est très étroite, mais le biomatériau s'est détérioré au centre de la cavité.

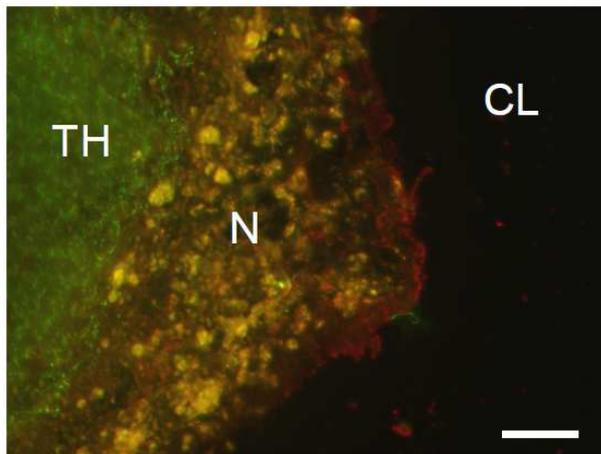
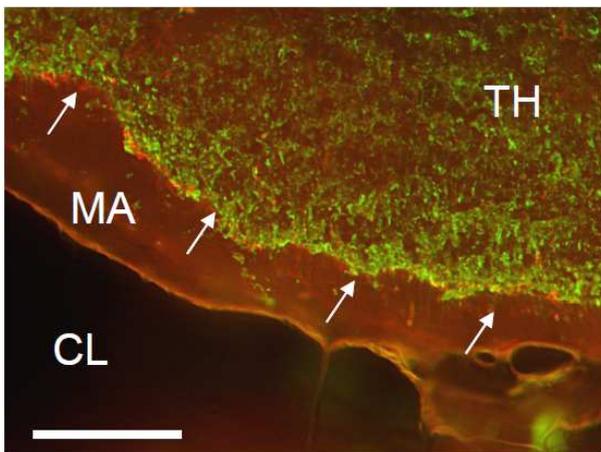


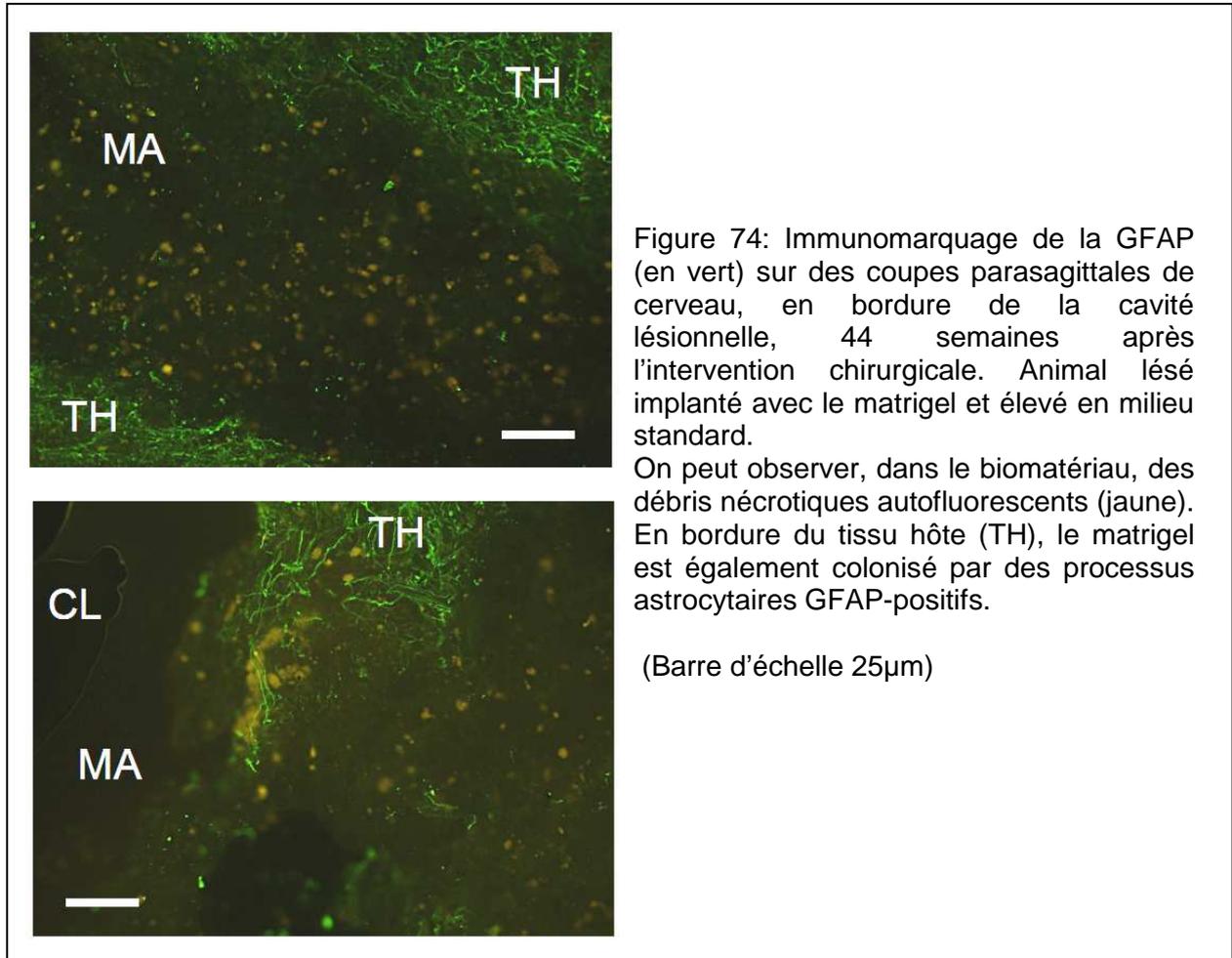
Figure 73: Double marquage de la GFAP (en vert) et des neurofilaments phosphorylés (en rouge) en bordure de la cavité lésionnelle, sur des coupes parasagittales de cerveaux de rats, 44 semaines après l'intervention chirurgicale (Barre d'échelle 25µm)

Notez l'importante zone de nécrose (N) observée en bordure du tissu cérébral (TH) chez l'animal lésé (en haut). Cette nécrose n'est pas observée chez l'animal ayant reçu l'implantation de matrigel (MA) dans la cavité lésionnelle (CL). On remarque une interface très étroite (flèches) entre le biomatériau et le tissu cérébral. L'hydrogel ne comble cependant pas l'ensemble de la cavité.



On peut observer la présence de nombreux débris nécrotiques dans le biomatériau. Cependant, des processus astrocytaires envahissant l'hydrogel sont également détectés en bordure du tissu cérébral (Figure 74).

Aucun effet particulier des différents traitements n'a pu être détecté.



Discussion Générale

L'objectif de ce travail de recherche était de développer de nouvelles approches à visée thérapeutique, capables de promouvoir la régénération fonctionnelle et structurale après une atteinte du SNC.

Au sein du système nerveux central adulte, les fibres neuronales lésées tentent de régénérer, mais les processus avortent rapidement, se heurtant à de nombreux obstacles. Ainsi, les mécanismes de mort neuronale et de dégénérescence secondaire, orchestrées par le stress oxydatif, l'inflammation, et l'excitotoxicité liée à l'augmentation massive de la concentration du glutamate, et participant à la formation d'une cavité lésionnelle, la dégradation des molécules favorables à la survie et à la plasticité des neurones, le développement d'une cicatrice gliale et la présence de molécules inhibant la croissance neuritique, représentent tous des obstacles majeurs à la régénération au sein du SNC.

Pour essayer de contrer ces différents obstacles, nous avons choisi de combiner des traitements, qui nous semblaient à la fois complémentaires et potentiellement synergiques. Nous avons tout d'abord misé sur l'impressionnant spectre d'action des polyamines, en nous focalisant sur la dernière dans la chaîne de biosynthèse, la putrescine. Comme les autres polyamines, la putrescine présente à la fois des propriétés antioxydantes (Gilad et Gilad, 1992; Zimmerman et coll., 1995; Giardino et coll., 1998), anti-inflammatoires (Zhang et coll., 2000) neuroprotectrices (Soulet et Rivest, 2003), de régulation des récepteur NMDA impliqués dans l'excitotoxicité après atteinte cérébrale (Williams, 1997), de régulation de l'homéostasie du calcium intracellulaire (Jensen et coll., 1987) et d'inhibition de la voie Rho, élément central dans les processus d'élongation neuritique (Cai et coll., 1999; Cai et coll., 2002). Cependant, ses dérivés cataboliques sont moins toxiques que ceux des deux autres polyamines. Malgré tout, pour limiter au maximum sa dégradation, et prolonger du même coup sa durée d'action, nous lui avons associé de l'aminoguanidine, un agent inhibiteur des polyamines oxydases (Beaven et coll., 1969). L'aminoguanidine présente également d'autres propriétés prometteuses. En effet, cet agent, antioxydant et neuroprotecteur, est, de surcroît, un inhibiteur sélectif de la NOS inductible, enzyme productrice de radicaux libres après activation par une lésion (Wada et coll., 1998; Mori et coll., 2001). Ce traitement combiné déjà testé dans le SNP, mais jamais encore dans le SNC, nous paraissait particulièrement

prometteur. Les résultats préliminaires obtenus ont été encourageants, tant sur le plan comportemental (réduction des déficits sensorimoteurs et de l'hyperactivité locomotrice) que morphologique, limitant les processus de dégénérescence secondaire liés à la lésion, et assurant des effets neuroprotecteurs et neurotrophiques.

Cependant, pour soutenir ces processus en présence d'une cavité lésionnelle, il est indispensable de fournir aux neurones endommagés un pont de régénération, support permissif à la croissance des fibres nerveuses. Forts de l'expérience du laboratoire concernant les hydrogels préformés et des limites contraignantes de leur utilisation, nous avons cherché un biomatériau capable d'être implanté facilement et de s'adapter à la forme de la cavité lésionnelle pour optimiser l'interface avec le tissu cérébral. Nous avons collaboré avec les chimistes du LCPM de Nancy, qui ont synthétisé à partir d'alginate, connu pour stimuler la croissance axonale, des hydrogels présentant des caractéristiques physico-chimiques remarquables, rhéofluidifiants et thixotropes, susceptibles d'être injectés directement dans la cavité lésionnelle.

Ces hydrogels s'étant révélés trop fragiles pour des implantations *in vivo* à long terme, et en attendant leur optimisation physico-chimique, nous avons utilisé, dans la dernière partie de nos expériences, un autre pont de régénération, le Matrigel. Très utilisé en culture cellulaire, le Matrigel est liquide lorsqu'il est froid et se solidifie au-delà de 20°C. Ces propriétés thermosensibles en faisaient un candidat compatible avec nos exigences expérimentales.

Enfin, tous les processus de plasticité cérébrale faisant intervenir les facteurs neurotrophiques, il nous a paru important d'augmenter la biodisponibilité de ces facteurs par des approches compatibles avec les autres traitements. L'apport exogène de neurotrophines, administrées par voie systémique ou intracérébrale, provoquant des effets secondaires rédhibitoires, nous avons préféré cibler les neurotrophines endogènes. Pour cela, nous avons choisi de fournir à nos animaux, après lésion, des conditions d'élevage en milieu physiquement et socialement enrichi. En effet ce type de conditions postopératoires, déjà utilisées chez l'humain dans les centres de réhabilitation, activent des régions impliquées sur le plan sensoriel, moteur et cognitif, susceptibles de compenser les déficits induits par la

lésion. Cette activation cérébrale va stimuler la synthèse locale de facteurs neurotrophiques, qui vont favoriser la survie et la plasticité neuronales et intensifier la neurogénèse. De plus, pour limiter les effets de la dégradation de la matrice extracellulaire et favoriser la biodisponibilité des facteurs neurotrophiques directement au niveau du site de lésion, nous avons administré des RGTAs, agents de régénération à large spectre d'action, dont les effets spectaculaires sur la réparation tissulaire dans différents modèles de lésion ont été décrits (Aamiri et coll., 1995a; Aamiri et coll., 1995b; Desgranges et coll., 1997; Lafont et coll., 1998; Desgranges et coll., 1999; Yamauchi et coll., 2000; Zimowska et coll., 2001; Papy-Garcia et coll., 2002; Meddahi et coll., 2002a; Meddahi et coll., 2002b; Escartin et coll., 2003; Zakine et coll., 2003; Lafont et coll., 2004; Alexakis et coll., 2004; Morvan et coll., 2004; Lallam-Laroye et coll., 2006; Chebbi et coll., 2008; Mangoni et coll., 2009). Mimant les effets des héparanes sulfates protéoglycanes, les RGTAs exercent des effets anti-inflammatoires puissants et se lient aux neurotrophines, les protégeant de la dégradation enzymatique et favorisant leurs interactions avec des récepteurs spécifiques. Testés pour la première fois au sein du SNC dans mon laboratoire d'accueil, dans un modèle de lésion immunotoxique des neurones cholinergiques septaux, les RGTAs ont été capables de se fixer spécifiquement au niveau du site lésionnel et inflammatoire cérébral, et d'y exercer des effets neuroprotecteurs.

L'association RGTAs / environnement enrichi nous paraissait particulièrement indiquée pour compléter les effets de nos autres traitements.

Ces effets ont été étudiés dans un modèle de lésion par aspiration des voies septo-hippocampiques dorsales et des structures sus-jacentes. Cette lésion entraîne des altérations anatomiques, neurochimiques et comportementales bien caractérisées dans le système septo-hippocampique (cf introduction). Ainsi, au niveau du septum médian, elle entraîne une diminution de l'expression neuronale de la ChAT. Des travaux antérieurs ont démontré que cette diminution n'est pas liée à la disparition des neurones cholinergiques, mais à l'arrêt de la synthèse de cette enzyme (Will et Hefti, 1985; Peterson, 1992). Au niveau de l'hippocampe, la lésion induit une dénervation cholinergique, qui provoque une chute de l'activité de l'AChE

(Heckers et coll., 1994). La désafférentation de l'hippocampe stimule sa colonisation par des fibres monoaminergiques, issues d'un bourgeonnement hétérotopique sympathique (Loy et coll., 1980; Bjorklund et Stenevi, 1981; Crutcher et Davis, 1981) provenant du ganglion cervical supérieur. Un autre bourgeonnement spontané a pu être mis en évidence, celui de la voie septo-hippocampique ventrale non-affectée par la lésion, qui peut bourgeonner vers les zones désafférentées de l'hippocampe pour y restaurer une innervation cholinergique compensatoire (Cassel et coll., 1997). Un tel bourgeonnement peut être d'une grande importance, aussi bien en étendue qu'en densité, en fonction de la sévérité de la lésion (Gage et coll., 1983b; Gage et coll., 1984; Gage et Bjorklund, 1986).

La désafférentation de l'hippocampe induite par la lésion va avoir plusieurs répercussions comportementales. La plus remarquable concerne l'augmentation durable de l'activité locomotrice des animaux (Cassel et coll., 1993; Jeltsch et coll., 1994a; Jeltsch et coll., 1994b), due à la perturbation du contrôle inhibiteur exercé par l'hippocampe sur la composante dopaminergique du noyau accumbens, connue pour son rôle dans la gestion de l'activité locomotrice (Gray et McNaughton, 1983; Wilkinson et coll., 1993; Weiner et coll., 1996). Le mécanisme exact par lequel la dénervation hippocampique affecte les fonctions du noyau accumbens et induit une hyperactivité n'est pas élucidé à l'heure actuelle (Glick et coll., 1971), mais il pourrait impliquer des modifications de transmission entre le subiculum, la principale sortie de l'hippocampe, et le noyau accumbens (O'Donnell et Grace, 1995; Bannerman et coll., 2001).

La deuxième répercussion comportementale concerne la chute des performances de mémoire spatiale, typiquement liée au fonctionnement hippocampique, notamment par l'intermédiaire de la composante cholinergique issue du septum médian (O'Keefe et Nadel, 1978). Nous avons suivi les performances de nos animaux lésés dans le test de la piscine de Morris (Duconseille et coll., 2001), en choisissant une version simplifiée, adaptée à la gravité des déficits attendus.

La désafférentation cholinergique de l'hippocampe induit également la mise en place de comportements persévératifs (Numan et Quaranta, Jr., 1990; Whishaw et Tomie, 1997; Duconseille et coll., 2001; Lehmann et coll., 2002), que nous avons évalués dans le labyrinthe en T.

L'interruption des communications septo-hippocampiques est aussi à l'origine de l'abolition des comportements anxieux, par levée de l'inhibition comportementale (Gray, 1982; McNaughton et Gray, 2000). Nous avons évalué l'anxiété de nos animaux à l'aide du test du labyrinthe en croix surélevé.

Enfin, des déficits de la coordination sensorimotrice ont été décrits par Hofferer et Cassel (1996), au sein du laboratoire, en utilisant le même modèle de lésion. Ces déficits ne sont pas attribués à la lésion des voies SHD proprement dites, puisqu'ils ne sont pas retrouvés après lésion électrolytique, mais plutôt à l'atteinte du cortex sensorimoteur parasagittal sus-jacent (Hofferer et Cassel, 1996), obligatoirement touché par l'aspiration.

Dans notre première expérience, nous avons observé un déficit marqué de la coordination sensori-motrice chez nos animaux lésés lors du passage du test de franchissement de la barre. Cependant, les animaux traités à l'AGP avaient de bien meilleures performances, alors que l'atteinte corticale était identique dans les deux groupes (Muller et coll., 2007). L'analyse morphologique des cerveaux nous a permis de constater de larges plages de nécrose affectant les noyaux thalamiques chez les animaux lésés. La dégénérescence neuronale rétrograde dans le thalamus des mammifères à la suite d'une lésion corticale a déjà été mentionnée (Walker, 1966 ; Brodal, 1981). Des lésions affectant le cortex sensori-moteur parasagittal, en particulier, sont capables d'induire des dégénérescences neuronales massives dans les noyaux thalamiques ventropostéromédian, ventropostérolatéral, intralaminaire et postérieur (Walker, 1966; Brodal, 1981; Iizuka et coll., 1990), Ces régions étaient effectivement atteintes chez nos animaux lésés traités au NaCl.

Après traitement à l'AGP, l'extension dorso-ventrale des nécroses thalamiques est significativement diminuée et les noyaux profonds, tels que le ventropostérolatéral, ne sont plus touchés (Muller et coll., 2007). Ce noyau a été décrit comme étant un relai à travers lequel convergent et transitent les informations somato-sensorielles concernant les membres antérieurs et postérieurs (Faull et Mehler, 1985). Contrairement à ce que l'on a longtemps pensé, les aires thalamiques sont en fait capables, tout comme le cortex à qui l'on attribuait spécifiquement ce

rôle, de participer activement à l'analyse et l'intégration fine des informations sensorielles (Sherman et Guillery, 1996; Merabet et coll., 1998 ; Casanova et coll., 1999). Les effets neuroprotecteurs et/ou de sauvetage neuronal du traitement à l'AGP contre les nécroses thalamiques secondaires pourraient ainsi avoir préservé un fonctionnement thalamique suffisant pour rendre compte de la récupération des fonctions sensori-motrices observée chez les rats ayant bénéficié de ce traitement.

De nombreuses fonctions, attribuées à la putrescine ou à l'aminoguanidine, peuvent intervenir à ce niveau. Chacun des composés est capable de minimiser l'accumulation des radicaux libres, la peroxydation des lipides, la formation des ROS et les produits de glycation avancés (Gilad et Gilad, 1992; Zimmerman et coll., 1995; Giardino et coll., 1998). Les polyamines présentent également, au moins in vitro, des propriétés anti-inflammatoires (Zhang et coll., 2000) et sont capables de stimuler le système immunitaire pour favoriser la sécrétion de facteurs trophiques par les cellules microgliales (Soulet et Rivest, 2003).

Dans nos deux expériences suivantes, nous avons essayé de nous affranchir au maximum de ces problèmes de dégénérescence thalamique. En réduisant la largeur de la lésion de 0,5 mm, nous avons pu limiter l'impact de la lésion sur le cortex sensorimoteur, tout en conservant une lésion totale des voies SHD. Cette nouvelle procédure chirurgicale nous a permis d'empêcher la dégénérescence secondaire rétrograde observée au niveau thalamique, et de conserver de bonnes performances de coordination sensori-motrice chez les animaux lésés.

Comparativement aux résultats d'Elie Hofferer-Duconseille (thèse de doctorat, 1997), qui observait, dans le même modèle de lésion, un niveau stable d'activité locomotrice jusqu'à un an après l'intervention chirurgicale, l'hyperactivité induite par la lésion, dans nos expériences, diminue au cours du temps, dès les premiers mois post-lésionnels. En comparant les procédures opératoires, nous avons constaté que l'étendue de la lésion réalisée par Hofferer-Duconseille était, sur l'axe antéropostérieur, trois fois plus importante que la nôtre (de 1,5 à 0,5mm). La taille importante de la cavité était nécessaire pour y insérer des hydrogels prédécoupés, problème dont nous nous sommes affranchis en utilisant des hydrogels injectables.

L'atteinte du cortex cingulaire, épargné par notre lésion, pourrait expliquer les différences comportementales observées. En effet, projetant dans le striatum (Paxinos, 2004), le cortex cingulaire est impliqué dans l'inhibition de l'activité locomotrice (Hadland et coll., 2003). C'est donc ce cortex qui pourrait, chez nos animaux, diminuer l'hyperactivité locomotrice en compensant progressivement les perturbations fonctionnelles de l'hippocampe induites par la lésion.

Nous avons également observé une réduction de la prise de poids chez nos animaux lésés, non mentionnée par Elie Hofferer-Duconseille. Celle-ci pourrait être corrélée à l'augmentation de l'activité locomotrice induite par la lésion, les dépenses énergétiques étant alors plus importantes pour ces animaux. Cependant, comme nous venons de le mentionner, l'activité locomotrice des animaux lésés se rapproche, au cours des mois, de celle des animaux pseudo-opérés, alors que l'écart de masse corporelle tend, au contraire, à s'accroître. Même si aucun effet anorexigène majeur n'a été remarqué lors du suivi des animaux pendant toute la durée des expériences, il est envisageable que la lésion provoque une anorexie modérée ou une augmentation du métabolisme corporel.

Notre modèle lésionnel comprend la création d'une cavité cérébrale, qui peut s'apparenter aux lésions traumatiques chirurgicales ou accidentelles touchant le SNC chez l'être humain, par exemple dans le cadre d'une résection de tumeur. Le comblement de la cavité est alors indispensable pour fournir un support physique aux axones qui pourraient régénérer. Nous nous sommes orientés vers des biomatériaux facilement implantables, aptes à soutenir la croissance cellulaire au travers de la cavité, et à fournir une bonne interface avec le tissu cérébral.

Tous les hydrogels que nous avons utilisés ont montré une très bonne adhérence avec le tissu hôte, ce qui indique que le fait d'être liquides au moment de l'implantation est un atout important, favorisant l'interface tissu cérébral / biomatériau.

Malgré les difficultés rencontrées pour préserver une stabilité suffisante des hydrogels d'alginate pour être compatible avec l'étude morphologique détaillée du biomatériau, nous avons pu observer l'infiltration de cellules gliales et de neurites dans les fragments d'hydrogels retrouvés en bordure du tissu cérébral, chez les animaux ayant reçu un traitement à l'AGP. Ces observations n'ont pas été retrouvées après implantation du Matrigel. Ce dernier étant pourtant aussi favorable à la croissance cellulaire que l'alginate (Novikova et coll., 2006), ses difficultés à être envahi par du matériel biologique peut s'expliquer par la plus grande rigidité de sa matrice. Des travaux antérieurs, réalisés au sein de mon laboratoire d'accueil avec des hydrogels préformés de Poly(oxyde éthylène), ont déjà souligné que la rigidité du maillage du biomatériau est inversement proportionnelle à l'infiltration cellulaire (Naraghi et coll., 1998). Les hydrogels d'alginate, quant à eux, ont été synthétisés en tenant compte de ce paramètre, et présentent une densité très similaire à celle du tissu cérébral.

De façon surprenante, nous avons noté que la présence d'un hydrogel d'alginate ester dans la cavité lésionnelle est capable d'augmenter l'activité de l'AChE dans la région hippocampique adjacente. Celle-ci n'étant manifestement pas corrélée à une augmentation du nombre de fibres cholinergiques, nous supposons que la présence des liaisons ester de l'hydrogel au niveau de la cavité lésionnelle augmente la production intracérébrale d'estérases, incluant l'AChE. L'activité accrue de cette dernière pourrait renforcer la dégradation de l'acétylcholine, entraînant la diminution de la transmission cholinergique de l'hippocampe, déjà fortement affecté par la lésion. Elle pourrait ainsi rendre compte de l'augmentation des déficits comportementaux, concernant notamment l'hyperactivité locomotrice, observés chez les animaux ayant reçu l'implantation d'un hydrogel d'alginate ester.

Malgré les données encourageantes sur la biocompatibilité des hydrogels d'alginate et leur propension à être envahi par du matériel biologique, leur inconvénient majeur réside dans leur trop grande dégradabilité in vivo. L'utilisation de matrices de régénération implantées à long terme au niveau de la moelle épinière a déjà donné des résultats très encourageants, permettant la restauration, ne fut-ce que partielle, des fonctions motrices chez les animaux (Schwab et Bartholdi, 1996;

Piantino et coll., 2006). Dans le cerveau, la situation est manifestement plus complexe, surtout dans le cadre de cavités lésionnelles superficielles. Les hydrogels ne peuvent pas être maintenus dans un carcan naturel (méninges et canal rachidien) ou artificiel (gaine de polymère, par exemple), et leurs contraintes physico-chimiques pour s'adapter au milieu cérébral engendrent des problèmes de stabilité dans le temps. Même les hydrogels d'alginate amide, pourtant plus résistants, n'ont pas supporté l'implantation in vivo à long terme et se sont fragmentés et dégradés à l'intérieur de la cavité. Des modifications de leur synthèse sont indispensables pour les rendre compatibles avec un rôle de support physique soutenant la croissance cellulaire et la régénération des fibres nerveuses.

Dans nos expériences, aucune fibre nerveuse n'ayant pu franchir la cavité pour permettre une reconnexion entre le septum et sa structure cible, l'hippocampe, les effets bénéfiques des traitements administrés ne peuvent s'expliquer que par la mise en place de mécanismes compensatoires palliant les perturbations fonctionnelles occasionnées par la lésion.

Au niveau du septum, nous avons observé une augmentation du nombre de neurones ChAT positifs après traitement à l'AGP et élevage en environnement enrichi. Il est probable que cet effet neuroprotecteur sur les neurones septaux fasse intervenir des facteurs neurotrophiques, puisque les polyamines (Gilad et Gilad, 1999), tout comme l'EE (Pham et coll., 2002), sont capables de stimuler la synthèse de ces facteurs.

D'autre part, les mêmes effets neuroprotecteurs ont été obtenus avec des applications de NGF (Will et Hefti, 1985). Cependant, une infusion continue à long terme de NGF est nécessaire pour permettre la ré-expression permanente de ChAT (Naumann et coll., 1994b), alors que dans nos conditions, des effets protecteurs à long terme (supérieurs à 4 mois) sont obtenus avec seulement 5 injections intrapéritonéales quotidiennes d'AGP. L'aminoguanidine étant capable de prolonger la demi-vie des polyamines en inhibant leurs enzymes de dégradation, il est probable

que son administration combinée à celle de la putrescine puisse rendre compte des effets neuroprotecteurs prolongés et renforcés du traitement à l'AGP.

Cinq semaines d'élevage en milieu enrichi permettent d'obtenir le même résultat. Il est cependant intéressant de noter que ces effets bénéfiques sur l'expression de la ChAT par les neurones septaux se perd à plus long terme, puisque nous ne les avons plus retrouvés près d'un an après l'arrêt des traitements, même dans le cas d'un traitement combinant l'AGP et l'élevage en milieu enrichi. Les neurones, dans ce laps de temps, n'ayant pu reconnecter leur structure cible, aucune fibre n'ayant pu traverser la cavité lésionnelle en l'absence d'un support physique adéquat, ils n'ont pu bénéficier du flux rétrograde de neurotrophines décrit pour les neurones cholinergiques septaux fonctionnels innervant l'hippocampe et nécessaire à l'activation de leur machinerie intracellulaire permettant la synthèse du neurotransmetteur.

Aucun effet à long terme des RGTAs sur l'expression septale de la ChAT n'a pu être détecté. L'étude morphologique étant trop éloignée de l'administration du traitement, les effets des RGTAs sur les neurones ChAT, par l'intermédiaire des facteurs de croissance, pourraient entraîner à court terme le sauvetage de phénotype ChAT qui ne serait pas retrouvé à long terme (Will et Hefti, 1985; Naumann et coll., 1994b).

En ce qui concerne l'hippocampe, nous avons pu observer une augmentation des marqueurs cholinergiques après les traitements à l'AGP, aux RGTAs et l'élevage en milieu enrichi, seuls ou combinés.

Nos données ont montré l'augmentation de l'activité de l'AChE, enzyme de dégradation de l'acétylcholine, dans l'hippocampe des animaux ayant reçu un traitement combiné d'AGP et de RGTAs. L'activité hippocampique de l'AChE étant proportionnelle à la densité de fibres cholinergiques innervant cette structure (Cassel et coll., 1997), le traitement administré semblait avoir stimulé une réinnervation cholinergique de l'hippocampe. Ces données ont été confirmées par le marquage immunocytochimique du transporteur vésiculaire de l'ACh. Nous avons pu retrouver

des fibres VAcHT-positives dans l'hippocampe des animaux traités à l'AGP, aux RGTAs ou élevés en milieu enrichi, alors qu'aucune fibre n'est détectée chez les animaux lésés traités au NaCl.

Les interneurones cholinergiques étant incapables de bourgeonner (Haas et coll., 1998), et aucune fibre cholinergique n'ayant traversé les hydrogels, la réinnervation cholinergique partielle du gyrus denté de l'hippocampe peut provenir de différentes voies.

Tout d'abord, ces fibres cholinergiques peuvent provenir d'un bourgeonnement issu de la voie septo-hippocampique ventrale, non affectée par la lésion (pour revue voir Cassel et coll., 1997). Comme l'avaient déjà montré Gage et ses collaborateurs (1983, 1984), un tel bourgeonnement, s'installant progressivement, peut se produire spontanément après lésion du fornix, en l'absence de traitement spécifique. Dépendant de la sévérité et de la durée écoulée depuis la lésion, il reste cependant peu développé à des délais post-lésionnels relativement longs (Dravid et Van Deusen, 1984; Gage et Bjorklund, 1986; Bratt et coll., 1995).

Les traitements à l'AGP, aux RGTAs et l'élevage en milieu enrichi peuvent avoir renforcé ce mécanisme, puisque aussi bien les polyamines que les facteurs neurotrophiques stimulent la croissance axonale (Yamaguchi, 2001; Moon et coll., 2002; Cai et coll., 2002; Aizenman et coll., 2002).

Ces fibres VAcHT-positives peuvent également dériver des fibres orthosympathiques issues du ganglion cervical supérieur. Ces fibres ont en effet la capacité particulière d'acquérir un phénotype cholinergique et/ou de modifier leur fonctionnement adrénérgique vers un phénotype fonctionnel cholinergique (Scheiderer et coll., 2006). Les traitements administrés, seuls ou en combinaison, pourraient stimuler ces processus en favorisant la synthèse et les effets des facteurs neurotrophiques, connus pour guider les fibres orthosympathiques dans l'hippocampe après lésion du septum (Crutcher, 1987) et d'induire leur changement de phénotype (Landis et Keefe, 1983; Madziar et coll., 2005).

Enfin, les polyamines (Malaterre et coll., 2004), les HS protéoglycanes (Yamaguchi, 2001), l'élevage en environnement enrichi (Kempermann et coll., 1997;

Kempermann et coll., 1998) étant capables de stimuler la neurogenèse dans le gyrus denté, la réinnervation partielle de l'hippocampe par un petit nombre de fibres VAChT-positives, issues de la prolifération et/ou de la différenciation de nouveaux neurones cholinergiques, ne peut être exclue.

La réinnervation cholinergique de l'hippocampe, induite par l'AGP, les RGTAs et l'élevage en environnement enrichi, semble coïncider avec la diminution apparente du bourgeonnement sympathique compensatoire. Comme nous venons de le décrire, ceci peut être dû au changement de phénotype d'un petit nombre de fibres adrénergiques passant à un fonctionnement cholinergique. Cependant, d'autres études ont montré que la restauration de paramètres cholinergiques dans un hippocampe désafférenté peut être associée à une réduction des concentrations de noradrénaline très augmentées plusieurs mois après lésion (Cassel et coll., 1992; Cassel et coll., 1993; Scheiderer et coll., 2006) a même démontré que les quelques boutons synaptiques VAChT-positifs, observés dans l'hippocampe après destruction des voies cholinergiques septo-hippocampiques, sont fonctionnels, exerçant des effets compensatoires sur l'activité perturbée de l'hippocampe, qui se traduisent même sur les phénomènes de dépression à long terme impliquant cette structure.

Ainsi, il paraît vraisemblable que le petit nombre de fibres VAChT-positives détectées dans l'hippocampe des animaux lésés traités à l'AGP, aux RGTAs, ou élevés en milieu enrichi, puissent libérer des quantités suffisantes d'Ach pour réduire le bourgeonnement sympathique. L'augmentation de l'AchE observée avec les mêmes traitements semble confirmer la fonctionnalité de ces fibres cholinergiques.

Nos études ont ainsi montré que le traitement à l'AGP, les RGTAs et l'élevage en milieu enrichi stimulent la restauration des paramètres cholinergiques, à la fois dans le septum en stimulant l'expression de la ChAT, et dans l'hippocampe

désafférenté en restaurant une innervation cholinergique fonctionnelle compensatoire.

Les effets neuroprotecteurs et neurotrophiques du NGF sur les neurones cholinergiques septaux coïncident avec l'amélioration des performances comportementales (Will et Hefti, 1985). Il est ainsi tentant d'établir un parallèle entre nos données morphologiques et les compensations fonctionnelles observées au niveau comportemental chez nos animaux traités.

Le traitement à l'AGP et l'élevage en environnement enrichi pourraient ainsi, en stimulant une réinnervation cholinergique partielle, rétablir un fonctionnement hippocampique suffisant pour restaurer un contrôle inhibiteur sur le noyau accumbens afin de réduire l'hyperactivité locomotrice. C'est, en effet, la composante cholinergique de l'hippocampe qui est impliquée dans ce contrôle (Lehmann et coll., 2002).

C'est également elle qui est impliquée lors de l'acquisition d'un conditionnement de peur au contexte, sa libération augmentant dans l'hippocampe au moment de la phase d'acquisition (Nail-Boucherie et coll., 2000). L'augmentation du temps d'immobilité au moment du conditionnement, observée chez nos animaux LMAR élevés en environnement enrichi, pourrait ainsi être expliquée par la restauration d'un taux suffisant d'acétylcholine hippocampique. Les temps d'immobilité prolongés observés pour tous nos animaux lors du test de rappel, indiquant que ces rats présentent un niveau élevé de peur au contexte, seraient plutôt liés au fonctionnement amygdalien. En effet, les processus de peur au contexte étant supportés par plusieurs structures cérébrales, ils peuvent être totalement pris en charge par l'amygdale en cas de dysfonctionnement hippocampique (Phillips et LeDoux, 1995).

Le petit nombre de fibres cholinergiques retrouvées dans l'hippocampe des animaux lésés traités à l'AGP de notre première expérience aurait pu contribuer à l'amélioration des performances observées dans le test de la piscine de Morris. Cependant, ces dernières apparaissent beaucoup plus liées à l'amélioration des

capacités de coordination sensorimotrice, déjà décrites chez ces animaux, qu'à une réelle récupération de leurs fonctions cognitives. Ainsi, si la réduction du temps et / ou de la distance nécessaires aux animaux pour trouver la plateforme reflète en général leurs capacités mnésiques (Morris, 1984), elle peut également être affectée par d'autres facteurs (Schulz et coll., 2002). Par exemple, le fait que les animaux lésés traités avec l'AGP montrent un comportement thigmotaxique plus faible que celui de leurs homologues traités au NaCl peut indiquer une baisse de l'anxiété chez ces animaux, ou de meilleures capacités natatoires en lien avec l'amélioration de leur coordination sensorimotrice. Ces processus pourraient s'accompagner, de surcroît, d'une motivation plus élevée à trouver la plate-forme chez ces animaux. L'absence d'amélioration de leurs performances lorsque la plate-forme est invisible, et l'absence d'une réelle stratégie de recherche au cours du test de rétention, suggèrent que ces animaux ignorent en fait la localisation de la plate-forme. Leurs meilleures performances, comparativement à celles de leurs homologues traités au NaCl, sont liées au fait que ces animaux passent moins de temps à longer les bords de la piscine et plus de temps à nager au centre du bassin, augmentant ainsi leurs chances de trouver la plate-forme.

Cependant, la combinaison du traitement à l'AGP et/ou aux RGTAs avec l'élevage en milieu enrichi a permis d'améliorer de façon significative les performances cognitives des animaux lésés. En effet, ces animaux ont été capables de développer une stratégie spatiale de recherche de la plate-forme, observée lors du test de rétention, et une diminution des persévérations dans le labyrinthe en T.

L'augmentation de la transmission cholinergique et la diminution des comportements persévératifs permet certainement, lors du test de la piscine, la mise en place d'une stratégie plus élaborée que celle de tourner en rond, dans laquelle les animaux lésés non traités persévèrent. La restauration partielle de l'acétylcholine dans l'hippocampe pourrait redonner une flexibilité comportementale aux animaux, leur permettant d'adopter une stratégie spatiale, comme cela a été montré dans d'autres études (Numan et Quaranta, 1990; Whishaw et Tomie, 1997).

Néanmoins, nous avons pu observer la mise en place d'une stratégie spatiale chez des animaux ne présentant pas d'augmentation claire des marqueurs cholinergiques hippocampiques, ce qui peut suggérer l'implication d'autres systèmes

de neurotransmission compensatoires, pouvant trouver leur origine, comme l'ont montré Zhao et ses collaborateurs, dans la neurogénèse stimulée par nos traitements (Zhao et coll., 2006).

Une amélioration des stratégies d'exploration utilisées par les animaux peut également expliquer les meilleures performances observées lors du test de mémoire spatiale. On retrouve en effet, chez les animaux LMR et LMA élevés en milieu enrichi, un comportement exploratoire plus développé dans le labyrinthe en croix surélevé que celui des autres animaux lésés. La lésion des voies SDH entraîne chez les animaux une grande difficulté à évaluer les distances, processus indispensable pour une exploration efficace de l'environnement (Gorny et coll., 2002). Les systèmes de neurotransmission impliqués dans la mise en place d'un tel processus ne sont pas encore identifiés. Il semblerait néanmoins que la transmission cholinergique ne soit pas impliquée, ce comportement n'étant pas restauré chez les rats LMAR élevés en environnement enrichi, qui présentent l'une des plus fortes réinnervations cholinergiques de l'hippocampe.

Nos résultats ont mis en évidence que les graves déficits neurochimiques, comportementaux et cognitifs, engendrés par la lésion, peuvent être partiellement réduits par la combinaison de nos traitements. En l'absence de reconstruction des voies nerveuses endommagées, les effets des mécanismes compensatoires stimulés par nos traitement restent cependant limités.

Compte tenu de la taille de la cavité et du modèle lésionnel choisi, trop de structures différentes sont peut-être affectées (cortex, corps calleux, voies septo-hippocampiques dorsales, ...) pour qu'une véritable réparation fonctionnelle soit possible. D'autre part, il semble exister une dissociation entre les bénéfices induits par les traitements à l'échelle structurale et les améliorations comportementales subséquentes. Par exemple, la restauration de certains paramètres cholinergiques dans l'hippocampe des animaux ayant bénéficié de l'ensemble des traitements dans notre troisième expérience n'est pas accompagnée d'amélioration fonctionnelle additionnelle par rapport aux autres groupes. Un tel décalage avait déjà été observé (Cassel et coll., 1990) dans le même modèle lésionnel, la réinnervation cholinergique

hippocampique induite par des greffes de cellules septales n'ayant eu aucune répercussion détectable à l'échelle comportementale.

L'association de différentes approches peut également entraîner des interactions négatives. Nous n'avons pas encore abordé une telle étude au niveau de nos traitements, que ce soit au niveau des mécanismes d'action, des doses utilisées, de la durée et de la fréquence d'administration, et des effets secondaires éventuels.

Cependant, compte tenu de la hauteur du défi engagé, les effets bénéfiques induits par nos traitements représentent une avancée thérapeutique suffisamment intéressante pour être approfondie et optimisée. En plus d'être soutenue par un biomatériau adéquat, elle nécessitera sans doute d'être complétée par d'autres approches porteuses en ce domaine, issues notamment de la thérapie cellulaire.

Conclusion et Perspectives

L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier, dans un modèle de lésion par aspiration des voies septo-hippocampiques dorsales et de leurs structures sus-jacentes, les effets morphologiques et fonctionnels de traitements capables de promouvoir les processus de régénération au sein du SNC, et qui, utilisés en association, étaient susceptibles d'être complémentaires et/ou d'agir en synergie.

Mes travaux ont tout d'abord mis en évidence les effets bénéfiques du traitement combiné d'aminoguanidine et de putrescine, testé pour la première fois dans le SNC. Ce traitement a manifesté des effets neuroprotecteurs et/ou anti-inflammatoires, capables de limiter les processus de dégénérescences rétrogrades affectant les noyaux thalamiques, pour atténuer les graves déficits sensorimoteurs observés chez nos animaux. Egalement neurotrophique et/ou stimulant la neurogénèse, le traitement à l'AGP a permis de compenser quelque peu la dénervation cholinergique de l'hippocampe, pour permettre la réduction de l'hyperactivité locomotrice engendrée par la lésion.

Ces effets, bien qu'encourageants, devaient absolument être renforcés et complétés par l'implantation d'un pont de régénération, capable de combler la cavité lésionnelle, de soutenir les processus de régénération cellulaire et d'assurer un support physique aux axones, stimulés par l'AGP, pour leur permettre de reconnecter leur structure cible.

Ainsi la seconde partie de mes travaux, réalisée en collaboration avec les chimistes du LCPM de Nancy, et notamment de Frédéric Vallée, au cours de sa thèse de doctorat, a concerné le développement, l'implantation et l'étude du comportement in vivo de deux hydrogels d'alginate. La synthèse du premier hydrogel a en effet été modifiée pour remplacer les fonctions ester, trop sensibles aux dégradations enzymatiques présentes dans l'environnement cérébral, par des fonctions amide liant les chaînes alkyles au squelette d'alginate. Ces deux matériaux, parfaitement biocompatibles, associatifs, rhéofluidifiants et thixotropes, ont été particulièrement aisés à manipuler, injectables à la seringue pour épouser au mieux la forme de la cavité lésionnelle sans comprimer les tissus avoisinants.

Ces hydrogels se sont malheureusement révélés trop instables, se dissociant et se fragmentant très rapidement dans la cavité lésionnelle en raison de leur dégradabilité trop importante. Cependant, leur consistance, proche de celle du tissu cérébral, et leurs propriétés physico-chimiques (notamment celles de l'hydrogel d'alginate amide), a permis leur colonisation par des cellules gliales et des neurites chez les animaux traités à l'AGP.

Ainsi la combinaison du traitement AGP et de l'hydrogel amide s'est révélée la plus prometteuse. Cependant, il est indispensable de renforcer la stabilité de l'hydrogel, pour conserver ses qualités mais éviter sa désagrégation et son élimination trop rapide de la cavité lésionnelle. Sa structure associative, soluble en milieu aqueux, n'est peut-être pas adaptée aux flux de liquide céphalorachidien baignant la cavité.

Pour la dernière partie de nos expériences, nous avons utilisé un autre biomatériau, thermosensible et injectable à froid, le Matrigel, constitué de molécules de la matrice extracellulaire favorables à la croissance neuritique. Près d'un an après son implantation, aucune infiltration cellulaire n'a été détectée dans le Matrigel, même chez les animaux traités à l'AGP. De plus, le Matrigel s'est révélé, lui aussi, trop facilement dégradable in vivo. Ce matériau a cependant été développé pour la culture cellulaire, ce qui laisse penser que les conditions d'implantation cérébrale sont fortement drastiques et malmènent la structure du biomatériau.

Nous avons essayé de renforcer les effets de l'AGP par des traitements ciblant l'augmentation de synthèse, la protection et la biodisponibilité des facteurs neurotrophiques endogènes. Ainsi, l'administration de RGTAs, facteurs de régénération jamais encore testés dans un modèle de lésion traumatique du SNC, et l'élevage en milieu enrichi, mimant les protocoles de réhabilitation fonctionnelle utilisés en clinique, ont été associés au traitement des animaux. Nous avons ainsi pu observer les effets neurotrophiques des RGTAs, qui ont favorisé la réinnervation hippocampique par des fibres cholinergiques, et confirmer les effets neuroprotecteurs de l'AGP. Ces effets ont été potentialisés par l'élevage en milieu enrichi des animaux. Nous avons ainsi pu observer une véritable synergie entre l'élevage postopératoire en milieu enrichi et le traitement à l'AGP et/ou aux RGTAs. L'association de ces approches a permis d'améliorer, bien que partiellement, chez

des animaux lésés, les performances de mémoire spatiale. De tels résultats n'avaient encore jamais été obtenus au sein du laboratoire, indiquant que l'association de l'élevage en environnement enrichi avec le traitement à l'AGP et/ou aux RGTAs, est particulièrement favorable à la promotion de la survie cellulaire et aux mécanismes de plasticité cérébrale. Il est cependant indispensable de trouver la matrice permissive adéquate permettant de soutenir les processus de régénération cérébraux stimulés par les autres traitements, et de permettre à des voies nerveuses lésées de reconnecter leur structure cible.

Dans ce type d'étude, la stabilité au cours du temps et les propriétés physico-chimiques favorisant l'infiltration cellulaire du biomatériau sont cruciales. Ainsi les travaux ultérieurs devront inclure l'optimisation de la matrice implantée. L'hydrogel d'alginate amide reste le meilleur candidat en matière de pont de régénération que nous avons pu utiliser. Il est cependant indispensable de le stabiliser.

En dehors des procédures chimiques qui dépassent mes compétences, il pourrait être intéressant d'envisager une association de biomatériaux, approche qui paraît prometteuse à l'heure actuelle.

On pourrait ainsi associer du collagène à l'hydrogel d'alginate amide, composé favorable à la croissance axonale et permettant de renforcer la stabilité du polymère (Hahn et coll., 2006). D'autre part, l'incorporation de réseaux de nanofibres dans le biomatériau pourrait en améliorer les propriétés. Les nanofibres sont en effet capables de former des échafaudages tridimensionnels, comparables en structure et en diamètre fibrillaire avec ceux de la matrice extracellulaire du tissu nerveux (Vasita et Katti, 2006). De plus, elles fournissent un environnement particulièrement favorable aux processus d'adhérence neuronale, de migration, de prolifération et de différenciation cellulaire (Martins et coll., 2007). Les nanofibres de carbone, en particulier, possèdent des propriétés sélectives, positives envers les neurones et négatives envers les astrocytes, ce qui permet la réduction de la cicatrice gliale (McKenzie et coll., 2004). Hautement biocompatibles (Lesny et coll., 2007), elles peuvent être organisées en sous-couches favorisant l'orientation spatiale de la croissance cellulaire (Pradny et coll., 2007).

Déjà utilisées comme implants dans la moelle épinière, les nanofibres ont permis l'infiltration et le développement du tissu connectif, des vaisseaux sanguins et des processus neuronaux. Elles semblent ainsi représenter une approche particulièrement prometteuse pour stimuler les processus de reconstruction des tissus nerveux dans le SNC (pour revue, Hejcl et coll., 2008).

Une autre possibilité pourrait être de renforcer les effets combinatoires de tous les traitements (AGP, RGTA, et élevage en milieu enrichi), afin de permettre une colonisation cellulaire plus rapide de l'hydrogel, avant que celui-ci ne se détériore. Ainsi, le maintien en continu des conditions d'élevage en milieu enrichi, au-delà des 5 semaines post-lésionnelles que nous avons fixées, et la réadministration de RGTAs pour continuer à protéger les facteurs neurotrophiques endogènes stimulés par l'environnement enrichi, pourraient accélérer et renforcer les processus. L'administration prolongée des polyamines n'est peut-être pas souhaitable. Malgré tout, une libération plus ciblée du traitement à l'AGP pourrait être envisagée. En plus de limiter la manipulation des animaux au cours des premiers jours postopératoires, alors qu'ils sont en pleine rage septale et très affectés par l'intervention chirurgicale, et de leur épargner des injections intrapéritonéales qui paraissent particulièrement douloureuses pendant cette période, l'administration continue du traitement à l'AGP au voisinage du site de lésion pourrait renforcer ses effets neuroprotecteurs, neurotrophiques et anti-inflammatoires. Dans cet objectif, des études d'encapsulation ont été réalisées par Frédéric Vallée. L'incorporation de l'aminoguanidine et de la putrescine directement dans l'hydrogel est possible. Cependant, la cinétique de libération respective des deux composés, préliminairement testée *in vitro* dans une chambre de microdialyse, n'a pas encore été déterminée *in vivo*. Si celle-ci est trop rapide, il serait envisageable d'incorporer à l'hydrogel des particules de PLA (poly[lactate acid]) renfermant les deux molécules, et permettant de réguler leur cinétique de relargage.

Enfin, et bien que j'aie choisi de ne pas aborder les thérapies cellulaires en introduction, celles-ci ne peuvent être écartées, à l'heure actuelle, des perspectives thérapeutiques. Il est ainsi envisageable d'incorporer au polymère des cellules fœtales

septales (Cassel et coll., 1993 ; Marques-Pereira et coll., en préparation), ou des cellules souches neurales (Jeltsch et coll., 2003) déjà utilisées au sein du laboratoire.

Au cours de ces dernières années, les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) ont été utilisées dans les approches thérapeutiques concernant de nombreuses atteintes lésionnelles du SNC, incluant des lésions de la moelle épinière (Prockop, 1997; Urdzikova et coll., 2006; Sykova et Jendelova, 2007a; Sykova et Jendelova, 2007b). Après transplantation dans le cerveau, les MSCs répondent aux signaux locaux et sont capables de protéger les cellules endommagées et d'accélérer les processus de régénération en sécrétant des facteurs trophiques (Kopen et coll., 1999; Brazelton et coll., 2000; Li et coll., 2002; Sykova et Jendelova, 2006; Urdzikova et coll., 2006). Récemment, divers essais ont été tentés pour créer des polymères enrichis cellulaires, formant des biosystèmes hybrides, capables de combler une large cavité lésionnelle (Loh et coll., 2001; Li et coll., 2002; Hejcl et coll., 2008).

Une matrice ainsi enrichie pourrait alors exercer un double rôle, celui de favoriser le développement des cellules greffées, et celui de supporter la croissance des fibres assurant, dans notre modèle, la reconnexion des structures septales et hippocampiques.

Pour conclure, bien que nous n'ayons par réussi à faire traverser les fibres nerveuses au travers de la cavité lésionnelle, les effets combinés de nos traitements, stimulant la survie et la plasticité neuronales, laissent envisager un fort potentiel thérapeutique, à condition qu'ils soient associés à une matrice permissive suffisamment stable *in vivo* pour permettre la reconnexion des structures isolées par la lésion.

Mais ceci ne représentera sans doute qu'une première étape dans la reconstruction structurelle et fonctionnelle de voies nerveuses au sein du tissu cérébral. D'autres étapes seront, sans aucun doute, tout aussi délicates. Il restera notamment à déterminer comment, si la croissance des fibres nerveuses est possible au travers d'une matrice permissive stable, les axones pourront être guidés vers leur

cible spécifique pour y établir des synapses fonctionnelles (Tessier-Lavigne et Goodman, 1996), et comment sera assurée la myélinisation de ces nouvelles fibres.

La restauration du SNC n'étant envisagée comme possible que depuis une trentaine années, les investigations dans ce domaine en plein essor restent, à l'heure actuelle encore, un passionnant défi.

Références Bibliographiques

- A -

Aamiri A, Butler-Browne GS, Martelly I, Barritault D, Gautron J (1995a) Influence of a dextran derivative on myosin heavy chain expression during rat skeletal muscle regeneration. *Neurosci Lett* 201: 243-246.

Aamiri A, Mobarek A, Carpentier G, Barritault D, Gautron J (1995b) [Effects of substituted dextran on reinnervation of a skeletal muscle in adult rats during regeneration]. *C R Acad Sci III* 318: 1037-1043.

Abe N, Cavalli V (2008) Nerve injury signaling. *Curr Opin Neurobiol* 18: 276-283.

Acevedo L, Yu J, Erdjument-Bromage H, Miao RQ, Kim JE, Fulton D, Tempst P, Strittmatter SM, Sessa WC (2004) A new role for Nogo as a regulator of vascular remodeling. *Nat Med* 10: 382-388.

Aggleton JP, Neave N, Nagle S, Hunt PR (1995) A comparison of the effects of anterior thalamic, mamillary body and fornix lesions on reinforced spatial alternation. *Behav Brain Res* 68: 91-101.

Agrawal SM, Lau L, Yong VW (2008) MMPs in the central nervous system: where the good guys go bad. *Semin Cell Dev Biol* 19: 42-51.

Aizenman CD, Munoz-Elias G, Cline HT (2002) Visually driven modulation of glutamatergic synaptic transmission is mediated by the regulation of intracellular polyamines. *Neuron* 34: 623-634.

Alexakis C, Mestries P, Garcia S, Petit E, Barbier V, Papy-Garcia D, Sagot MA, Barritault D, Caruelle JP, Kern P (2004) Structurally different RGTAs modulate collagen-type expression by cultured aortic smooth muscle cells via different pathways involving fibroblast growth factor-2 or transforming growth factor-beta1. *FASEB J* 18: 1147-1149.

Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ (2005) Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol* 5: 629-640.

Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31: 571-591.

Amaral DG, Witter MP (1995) The hippocampal formation. In: *The Rat Brain*. G. Paxinos (2nd Ed.). Academic Press, 443-493.

Angelov DN, Walther M, Streppel M, Guntinas-Lichius O, Neiss WF, Probstmeier R, Pesheva P (1998) Tenascin-R is antiadhesive for activated microglia that induce downregulation of the protein after peripheral nerve injury: a new role in neuronal protection. *J Neurosci* 18: 6218-6229.

Anthony DC, Miller KM, Fearn S, Townsend MJ, Opdenakker G, Wells GM, Clements JM, Chandler S, Gearing AJ, Perry VH (1998) Matrix metalloproteinase expression in an experimentally-induced DTH model of multiple sclerosis in the rat CNS. *J Neuroimmunol* 87: 62-72.

Ariel A, Hershkoviz R, Cahalon L, Williams DE, Akiyama SK, Yamada KM, Chen C, Alon R, Lapidot T, Lider O (1997) Induction of T cell adhesion to extracellular matrix or endothelial cell ligands by soluble or matrix-bound interleukin-7. *Eur J Immunol* 27: 2562-2570.

Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP (2001) TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4: 1116-1122.

Asher RA, Morgenstern DA, Moon LD, Fawcett JW (2001) Chondroitin sulphate proteoglycans: inhibitory components of the glial scar. *Prog Brain Res* 132: 611-619.

Atalay B, Bavbek M, Cekinmez M, Ozen O, Nacar A, Karabay G, Gulsen S (2007) Antibodies neutralizing Nogo-A increase pan-cadherin expression and motor recovery following spinal cord injury in rats. *Spinal Cord* 45: 780-786.

Atan MS, Moochhala SM, Ng KC, Low K, Teo AL, Lu J (2004) Effects of aminoguanidine and L-arginine methyl ester resuscitation following induction of fluid-percussion injury and severe controlled hemorrhagic shock in the rat brain. *J Neurosurg* 101: 138-144.

Avshalumov MV, Rice ME (2003) Activation of ATP-sensitive K⁺ (K(ATP)) channels by H₂O₂ underlies glutamate-dependent inhibition of striatal dopamine release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11729-11734.

Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F (2004) Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 25: 3211-3222.

- B -

Backhauss C, Karkoutly C, Welsch M, Krieglstein J (1992) A mouse model of focal cerebral ischemia for screening neuroprotective drug effects. *J Pharmacol Toxicol Methods* 27: 27-32.

Balestrino M, Rebaudo R, Lunardi G (1999) Exogenous creatine delays anoxic depolarization and protects from hypoxic damage: dose-effect relationship. *Brain Res* 816: 124-130.

Balgude AP, Yu X, Szymanski A, Bellamkonda RV (2001) Agarose gel stiffness determines rate of DRG neurite extension in 3D cultures. *Biomaterials* 22: 1077-1084.

Bame KJ (2001) Heparanases: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans. *Glycobiology* 11: 91R-98R.

Banan A, McCormack SA, Johnson LR (1998) Polyamines are required for microtubule formation during gastric mucosal healing. *Am J Physiol* 274: G879-G885.

Bandtlow CE, Zimmermann DR (2000) Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* 80: 1267-1290.

Bannerman DM, Gilmour G, Norman G, Lemaire M, Iversen SD, Rawlins JNP (2001) The time course of the hyperactivity that follows lesions or temporary inactivation of the fimbria-fornix. *Behavioural Brain Research* 120: 1-11.

Bareyre FM, Haudenschild B, Schwab ME (2002) Long-lasting sprouting and gene expression changes induced by the monoclonal antibody IN-1 in the adult spinal cord. *J Neurosci* 22: 7097-7110.

Barnes PJ (2006) New therapies for asthma. *Trends Mol Med* 12: 515-520.

Barralet JE, Wang L, Lawson M, Triffitt JT, Cooper PR, Shelton RM (2005) Comparison of bone marrow cell growth on 2D and 3D alginate hydrogels. *J Mater Sci Mater Med* 16: 515-519.

Barritault D, Caruelle JP (2006) [Regenerating agents (RGAs): a new therapeutic approach]. *Ann Pharm Fr* 64: 135-144.

Barritt AW, Davies M, Marchand F, Hartley R, Grist J, Yip P, McMahon SB, Bradbury EJ (2006) Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. *J Neurosci* 26: 10856-10867.

Bashkin P, Doctrow S, Klagsbrun M, Svahn CM, Folkman J, Vlodavsky I (1989) Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. *Biochemistry* 28: 1737-1743.

- Beaven MA, Gordon JW, Jacobsen S, Severs WB (1969) A specific and sensitive assay for aminoguanidine: its application to a study of the disposition of aminoguanidine in animal tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 165: 14-22.
- Beck H, Acker T, Puschel AW, Fujisawa H, Carmeliet P, Plate KH (2002) Cell type-specific expression of neuropilins in an MCA-occlusion model in mice suggests a potential role in post-ischemic brain remodeling. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 339-350.
- Beck T, Bielenberg GW (1991) The effects of two 21-aminosteroids on overt infarct size 48 hours after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res* 560: 159-162.
- Bellamkonda R, Ranieri JP, Aebischer P (1995a) Laminin oligopeptide derivatized agarose gels allow three-dimensional neurite extension in vitro. *J Neurosci Res* 41: 501-509.
- Bellamkonda R, Ranieri JP, Bouche N, Aebischer P (1995b) Hydrogel-based three-dimensional matrix for neural cells. *J Biomed Mater Res* 29: 663-671.
- Benowitz LI, Perrone-Bizzozero NI (1991) The relationship of GAP-43 to the development and plasticity of synaptic connections. *Ann N Y Acad Sci* 627: 58-74.
- Benveniste O, Vaslin B, Le Grand R, Dormont D (1998) Comparing IL-6, TNF-alpha, and IL-1beta responses to acute infection with attenuated nef-truncated or pathogenic SIVmac251 in macaque peripheral blood mononuclear cells. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 18: 389-390.
- Benzie IF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76.
- Bernard O (2007) Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 1071-1076.
- Bernardi P, Petronilli V (1996) The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *J Bioenerg Biomembr* 28: 131-138.
- Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 68: 729-777.
- Bertrand J, Di Polo A, McKerracher L (2007) Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal neurons by repeated delivery of cell-permeable C3-like Rho antagonists. *Neurobiol Dis* 25: 65-72.
- Bertrand J, Winton MJ, Rodriguez-Hernandez N, Campenot RB, McKerracher L (2005) Application of Rho antagonist to neuronal cell bodies promotes neurite growth in compartmented cultures and regeneration of retinal ganglion cell axons in the optic nerve of adult rats. *J Neurosci* 25: 1113-1121.
- Bian Q, Shi T, Chuang DM, Qian Y (2007) Lithium reduces ischemia-induced hippocampal CA1 damage and behavioral deficits in gerbils. *Brain Res* 1184: 270-276.
- Bianco F, Ceruti S, Colombo A, Fumagalli M, Ferrari D, Pizzirani C, Matteoli M, Di Virgilio F, Abbracchio MP, Verderio C (2006) A role for P2X7 in microglial proliferation. *J Neurochem* 99: 745-758.
- Bjorklund A, Stenevi U (1981) In vivo evidence for a hippocampal adrenergic neurotrophic factor specially released on septal deafferentation. *Brain Res* 229: 403-428.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385: 729-733.
- Blanquaert F, Barritault D, Caruelle JP (1999) Effects of heparan-like polymers associated with growth factors on osteoblast proliferation and phenotype expression. *J Biomed Mater Res* 44: 63-72.

- Blodgett HC, McCutchen K (1948) Relative strength of place and response learning in the T maze. *J Comp Physiol Psychol* 41: 17-24.
- Blomer U, Kafri T, Randolph-Moore L, Verma IM, Gage FH (1998) Bcl-xL protects adult septal cholinergic neurons from axotomized cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2603-2608.
- Bogousslavsky J, Victor SJ, Salinas EO, Pallay A, Donnan GA, Fieschi C, Kaste M, Orgogozo JM, Chamorro A, Desmet A (2002) Fibrinolytic (alteplase) in acute stroke: results of the European-Australian phase II/III safety and efficacy trial. *Cerebrovasc Dis* 14: 239-251.
- Bonfanti L, Strettoi E, Chierzi S, Cenni MC, Liu XH, Martinou J-C, Maffei L, Rabacchi SA (1996) Protection of retinal ganglion cells from natural and axotomy-induced cell death in neonatal transgenic mice overexpressing bcl-2. *J Neurosci* 16: 4186-4194.
- Boullerne AI, Benjamins JA (2006) Nitric oxide synthase expression and nitric oxide toxicity in oligodendrocytes. *Antioxid Redox Signal* 8: 967-980.
- Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416: 636-640.
- Brashear HR, Zaborszky L, Heimer L (1986) Distribution of GABAergic and cholinergic neurons in the rat diagonal band. *Neuroscience* 17: 439-451.
- Bratt AM, Cassel JC, Neufang B, Greene PL, Jackisch R, Hertting G, Will BE (1995) Behavioural and neurochemical effects of superior cervical ganglionectomy in rats with septo-hippocampal lesions. *Exp Brain Res* 102: 429-444.
- Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM (2000) From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290: 1775-1779.
- Brodal A (1981) *Neurological Anatomy in Relation to Clinical Medicine* (3rd ed) Oxford University Press, Inc., New York 3-45.
- Brodkey JA, Laywell ED, O'Brien TF, Faissner A, Stefansson K, Dorries HU, Schachner M, Steindler DA (1995) Focal brain injury and upregulation of a developmentally regulated extracellular matrix protein. *J Neurosurg* 82: 106-112.
- Bronfman FC (2007) Metalloproteases and gamma-secretase: new membrane partners regulating p75 neurotrophin receptor signaling? *J Neurochem* 103 Suppl 1: 91-100.
- Buchli AD, Schwab ME (2005) Inhibition of Nogo: a key strategy to increase regeneration, plasticity and functional recovery of the lesioned central nervous system. *Ann Med* 37: 556-567.
- Budd SL, Nicholls DG (1996a) A reevaluation of the role of mitochondria in neuronal Ca²⁺ homeostasis. *J Neurochem* 66: 403-411.
- Budd SL, Nicholls DG (1996b) Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 67: 2282-2291.
- Bundy GL, Ayer DE, Banitt LS, Belonga KL, Mizsak SA, Palmer JR, Tustin JM, Chin JE, Hall ED, Linseman KL, . (1995) Synthesis of novel 2,4-diaminopyrrolo-[2,3-d]pyrimidines with antioxidant, neuroprotective, and antiasthma activity. *J Med Chem* 38: 4161-4163.
- Burdick JA, Ward M, Liang E, Young MJ, Langer R (2006) Stimulation of neurite outgrowth by neurotrophins delivered from degradable hydrogels. *Biomaterials* 27: 452-459.
- Butcher RW (1984) Phosphodiesterase after twenty years: an introduction. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 16: 1-12.

- C -

- Cafferty WB, Bradbury EJ, Lidiere M, Jones M, Duffy PJ, Pezet S, McMahon SB (2008) Chondroitinase ABC-mediated plasticity of spinal sensory function. *J Neurosci* 28: 11998-12009.
- Caggiano AO, Zimmer MP, Ganguly A, Blight AR, Gruskin EA (2005) Chondroitinase ABC improves locomotion and bladder function following contusion injury of the rat spinal cord. *J Neurotrauma* 22: 226-239.
- Cai D, Deng K, Mellado W, Lee J, Ratan RR, Filbin MT (2002) Arginase I and polyamines act downstream from cyclic AMP in overcoming inhibition of axonal growth MAG and myelin in vitro. *Neuron* 35: 711-719.
- Cai D, Shen Y, De Bellard M, Tang S, Filbin MT (1999) Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron* 22: 89-101.
- Caplan, Louis R. *Caplan's stroke : a clinical approach*. Stroke a clinical approach. 2000. Boston : Butterworth-Heinemann, c2000.
- Carnes KM, Fuller TA, Price JL (1990) Sources of presumptive glutamatergic/aspartatergic afferents to the magnocellular basal forebrain in the rat. *J Comp Neurol* 302: 824-852.
- Carney JM, Floyd RA (1991) Protection against oxidative damage to CNS by alpha-phenyl-tert-butyl nitrene (PBN) and other spin-trapping agents: a novel series of nonlipid free radical scavengers. *J Mol Neurosci* 3: 47-57.
- Caroni P (1997) Intrinsic neuronal determinants that promote axonal sprouting and elongation. *Bioessays* 19: 767-775.
- Caroni P, Schwab ME (1988a) Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1: 85-96.
- Caroni P, Schwab ME (1988b) Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol* 106: 1281-1288.
- Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause KH (2005) Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 48: 16-42.
- Casanova C, Merabet L, Minville K, Desautels, A (1999) Un nouveau rôle pour le thalamus. *Med. Sci.*, 15 :1302-1304.
- Cash D, Beech JS, Rayne RC, Bath PM, Meldrum BS, Williams SC (2001) Neuroprotective effect of aminoguanidine on transient focal ischaemia in the rat brain. *Brain Res* 905: 91-103.
- Cassel JC, Ballough GP, Kelche C, Hofferer E, Cassel S, Will B (1993) Injections of fluid or septal cell suspension grafts into the dentate gyrus of rats induce granule cell degeneration. *Neurosci Lett* 150: 89-94.
- Cassel JC, Duconseille E, Jeltsch H, Will B (1997) The fimbria-fornix/cingular bundle pathways: a review of neurochemical and behavioural approaches using lesions and transplantation techniques. *Prog Neurobiol* 51: 663-716.
- Cassel JC, Kelche C, Hornsperger JM, Jackisch R, Hertting G, Will BE (1990) Graft-induced learning impairment despite graft-enhanced cholinergic functions in the hippocampus of rats with septohippocampal lesions. *Brain Res* 534: 295-298.
- Cassel JC, Neufang B, Kelche C, Aiple F, Will BE, Hertting G, Jackisch R (1992) Effects of septal and/or raphe cell suspension grafts on hippocampal choline acetyltransferase activity, high affinity synaptosomal uptake of choline and serotonin, and behavior in rats with extensive septohippocampal lesions. *Brain Res* 585: 243-254.

- Cenni MC, Bonfanti L, Martinou JC, Ratto GM, Strettoi E, Maffei L (1996) Long-term survival of retinal ganglion cells following optic nerve section in adult bcl-2 transgenic mice. *Eur J Neurosci* 8: 1735-1745.
- Cernak I, Stoica B, Byrnes KR, Di Giovanni S, Faden AI (2005) Role of the cell cycle in the pathobiology of central nervous system trauma. *Cell Cycle* 4: 1286-1293.
- Chaisuksunt V, Campbell G, Zhang Y, Schachner M, Lieberman AR, Anderson PN (2000a) The cell recognition molecule CHL1 is strongly upregulated by injured and regenerating thalamic neurons. *J Comp Neurol* 425: 382-392.
- Chaisuksunt V, Zhang Y, Anderson PN, Campbell G, Vaudano E, Schachner M, Lieberman AR (2000b) Axonal regeneration from CNS neurons in the cerebellum and brainstem of adult rats: correlation with the patterns of expression and distribution of messenger RNAs for L1, CHL1, c-jun and growth-associated protein-43. *Neuroscience* 100: 87-108.
- Chalmers S, Nicholls DG (2003) The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *J Biol Chem* 278: 19062-19070.
- Chan CC, Wong AK, Liu J, Steeves JD, Tetzlaff W (2007) ROCK inhibition with Y27632 activates astrocytes and increases their expression of neurite growth-inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans. *Glia* 55: 369-384.
- Chatzipanteli K, Garcia R, Marcillo AE, Loor KE, Kraydieh S, Dietrich WD (2002) Temporal and segmental distribution of constitutive and inducible nitric oxide synthases after traumatic spinal cord injury: effect of aminoguanidine treatment. *J Neurotrauma* 19: 639-651.
- Chau CH, Shum DK, Li H, Pei J, Lui YY, Wirthlin L, Chan YS, Xu XM (2004) Chondroitinase ABC enhances axonal regrowth through Schwann cell-seeded guidance channels after spinal cord injury. *FASEB J* 18: 194-196.
- Chebbi CK, Kichenin K, Amar N, Nourry H, Warnet JM, Barritault D, Baudouin C (2008) [Pilot study of a new matrix therapy agent (RGTA OTR4120) in treatment-resistant corneal ulcers and corneal dystrophy]. *J Fr Ophtalmol* 31: 465-471.
- Chen A, Xu XM, Kleitman N, Bunge MB (1996) Methylprednisolone administration improves axonal regeneration into Schwann cell grafts in transected adult rat thoracic spinal cord. *Exp Neurol* 138: 261-276.
- Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403: 434-439.
- Chen Y, Chan PH, Swanson RA (2001) Astrocytes overexpressing Cu,Zn superoxide dismutase have increased resistance to oxidative injury. *Glia* 33: 343-347.
- Cheng A, Wang S, Yang D, Xiao R, Mattson MP (2003a) Calmodulin mediates brain-derived neurotrophic factor cell survival signaling upstream of Akt kinase in embryonic neocortical neurons. *J Biol Chem* 278: 7591-7599.
- Cheng B, Mattson MP (1994) NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insults. *Brain Res* 640: 56-67.
- Cheng YH, Wang WD, Sun LS, Cheng ZJ, Xu JP (2003b) [Effects of nitric oxide synthase inhibitor on dentate gyrus neurogenesis after diffuse brain injury in adult rats]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 23: 1074-1077.
- Chiang CS, Stalder A, Samimi A, Campbell IL (1994) Reactive gliosis as a consequence of interleukin-6 expression in the brain: studies in transgenic mice. *Dev Neurosci* 16: 212-221.
- Chong MS, Woolf CJ, Turmaine M, Emson PC, Anderson PN (1996) Intrinsic versus extrinsic factors in determining the regeneration of the central processes of rat dorsal root ganglion neurons: the influence of a peripheral nerve graft. *J Comp Neurol* 370: 97-104.

- Chu PJ, Saito H, Abe K (1994) Polyamines promote neurite elongation of cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Res* 19: 155-160.
- Chu PJ, Saito H, Abe K (1995) Polyamines promote regeneration of injured axons of cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res* 673: 233-241.
- Citron BA, Arnold PM, Haynes NG, Ameenuddin S, Farooque M, Santacruz K, Festoff BW (2008) Neuroprotective effects of caspase-3 inhibition on functional recovery and tissue sparing after acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 33: 2269-2277.
- Clemens JA, Saunders RD, Ho PP, Phebus LA, Panetta JA (1993) The antioxidant LY231617 reduces global ischemic neuronal injury in rats. *Stroke* 24: 716-722.
- Cockroft KM, Meistrell M, III, Zimmerman GA, Risucci D, Bloom O, Cerami A, Tracey KJ (1996) Cerebroprotective effects of aminoguanidine in a rodent model of stroke. *Stroke* 27: 1393-1398.
- Cohen S (1998) *A Guide to the Polyamine by*, Oxford University Press.
- Colak A, Karaoglan A, Barut S, Kokturk S, Akyildiz AI, Tasyurekli M (2005) Neuroprotection and functional recovery after application of the caspase-9 inhibitor z-LEHD-fmk in a rat model of traumatic spinal cord injury. *J Neurosurg Spine* 2: 327-334.
- Costa E, Panula P, Thompson HK, Cheney DL (1983) The transsynaptic regulation of the septal-hippocampal cholinergic neurons. *Life Sci* 32: 165-179.
- Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689-695.
- Crack PJ, Taylor JM (2005) Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radic Biol Med* 38: 1433-1444.
- Cragolini AB, Huang Y, Gokina P, Friedman WJ (2009) Nerve growth factor attenuates proliferation of astrocytes via the p75 neurotrophin receptor. *Glia*.
- Craveiro LM, Hakkoum D, Weinmann O, Montani L, Stoppini L, Schwab ME (2008) Neutralization of the membrane protein Nogo-A enhances growth and reactive sprouting in established organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci* 28: 1808-1824.
- Crutcher KA (1987) Sympathetic sprouting in the central nervous system: a model for studies of axonal growth in the mature mammalian brain. *Brain Res* 434: 203-233.
- Crutcher KA, Davis JN (1981) Sympathohippocampal sprouting is directed by a target tropic factor. *Brain Res* 204: 410-414.
- Cuevas P, Carceller F, Munoz-Willery I, Gimenez-Gallego G (1998) Intravenous fibroblast growth factor penetrates the blood-brain barrier and protects hippocampal neurons against ischemia-reperfusion injury. *Surg Neurol* 49: 77-83.
- Cui Q, Cho KS, So KF, Yip HK (2004) Synergistic effect of Nogo-neutralizing antibody IN-1 and ciliary neurotrophic factor on axonal regeneration in adult rodent visual systems. *J Neurotrauma* 21: 617-625.
- Cummings BJ, Yee GJ, Cotman CW (1992) bFGF promotes the survival of entorhinal layer II neurons after perforant path axotomy. *Brain Res* 591: 271-276.
- Curatolo L, Valsasina B, Caccia C, Raimondi GL, Orsini G, Bianchetti A (1997) Recombinant human IL-2 is cytotoxic to oligodendrocytes after in vitro self aggregation. *Cytokine* 9: 734-739.
- Cuzner ML, Gveric D, Strand C, Loughlin AJ, Paemen L, Opdenakker G, Newcombe J (1996) The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 1194-1204.

- D -

Dahlstrom A, Fuxe K (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20: 398-399.

Daitz HM, Powell TP (1954) Studies of the connexions of the fornix system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 17: 75-82.

Dare E, Schulte G, Karovic O, Hammarberg C, Fredholm BB (2007) Modulation of glial cell functions by adenosine receptors. *Physiol Behav* 92: 15-20.

Dausse Y, Grossin L, Miralles G, Pelletier S, Mainard D, Hubert P, Baptiste D, Gillet P, Dellacherie E, Netter P, Payan E (2003) Cartilage repair using new polysaccharidic biomaterials: macroscopic, histological and biochemical approaches in a rat model of cartilage defect. *Osteoarthritis Cartilage* 11: 16-28.

David S, Aguayo AJ (1981) Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214: 931-933.

David S, Aguayo AJ (1985) Axonal regeneration after crush injury of rat central nervous system fibres innervating peripheral nerve grafts. *J Neurocytol* 14: 1-12.

Davis WK, Boyko OB, Hoffman JM, Hanson MW, Schold SC, Jr., Burger PC, Friedman AH, Coleman RE (1993) [¹⁸F]2-fluoro-2-deoxyglucose-positron emission tomography correlation of gadolinium-enhanced MR imaging of central nervous system neoplasia. *AJNR Am J Neuroradiol* 14: 515-523.

De Nicola AF, Ferrini M, Gonzalez SL, Gonzalez Deniselle MC, Grillo CA, Piroli G, Saravia F, de Kloet ER (1998) Regulation of gene expression by corticoid hormones in the brain and spinal cord. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65: 253-272.

De Winter F, Holtmaat AJ, Verhaagen J (2002) Neuropilin and class 3 semaphorins in nervous system regeneration. *Adv Exp Med Biol* 515: 115-139.

Degroot A, Treit D (2004) Anxiety is functionally segregated within the septo-hippocampal system. *Brain Res* 1001: 60-71.

Dergham P, Ellezam B, Essagian C, Avedissian H, Lubell WD, McKerracher L (2002) Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci* 22: 6570-6577.

Desgranges P, Barbaud C, Caruelle JP, Barritault D, Gautron J (1999) A substituted dextran enhances muscle fiber survival and regeneration in ischemic and denervated rat EDL muscle. *FASEB J* 13: 761-766.

Desgranges P, Barritault D, Caruelle JP, Tardieu M (1997) Transmural endothelialization of vascular prostheses is regulated in vitro by Fibroblast Growth Factor 2 and heparan-like molecule. *Int J Artif Organs* 20: 589-598.

Dietrich WD, Halley M, Valdes I, Busto R (1991) Interrelationships between increased vascular permeability and acute neuronal damage following temperature-controlled brain ischemia in rats. *Acta Neuropathol (Berl)* 81: 615-625.

Dillon GP, Yu X, Sridharan A, Ranieri JP, Bellamkonda RV (1998) The influence of physical structure and charge on neurite extension in a 3D hydrogel scaffold. *J Biomater Sci Polym Ed* 9: 1049-1069.

Djebaili M, Hoffman SW, Stein DG (2004) Allopregnanolone and progesterone decrease cell death and cognitive deficits after a contusion of the rat pre-frontal cortex. *Neuroscience* 123: 349-359.

Dogan A, Rao AM, Baskaya MK, Hatcher J, Temiz C, Rao VL, Dempsey RJ (1999a) Contribution of polyamine oxidase to brain injury after trauma. *J Neurosurg* 90: 1078-1082.

Dogan A, Rao AM, Hatcher J, Rao VL, Baskaya MK, Dempsey RJ (1999b) Effects of MDL 72527, a specific inhibitor of polyamine oxidase, on brain edema, ischemic injury volume, and tissue polyamine levels in rats after temporary middle cerebral artery occlusion. *J Neurochem* 72: 765-770.

Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, Sivasankaran R, Wang K, Nikulina E, Kimura N, Cai H, Deng K, Gao Y, He Z, Filbin M (2002) Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* 35: 283-290.

Dore S (2005) Unique properties of polyphenol stilbenes in the brain: more than direct antioxidant actions; gene/protein regulatory activity. *Neurosignals* 14: 61-70.

Dornay M, Gilad VH, Shiler I, Gilad GM (1986) Early polyamine treatment accelerates regeneration of rat sympathetic neurons. *Exp Neurol* 92: 665-674.

Dou CL, Levine JM (1994) Inhibition of neurite growth by the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci* 14: 7616-7628.

Dou CL, Levine JM (1995) Differential effects of glycosaminoglycans on neurite growth on laminin and L1 substrates. *J Neurosci* 15: 8053-8066.

Dravid AR, Van Deusen EB (1984) Recovery of enzyme markers for cholinergic terminals in septo-temporal regions of the hippocampus following selective fimbrial lesions in adult rats. *Brain Res* 324: 119-128.

Duconseille E, Carrot SN, Woerly S, Kelche C, Will B, Cassel JC (2001) Homotopic grafts of septal neurons combined to polymeric hydrogels placed into a fimbria-fornix lesion cavity attenuate locomotor hyperactivity but not mnemonic dysfunctions in rats. *Restor Neurol Neurosci* 18: 39-51.

Duconseille E, Cressant A, Kelche C, Woerly S, Will B, Poucet B, Cassel JC (1999) Homotopic septal grafts combined with a hydrogel bridge promote functional recovery in rats with fimbria-fornix lesions: A unit recording study. *Restor Neurol Neurosci* 15: 305-317.

Dutar P, Bassant MH, Senut MC, Lamour Y (1995) The septohippocampal pathway: structure and function of a central cholinergic system. *Physiol Rev* 75: 393-427.

Dvir-Ginzberg M, Gamieli-Bonshtein I, Agbaria R, Cohen S (2003) Liver tissue engineering within alginate scaffolds: effects of cell-seeding density on hepatocyte viability, morphology, and function. *Tissue Eng* 9: 757-766.

- E -

Edgar D, Timpl R, Thoenen H (1984) The heparin-binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival. *EMBO J* 3: 1463-1468.

Edvinsson, Lars et Krause, Diana N. Cerebral blood flow and metabolism. 2002. Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

Edwards P, Arango M, Balica L, Cottingham R, El Sayed H, Farrell B, Fernandes J, Gogichaisvili T, Golden N, Hartzenberg B, Husain M, Ulloa MI, Jerbi Z, Khamis H, Komolafe E, Laloe V, Lomas G, Ludwig S, Mazairac G, Munoz Sanchez ML, Nasi L, Ollidashi F, Plunkett P, Roberts I, Sandercock P, Shakur H, Soler C, Stocker R, Svoboda P, Trenkler S, Venkataramana NK, Wasserberg J, Yates D, Yutthakasemsunt S (2005) Final results of MRC CRASH, a randomised placebo-controlled trial of intravenous corticosteroid in adults with head injury-outcomes at 6 months. *Lancet* 365: 1957-1959.

Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB (1996) Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci* 16: 2508-2521.

- Ellezam B, Dubreuil C, Winton M, Loy L, Dergham P, Selles-Navarro I, McKerracher L (2002) Inactivation of intracellular Rho to stimulate axon growth and regeneration. *Prog Brain Res* 137: 371-380.
- Emerick AJ, Kartje GL (2004) Behavioral recovery and anatomical plasticity in adult rats after cortical lesion and treatment with monoclonal antibody IN-1. *Behav Brain Res* 152: 315-325.
- Emerick AJ, Neafsey EJ, Schwab ME, Kartje GL (2003) Functional reorganization of the motor cortex in adult rats after cortical lesion and treatment with monoclonal antibody IN-1. *J Neurosci* 23: 4826-4830.
- English WR, Puente XS, Freije JM, Knauper V, Amour A, Merryweather A, Lopez-Otin C, Murphy G (2000) Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2. *J Biol Chem* 275: 14046-14055.
- Eriksdotter JM, Nordberg A, Amberla K, Backman L, Ebendal T, Meyerson B, Olson L, Seiger, Shigeta M, Theodorsson E, Viitanen M, Winblad B, Wahlund LO (1998) Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor in three patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 9: 246-257.
- Escartin Q, Lallam-Laroye C, Baroukh B, Morvan FO, Caruelle JP, Godeau G, Barritault D, Saffar JL (2003) A new approach to treat tissue destruction in periodontitis with chemically modified dextran polymers. *FASEB J* 17: 644-651.
- Esch F, Lin KI, Hills A, Zaman K, Baraban JM, Chatterjee S, Rubin L, Ash DE, Ratan RR (1998) Purification of a multipotent antideath activity from bovine liver and its identification as arginase: nitric oxide-independent inhibition of neuronal apoptosis. *J Neurosci* 18: 4083-4095.
- Etus V, Altug T, Belce A, Ceylan S (2003) Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate prevents oxidative damage on periventricular white matter of infantile rats with hydrocephalus. *Tohoku J Exp Med* 200: 203-209.
- F -
- Faissner A, Steindler D (1995) Boundaries and inhibitory molecules in developing neural tissues. *Glia* 13: 233-254.
- Faulstich RLM, Mehler WR (1985) Thalamus. In Paxinos, G. (ed.), *The Rat Nervous System*, Vol. 1. Academic Press, Inc, Sydney, 129-168.
- Fears CY, Woods A (2006) The role of syndecans in disease and wound healing. *Matrix Biol* 25: 443-456.
- Fields RD (2008) White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends Neurosci* 31: 361-370.
- Figueiredo BC, Pluss K, Skup M, Otten U, Cuello AC (1995) Acidic FGF induces NGF and its mRNA in the injured neocortex of adult animals. *Brain Res Mol Brain Res* 33: 1-6.
- Filbin MT (2003) Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci* 4: 703-713.
- Finsen BR, Jorgensen MB, Diemer NH, Zimmer J (1993) Microglial MHC antigen expression after ischemic and kainic acid lesions of the adult rat hippocampus. *Glia* 7: 41-49.
- Fischer FR, Peduzzi JD (2007) Functional recovery in rats with chronic spinal cord injuries after exposure to an enriched environment. *J Spinal Cord Med* 30: 147-155.
- Fitch MT, Silver J (2008) CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol* 209: 294-301.

- Flanagan LA, Ju YE, Marg B, Osterfield M, Janmey PA (2002) Neurite branching on deformable substrates. *Neuroreport* 13: 2411-2415.
- Flynn L, Dalton PD, Shoichet MS (2003) Fiber templating of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) for neural tissue engineering. *Biomaterials* 24: 4265-4272.
- Fonnum F (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 42: 1-11.
- Forloni G, Grzanna R, Blakely RD, Coyle JT (1987) Co-localization of N-acetyl-aspartyl-glutamate in central cholinergic, noradrenergic, and serotonergic neurons. *Synapse* 1: 455-460.
- Forstreuter F, Lucius R, Mentlein R (2002) Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells. *J Neuroimmunol* 132: 93-98.
- Fouad K, Klusman I, Schwab ME (2004) Regenerating corticospinal fibers in the Marmoset (*Callitrix jacchus*) after spinal cord lesion and treatment with the anti-Nogo-A antibody IN-1. *Eur J Neurosci* 20: 2479-2482.
- Fouad K, Schnell L, Bunge MB, Schwab ME, Liebscher T, Pearse DD (2005) Combining Schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord. *J Neurosci* 25: 1169-1178.
- Fournier AE, GrandPre T, Gould G, Wang X, Strittmatter SM (2002) Nogo and the Nogo-66 receptor. *Prog Brain Res* 137: 361-369.
- Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM (2001) Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409: 341-346.
- Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM (2003) Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J Neurosci* 23: 1416-1423.
- Francis-Turner L, Valouskova V (1996) Nerve growth factor and nootropic drug Cerebrolysin but not fibroblast growth factor can reduce spatial memory impairment elicited by fimbria-fornix transection: short-term study. *Neurosci Lett* 202: 193-196.
- Fredj-Reygrobellet D, Hristova DL, Ettaiche M, Meddahi A, Jozefonwicz J, Barritault D (1994) CMDBS, functional analogue of heparin sulfate as a new class of corneal ulcer healing agents. *Ophthalmic Res* 26: 325-331.
- Freese A, Finklestein SP, DiFiglia M (1992) Basic fibroblast growth factor protects striatal neurons in vitro from NMDA-receptor mediated excitotoxicity. *Brain Res* 575: 351-355.
- Freund P, Schmidlin E, Wannier T, Bloch J, Mir A, Schwab ME, Rouiller EM (2006) Nogo-A-specific antibody treatment enhances sprouting and functional recovery after cervical lesion in adult primates. *Nat Med* 12: 790-792.
- Freund P, Schmidlin E, Wannier T, Bloch J, Mir A, Schwab ME, Rouiller EM (2009) Anti-Nogo-A antibody treatment promotes recovery of manual dexterity after unilateral cervical lesion in adult primates--re-examination and extension of behavioral data. *Eur J Neurosci* 29: 983-996.
- Freund P, Wannier T, Schmidlin E, Bloch J, Mir A, Schwab ME, Rouiller EM (2007) Anti-Nogo-A antibody treatment enhances sprouting of corticospinal axons rostral to a unilateral cervical spinal cord lesion in adult macaque monkey. *J Comp Neurol* 502: 644-659.
- Freund TF (1989) GABAergic septohippocampal neurons contain parvalbumin. *Brain Res* 478: 375-381.
- Freund TF, Antal M (1988) GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* 336: 170-173.

Friden PM, Walus LR, Watson P, Doctrow SR, Kozarich JW, Backman C, Bergman H, Hoffer B, Bloom F, Granholm AC (1993) Blood-brain barrier penetration and in vivo activity of an NGF conjugate. *Science* 259: 373-377.

Friedman JA, Windebank AJ, Moore MJ, Spinner RJ, Currier BL, Yaszemski MJ (2002) Biodegradable polymer grafts for surgical repair of the injured spinal cord. *Neurosurgery* 51: 742-751.

Friel DD, Tsien RW (1994) An FCCP-sensitive Ca²⁺ store in bullfrog sympathetic neurons and its participation in stimulus-evoked changes in [Ca²⁺]_i. *J Neurosci* 14: 4007-4024.

Friese MA, Craner MJ, Etzensperger R, Vergo S, Wemmie JA, Welsh MJ, Vincent A, Fugger L (2007) Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Nat Med* 13: 1483-1489.

Frotscher M (1988) Cholinergic neurons in the rat hippocampus do not compensate for the loss of septohippocampal cholinergic fibers. *Neurosci Lett* 87: 18-22.

Frotscher M (1991) Target cell specificity of synaptic connections in the hippocampus. *Hippocampus* 1: 123-130.

Fu Q, Hue J, Li S (2007) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs promote axon regeneration via RhoA inhibition. *J Neurosci* 27: 4154-4164.

Fujii T, Nakao F, Shibata Y, Shioi G, Kodama E, Fujisawa H, Takagi S (2002) *Caenorhabditis elegans* PlexinA, PLX-1, interacts with transmembrane semaphorins and regulates epidermal morphogenesis. *Development* 129: 2053-2063.

Fujita H, Zhang B, Sato K, Tanaka J, Sakanaka M (2001) Expressions of neuropilin-1, neuropilin-2 and semaphorin 3A mRNA in the rat brain after middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 914: 1-14.

- G -

Gage FH, Bjorklund A (1986) Compensatory collateral sprouting of aminergic systems in the hippocampal formation following partial deafferentation. Plenum Press New York - Isaacson R L *The Hippocampus* 1986 33-63.

Gage FH, Bjorklund A, Stenevi U (1983a) Local regulation of compensatory noradrenergic hyperactivity in the partially denervated hippocampus. *Nature* 303: 819-821.

Gage FH, Bjorklund A, Stenevi U (1984) Cells of origin of the ventral cholinergic septohippocampal pathway undergoing compensatory collateral sprouting following fimbria-fornix transection. *Neurosci Lett* 44: 211-216.

Gage FH, Bjorklund A, Stenevi U, Dunnett SB (1983b) Functional correlates of compensatory collateral sprouting by aminergic and cholinergic afferents in the hippocampal formation. *Brain Res* 268: 39-47.

Galois L, Freyria AM, Grossin L, Hubert P, Mainard D, Herbage D, Stoltz JF, Netter P, Dellacherie E, Payan E (2004) Cartilage repair: surgical techniques and tissue engineering using polysaccharide- and collagen-based biomaterials. *Biorheology* 41: 433-443.

Gao Y, Nikulina E, Mellado W, Filbin MT (2003) Neurotrophins elevate cAMP to reach a threshold required to overcome inhibition by MAG through extracellular signal-regulated kinase-dependent inhibition of phosphodiesterase. *J Neurosci* 23: 11770-11777.

Gaulke LJ, Horner PJ, Fink AJ, McNamara CL, Hicks RR (2005) Environmental enrichment increases progenitor cell survival in the dentate gyrus following lateral fluid percussion injury. *Brain Res Mol Brain Res* 141: 138-150.

- Gerard C, Catuogno C, Amargier-Huin C, Grossin L, Hubert P, Gillet P, Netter P, Dellacherie E, Payan E (2005) The effect of alginate, hyaluronate and hyaluronate derivatives biomaterials on synthesis of non-articular chondrocyte extracellular matrix. *J Mater Sci Mater Med* 16: 541-551.
- Gharabaghi A, Tatagiba M (2005) Functional regeneration of the axotomized auditory nerve with combined neurotrophic and anti-inhibitory strategies. *Acta Neurochir Suppl* 93: 89-91.
- Giannetti S, Lauretti L, Fernandez E, Salvinelli F, Tamburrini G, Pallini R (2001) Acrylic hydrogel implants after spinal cord lesion in the adult rat. *Neurol Res* 23: 405-409.
- Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, Brownlee M (1998) Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes* 47: 1114-1120.
- Gibson CL, Gray LJ, Bath PM, Murphy SP (2008) Progesterone for the treatment of experimental brain injury; a systematic review. *Brain* 131: 318-328.
- Gilad GM, Balakrishnan K, Gilad VH (1999) The course of putrescine immunocytochemical appearance in neurons, astroglia and microglia in rat brain cultures. *Neurosci Lett* 268: 33-36.
- Gilad GM, Gilad VH (1983) Polyamine biosynthesis is required for survival of sympathetic neurons after axonal injury. *Brain Res* 273: 191-194.
- Gilad GM, Gilad VH (1988) Early polyamine treatment enhances survival of sympathetic neurons after postnatal axonal injury or immunosympathectomy. *Brain Res* 466: 175-181.
- Gilad GM, Gilad VH (1989) Treatment with polyamines can prevent monosodium glutamate neurotoxicity in the rat retina. *Life Sci* 44: 1963-1969.
- Gilad GM, Gilad VH (1991a) Polyamine uptake, binding and release in rat brain. *Eur J Pharmacol* 193: 41-46.
- Gilad GM, Gilad VH (1991b) Polyamines can protect against ischemia-induced nerve cell death in gerbil forebrain. *Exp Neurol* 111: 349-355.
- Gilad GM, Gilad VH (1992) Polyamines in neurotrauma. Ubiquitous molecules in search of a function. *Biochem Pharmacol* 44: 401-407.
- Gilad GM, Gilad VH (1999) Novel polyamine derivatives as neuroprotective agents. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 39-43.
- Gilad VH, Tetzlaff WG, Rabey JM, Gilad GM (1996) Accelerated recovery following polyamines and aminoguanidine treatment after facial nerve injury in rats. *Brain Res* 724: 141-144.
- Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D (2002) Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev* 54: 271-284.
- Giuffre L, Cordey AS, Monai N, Tardy Y, Schapira M, Spertini O (1997) Monocyte adhesion to activated aortic endothelium: role of L-selectin and heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol* 136: 945-956.
- Giulian D, Lachman LB (1985) Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science* 228: 497-499.
- Glick SD, Nakamura RK, Jarvik ME (1971) Recovery of function following frontal brain damage in mice: changes in sensitivity to amphetamine. *J Comp Physiol Psychol* 76: 454-459.
- Gonzalez, R G. Acute ischemic stroke : imaging and intervention. 2006. Springer.

- Gonzalez SL, Labombarda F, Gonzalez Deniselle MC, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF (2004) Progesterone up-regulates neuronal brain-derived neurotrophic factor expression in the injured spinal cord. *Neuroscience* 125: 605-614.
- Goodman JC, Valadka AB, Gopinath SP, Uzura M, Robertson CS (1999) Extracellular lactate and glucose alterations in the brain after head injury measured by microdialysis. *Crit Care Med* 27: 1965-1973.
- Gopalakrishnan SM, Teusch N, Imhof C, Bakker MH, Schurdak M, Burns DJ, Warrior U (2008) Role of Rho kinase pathway in chondroitin sulfate proteoglycan-mediated inhibition of neurite outgrowth in PC12 cells. *J Neurosci Res* 86: 2214-2226.
- Gorny JH, Gorny B, Wallace DG, Whishaw IQ (2002) Fimbria-fornix lesions disrupt the dead reckoning (homing) component of exploratory behavior in mice. *Learn Mem* 9: 387-394.
- GrandPre T, Li S, Strittmatter SM (2002) Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature* 417: 547-551.
- GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM (2000) Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 403: 439-444.
- Gray JA (1982) *Precis of the neuropsychology of anxiety : an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system.* *The Behavioral and Brain Sciences* 5: 469-534.
- Gray JA, McNaughton N (1983) Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 7: 119-188.
- Green SP, Cairns B, Rae J, Errett-Baroncini C, Hongo JA, Erickson RW, Curnutte JT (2001) Induction of gp91-phox, a component of the phagocyte NADPH oxidase, in microglial cells during central nervous system inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 374-384.
- Griffiths MJ, Messent M, Curzen NP, Evans TW (1995) Aminoguanidine selectively decreases cyclic GMP levels produced by inducible nitric oxide synthase. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 1599-1604.
- Griffiths MJ, Messent M, MacAllister RJ, Evans TW (1993) Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 110: 963-968.
- Grothe C, Otto D, Unsicker K (1989) Basic fibroblast growth factor promotes in vitro survival and cholinergic development of rat septal neurons: comparison with the effects of nerve growth factor. *Neuroscience* 31: 649-661.
- Guest JD, Hesse D, Schnell L, Schwab ME, Bunge MB, Bunge RP (1997) Influence of IN-1 antibody and acidic FGF-fibrin glue on the response of injured corticospinal tract axons to human Schwann cell grafts. *J Neurosci Res* 50: 888-905.
- Gungabissoon RA, Bamberg JR (2003) Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/cofilin. *J Histochem Cytochem* 51: 411-420.
- Gunter TE (1994) Cation transport by mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 26: 465-469.
- Gupta D, Tator CH, Shoichet MS (2006) Fast-gelling injectable blend of hyaluronan and methylcellulose for intrathecal, localized delivery to the injured spinal cord. *Biomaterials* 27: 2370-2379.
- Gutowska A, Jeong B, Jasionowski M (2001) Injectable gels for tissue engineering. *Anat Rec* 263: 342-349.

- H -

- Haas CA, Bach A, Heimrich B, Linke R, Otten U, Frotscher M (1998) Axotomy-induced c-JUN expression in young medial septal neurons is regulated by nerve growth factor. *Neuroscience* 87: 831-844.
- Hadland KA, Rushworth MF, Gaffan D, Passingham RE (2003) The effect of cingulate lesions on social behaviour and emotion. *Neuropsychologia* 41: 919-931.
- Hagg T, Varon S (1993) Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of adult rat substantia nigra dopaminergic neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6315-6319.
- Hahn MS, Teply BA, Stevens MM, Zeitels SM, Langer R (2006) Collagen composite hydrogels for vocal fold lamina propria restoration. *Biomaterials* 27: 1104-1109.
- Hall ED (1995) Inhibition of lipid peroxidation in central nervous system trauma and ischemia. *J Neurol Sci* 134 Suppl: 79-83.
- Hall ED (2003) Drug development in spinal cord injury: what is the FDA looking for? *J Rehabil Res Dev* 40: 81-91.
- Hall ED, Andrus PK, Smith SL, Fleck TJ, Scherch HM, Lutzke BS, Sawada GA, Althaus JS, Vonvoigtlander PF, Padbury GE, Larson PG, Palmer JR, Bundy GL (1997) Pyrrolopyrimidines: novel brain-penetrating antioxidants with neuroprotective activity in brain injury and ischemia models. *J Pharmacol Exp Ther* 281: 895-904.
- Hall ED, McCall JM, Means ED (1994) Therapeutic potential of the lazaroids (21-aminosteroids) in acute central nervous system trauma, ischemia and subarachnoid hemorrhage. *Adv Pharmacol* 28: 221-268.
- Hall ED, Travis MA (1988) Attenuation of progressive brain hypoperfusion following experimental subarachnoid hemorrhage by large intravenous doses of methylprednisolone. *Exp Neurol* 99: 594-606.
- Halliwell B (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344: 721-724.
- Hannila SS, Filbin MT (2008) The role of cyclic AMP signaling in promoting axonal regeneration after spinal cord injury. *Exp Neurol* 209: 321-332.
- Hara K, Uchida K, Fukunaga A, Kuroshima Y, Yamada M, Kawase T (2000) Neurite growth capability of rat fetal neuronal cells against matured CNS myelin in vitro. *Cell Transplant* 9: 717-724.
- Hasegawa Y, Fujitani M, Hata K, Tohyama M, Yamagishi S, Yamashita T (2004) Promotion of axon regeneration by myelin-associated glycoprotein and Nogo through divergent signals downstream of Gi/G. *J Neurosci* 24: 6826-6832.
- He Z, Tessier-Lavigne M (1997) Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90: 739-751.
- Heckers S, Ohtake T, Wiley RG, Lappi DA, Geula C, Mesulam MM (1994) Complete and selective cholinergic denervation of rat neocortex and hippocampus but not amygdala by an immunotoxin against the p75 NGF receptor. *J Neurosci* 14: 1271-1289.
- Hefti F, Mash DC (1989) Localization of nerve growth factor receptors in the normal human brain and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 10: 75-87.
- Hejcl A, Lesny P, Pradny M, Michalek J, Jendelova P, Stulik J, Sykova E (2008) Biocompatible hydrogels in spinal cord injury repair. *Physiol Res* 57 Suppl 3: S121-S132.
- Hensley K, Carney JM, Stewart CA, Tabatabaie T, Pye Q, Floyd RA (1997) Nitron-based free radical traps as neuroprotective agents in cerebral ischaemia and other pathologies. *Int Rev Neurobiol* 40: 299-317.

Higuchi Y, Hattori H, Kume T, Tsuji M, Akaike A, Furusho K (1998) Increase in nitric oxide in the hypoxic-ischemic neonatal rat brain and suppression by 7-nitroindazole and aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 342: 47-49.

Hisahara S, Shoji S, Okano H, Miura M (1997) ICE/CED-3 family executes oligodendrocyte apoptosis by tumor necrosis factor. *J Neurochem* 69: 10-20.

Hofferer E, Cassel JC (1996) A comparison of the effects of two fimbria-fornix lesion techniques on beam-walking performance in the rat: aspiration versus electrolysis. *Behav Brain Res* 74: 175-180.

Hofferer-Duconseille E (1997) Restauration fonctionnelle après lésion massive des voies septo-hippocampiques chez le Rat : implantation conjointe de biomatériaux et de greffes homotypiques de neurones de projection. Thèse de Doctorat d'Université en Neurosciences, Soutenue le 9 décembre 1997, Université Louis Pasteur, Strasbourg.

Holtzman D, Togliatti A, Khait I, Jensen F (1998) Creatine increases survival and suppresses seizures in the hypoxic immature rat. *Pediatr Res* 44: 410-414.

Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S (2001) Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci* 21: 1975-1982.

Hou ST, Jiang SX, Smith RA (2008) Permissive and repulsive cues and signalling pathways of axonal outgrowth and regeneration. *Int Rev Cell Mol Biol* 267: 125-181.

Houle JD, Tom VJ, Mayes D, Wagoner G, Phillips N, Silver J (2006) Combining an autologous peripheral nervous system "bridge" and matrix modification by chondroitinase allows robust, functional regeneration beyond a hemisection lesion of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 26: 7405-7415.

Hsieh SH, Ferraro GB, Fournier AE (2006) Myelin-associated inhibitors regulate cofilin phosphorylation and neuronal inhibition through LIM kinase and Slingshot phosphatase. *J Neurosci* 26: 1006-1015.

Huang JK, Phillips GR, Roth AD, Pedraza L, Shan W, Belkaid W, Mi S, Fex-Svenningsen A, Florens L, Yates JR, III, Colman DR (2005) Glial membranes at the node of Ranvier prevent neurite outgrowth. *Science* 310: 1813-1817.

Huber AB, Weinmann O, Brosamle C, Oertle T, Schwab ME (2002) Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J Neurosci* 22: 3553-3567.

Huin-Amargier C, Marchal P, Payan E, Netter P, Dellacherie E (2006) New physically and chemically crosslinked hyaluronate (HA)-based hydrogels for cartilage repair. *J Biomed Mater Res A* 76: 416-424.

Hunt SP, Mantyh PW (2001) The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci* 2: 83-91.

Hurn PD, Koehler RC, Blizzard KK, Traystman RJ (1995) Deferoxamine reduces early metabolic failure associated with severe cerebral ischemic acidosis in dogs. *Stroke* 26: 688-694.

- I -

Iadecola C, Xu X, Zhang F, el Fakahany EE, Ross ME (1995a) Marked induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 15: 52-59.

Iadecola C, Zhang F, Xu X (1995b) Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol* 268: R286-R292.

Ichikawa T, Hirata Y (1986) Organization of choline acetyltransferase-containing structures in the forebrain of the rat. *J Neurosci* 6: 281-292.

Iizuka H, Sakatani K, Young W (1990) Neural damage in the rat thalamus after cortical infarcts. *Stroke* 21: 790-794.

Ikeshima-Kataoka H, Shen JS, Eto Y, Saito S, Yuasa S (2008) Alteration of inflammatory cytokine production in the injured central nervous system of tenascin-deficient mice. *In Vivo* 22: 409-413.

Inatani M, Honjo M, Otori Y, Oohira A, Kido N, Tano Y, Honda Y, Tanihara H (2001) Inhibitory effects of neurocan and phosphacan on neurite outgrowth from retinal ganglion cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 1930-1938.

Ingoglia NA, Sharma SC, Pilchman J, Baranowski K, Sturman JA (1982) Axonal transport and transcellular transfer of nucleosides and polyamines in intact and regenerating optic nerves of goldfish: speculation on the axonal regulation of periaxonal cell metabolism. *J Neurosci* 2: 1412-1423.

Irony-Tur-Sinai M, Vlodaysky I, Ben Sasson SA, Pinto F, Sicsic C, Brenner T (2003) A synthetic heparin-mimicking polyanionic compound inhibits central nervous system inflammation. *J Neurol Sci* 206: 49-57.

Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ, Sasaguri Y, Mori Y (1996) Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 271: 14657-14660.

Ivanova S, Botchkina GI, Al Abed Y, Meistrell M, III, Batliwalla F, Dubinsky JM, Iadecola C, Wang H, Gregersen PK, Eaton JW, Tracey KJ (1998) Cerebral ischemia enhances polyamine oxidation: identification of enzymatically formed 3-aminopropanal as an endogenous mediator of neuronal and glial cell death. *J Exp Med* 188: 327-340.

- J -

Jacobson MD (1997) Apoptosis: Bcl-2-related proteins get connected. *Curr Biol* 7: R277-R281.

Jain A, Brady-Kalnay SM, Bellamkonda RV (2004) Modulation of Rho GTPase activity alleviates chondroitin sulfate proteoglycan-dependent inhibition of neurite extension. *J Neurosci Res* 77: 299-307.

Jain A, Kim YT, McKeon RJ, Bellamkonda RV (2006) In situ gelling hydrogels for conformal repair of spinal cord defects, and local delivery of BDNF after spinal cord injury. *Biomaterials* 27: 497-504.

Jeltsch H, Cassel JC, Jakisch R, Neufang B, Greene PL, Kelche C, Hertting G, Will B (1994a) Lesions of supracallosal or infracallosal hippocampal pathways in the rat: behavioral, neurochemical and histochemical effects. *Behav Neural Biol* 62: 121-133.

Jeltsch H, Cassel JC, Neufang B, Kelche C, Hertting G, Jakisch R, Will B (1994b) The effects of intrahippocampal raphe and/or septal grafts in rats with fimbria-fornix lesions depend on the origin of the grafted tissue and the behavioural task used. *Neuroscience* 63: 19-39.

Jeltsch H, Yee J, Aloy E, Marques PP, Schimchowitsch S, Grandbarbe L, Caillard S, Mohier E, Cassel JC (2003) Transplantation of neurospheres after granule cell lesions in rats: cognitive improvements despite no long-term immunodetection of grafted cells. *Behav Brain Res* 143: 177-191.

Jenkins R, Tetzlaff W, Hunt SP (1993) Differential expression of immediate early genes in rubrospinal neurons following axotomy in rat. *Eur J Neurosci* 5: 203-209.

Jensen JR, Lynch G, Baudry M (1987) Polyamines stimulate mitochondrial calcium transport in rat brain. *J Neurochem* 48: 765-772.

Jensen MB, Gonzalez B, Castellano B, Zimmer J (1994) Microglial and astroglial reactions to anterograde axonal degeneration: a histochemical and immunocytochemical study of the adult rat fascia dentata after entorhinal perforant path lesions. *Exp Brain Res* 98: 245-260.

Ji B, Case LC, Liu K, Shao Z, Lee X, Yang Z, Wang J, Tian T, Shulga-Morskaya S, Scott M, He Z, Relton JK, Mi S (2008) Assessment of functional recovery and axonal sprouting in oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) null mice after spinal cord injury. *Mol Cell Neurosci* 39: 258-267.

Ji B, Li M, Budel S, Pepinsky RB, Walus L, Engber TM, Strittmatter SM, Relton JK (2005) Effect of combined treatment with methylprednisolone and soluble Nogo-66 receptor after rat spinal cord injury. *Eur J Neurosci* 22: 587-594.

Johansson BB (2007) Regeneration and plasticity in the brain and spinal cord. *J Cereb Blood Flow Metab* 27: 1417-1430.

Johshita H, Sasaki T, Matsui T, Hanamura T, Masayasu H, Asano T, Takakura K (1990) Effects of ebselen (PZ51) on ischaemic brain oedema after focal ischaemia in cats. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 51: 239-241.

Jones FS, Jones PL (2000) The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* 218: 235-259.

Jung M, Pesheva P, Schachner M, Trotter J (1993) Astrocytes and neurons regulate the expression of the neural recognition molecule janusin by cultured oligodendrocytes. *Glia* 9: 163-175.

- K -

Kaminska B, Kaczmarek L, Grzelakowska-Sztabert B (1992) Inhibitors of polyamine biosynthesis affect the expression of genes encoding cytoskeletal proteins. *FEBS Lett* 304: 198-200.

Kataoka K, Suzuki Y, Kitada M, Ohnishi K, Suzuki K, Tanihara M, Ide C, Endo K, Nishimura Y (2001) Alginate, a bioresorbable material derived from brown seaweed, enhances elongation of amputated axons of spinal cord in infant rats. *J Biomed Mater Res* 54: 373-384.

Kawamata T, Katayama Y, Maeda T, Mori T, Aoyama N, Kikuchi T, Uwahodo Y (1997) Antioxidant, OPC-14117, attenuates edema formation and behavioral deficits following cortical contusion in rats. *Acta Neurochir Suppl* 70: 191-193.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386: 493-495.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1998) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18: 3206-3212.

Kermer P, Naumann T, Bender R, Frotscher M (1995) Fate of GABAergic septohippocampal neurons after fimbria-fornix transection as revealed by in situ hybridization for glutamate decarboxylase mRNA and parvalbumin immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 362: 385-399.

Kim BG, Dai HN, McAtee M, Bregman BS (2008) Modulation of dendritic spine remodeling in the motor cortex following spinal cord injury: effects of environmental enrichment and combinatorial treatment with transplants and neurotrophin-3. *J Comp Neurol* 508: 473-486.

- Kim JE, Li S, GrandPre T, Qiu D, Strittmatter SM (2003) Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B. *Neuron* 38: 187-199.
- Kim SU, de Vellis J (2005) Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81: 302-313.
- Kindy MS, Hu Y, Dempsey RJ (1994) Blockade of ornithine decarboxylase enzyme protects against ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 1040-1045.
- Kiss J, Patel AJ, Freund TF (1990) Distribution of septohippocampal neurons containing parvalbumin or choline acetyltransferase in the rat brain. *J Comp Neurol* 298: 362-372.
- Kiziltepe U, Turan NN, Han U, Ulus AT, Akar F (2004) Resveratrol, a red wine polyphenol, protects spinal cord from ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg* 40: 138-145.
- Knobloch SM, Alroy DA, Nikolaeva M, Cernak I, Stoica BA, Faden AI (2004) Caspase inhibitor z-DEVD-fmk attenuates calpain and necrotic cell death in vitro and after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 1119-1132.
- Knobloch SM, Fan L, Faden AI (1999) Early neuronal expression of tumor necrosis factor-alpha after experimental brain injury contributes to neurological impairment. *J Neuroimmunol* 95: 115-125.
- Koelle GB (1954) The histochemical localization of cholinesterases in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 100: 211-235.
- Kohler C, Chan-Palay V, Wu JY (1984) Septal neurons containing glutamic acid decarboxylase immunoreactivity project to the hippocampal region in the rat brain. *Anat Embryol (Berl)* 169: 41-44.
- Kolb B, Gibb R (1991) Environmental enrichment and cortical injury: behavioral and anatomical consequences of frontal cortex lesions. *Cereb Cortex* 1: 189-198.
- Kolodkin AL, Levengood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD (1997) Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90: 753-762.
- Komitova M, Johansson BB, Eriksson PS (2006) On neural plasticity, new neurons and the postischemic milieu: an integrated view on experimental rehabilitation. *Exp Neurol* 199: 42-55.
- Koopmans GC, Brans M, Gomez-Pinilla F, Duis S, Gispen WH, Torres-Aleman I, Joosten EA, Hamers FP (2006) Circulating insulin-like growth factor I and functional recovery from spinal cord injury under enriched housing conditions. *Eur J Neurosci* 23: 1035-1046.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999) Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10711-10716.
- Kossmann T, Hans V, Imhof HG, Trentz O, Morganti-Kossmann MC (1996) Interleukin-6 released in human cerebrospinal fluid following traumatic brain injury may trigger nerve growth factor production in astrocytes. *Brain Res* 713: 143-152.
- Koyama Y, Naruo H, Yoshitomi Y, Munesue S, Kiyono S, Kusano Y, Hashimoto K, Yokoi T, Nakanishi H, Shimizu S, Okayama M, Oguri K (2008) Matrix metalloproteinase-9 associated with heparan sulphate chains of GPI-anchored cell surface proteoglycans mediates motility of murine colon adenocarcinoma cells. *J Biochem* 143: 581-592.
- Kremlev SG, Palmer C (2005) Interleukin-10 inhibits endotoxin-induced pro-inflammatory cytokines in microglial cell cultures. *J Neuroimmunol* 162: 71-80.
- Kruger RP, Aurandt J, Guan KL (2005) Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 789-800.
- Kubo T, Yamaguchi A, Iwata N, Yamashita T (2008) The therapeutic effects of Rho-ROCK inhibitors on CNS disorders. *Ther Clin Risk Manag* 4: 605-615.

Kuhn HG, Palmer TD, Fuchs E (2001) Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251: 152-158.

- L -

Lafont J, Baroukh B, Berdal A, Colombier ML, Barritault D, Caruelle JP, Saffar JL (1998) RGTA11, a new healing agent, triggers developmental events during healing of craniotomy defects in adult rats. *Growth Factors* 16: 23-38.

Lafont J, Blanquaert F, Colombier ML, Barritault D, Carueelle JP, Saffar JL (2004) Kinetic study of early regenerative effects of RGTA11, a heparan sulfate mimetic, in rat craniotomy defects. *Calcif Tissue Int* 75: 517-525.

Lai HL, Abu'Khalil A, Craig DQ (2003) The preparation and characterisation of drug-loaded alginate and chitosan sponges. *Int J Pharm* 251: 175-181.

Lallam-Laroye C, Escartin Q, Zlowodzki AS, Barritault D, Caruelle JP, Baroukh B, Saffar JL, Colombier ML (2006) Periodontitis destructions are restored by synthetic glycosaminoglycan mimetic. *J Biomed Mater Res A* 79: 675-683.

Landis SC, Keefe D (1983) Evidence for neurotransmitter plasticity in vivo: developmental changes in properties of cholinergic sympathetic neurons. *Dev Biol* 98: 349-372.

Lange PS, Langley B, Lu P, Ratan RR (2004) Novel roles for arginase in cell survival, regeneration, and translation in the central nervous system. *J Nutr* 134: 2812S-2817S.

Lapchak PA, Hefti F (1992) BDNF and NGF treatment in lesioned rats: effects on cholinergic function and weight gain. *Neuroreport* 3: 405-408.

Larsen PH, Wells JE, Stallcup WB, Opdenakker G, Yong VW (2003) Matrix metalloproteinase-9 facilitates remyelination in part by processing the inhibitory NG2 proteoglycan. *J Neurosci* 23: 11127-11135.

Lee MJ, Chen CJ, Cheng CH, Huang WC, Kuo HS, Wu JC, Tsai MJ, Huang MC, Chang WC, Cheng H (2008) Combined treatment using peripheral nerve graft and FGF-1: changes to the glial environment and differential macrophage reaction in a complete transected spinal cord. *Neurosci Lett* 433: 163-169.

Lee SR, Im KJ, Suh SI, Jung JG (2003) Protective effect of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and other antioxidants on lipid peroxidation in gerbil brain homogenates. *Phytother Res* 17: 206-209.

Lehmann M, Fournier A, Selles-Navarro I, Dergham P, Sebok A, Leclerc N, Tigyi G, McKerracher L (1999) Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *J Neurosci* 19: 7537-7547.

Lehmann O, Jeltsch H, Lazarus C, Tritschler L, Bertrand F, Cassel JC (2002) Combined 192 IgG-saporin and 5,7-dihydroxytryptamine lesions in the male rat brain: a neurochemical and behavioral study. *Pharmacol Biochem Behav* 72: 899-912.

Lehrmann E, Christensen T, Zimmer J, Diemer NH, Finsen B (1997) Microglial and macrophage reactions mark progressive changes and define the penumbra in the rat neocortex and striatum after transient middle cerebral artery occlusion. *J Comp Neurol* 386: 461-476.

Leranth C, Frotscher M (1987) Cholinergic innervation of hippocampal GAD- and somatostatin-immunoreactive commissural neurons. *J Comp Neurol* 261: 33-47.

Lever R, Page CP (2002) Novel drug development opportunities for heparin. *Nat Rev Drug Discov* 1: 140-148.

- Levin HS (1995) Prediction of recovery from traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 12: 913-922.
- Li W, Walus L, Rabacchi SA, Jirik A, Chang E, Schauer J, Zheng BH, Benedetti NJ, Liu BP, Choi E, Worley D, Silvian L, Mo W, Mullen C, Yang W, Strittmatter SM, Sah DW, Pepinsky B, Lee DH (2004) A neutralizing anti-Nogo66 receptor monoclonal antibody reverses inhibition of neurite outgrowth by central nervous system myelin. *J Biol Chem* 279: 43780-43788.
- Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Katakowski M, Zhang LJ, Lu M, Janakiraman N, Chopp M (2002) Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 59: 514-523.
- Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW (2004) Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 89: 1092-1100.
- Liebscher T, Schnell L, Schnell D, Scholl J, Schneider R, Gullo M, Fouad K, Mir A, Rausch M, Kindler D, Hamers FP, Schwab ME (2005) Nogo-A antibody improves regeneration and locomotion of spinal cord-injured rats. *Ann Neurol* 58: 706-719.
- Lin HW, Basu A, Druckman C, Cicchese M, Krady JK, Levison SW (2006) Astrogliosis is delayed in type 1 interleukin-1 receptor-null mice following a penetrating brain injury. *J Neuroinflammation* 3: 15.
- Linseman DA, Loucks FA (2008) Diverse roles of Rho family GTPases in neuronal development, survival, and death. *Front Biosci* 13: 657-676.
- Lippert-Gruener M, Maegele M, Garbe J, Angelov DN (2007) Late effects of enriched environment (EE) plus multimodal early onset stimulation (MEOS) after traumatic brain injury in rats: Ongoing improvement of neuromotor function despite sustained volume of the CNS lesion. *Exp Neurol* 203: 82-94.
- Liu BP, Fournier A, GrandPre T, Strittmatter SM (2002) Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science* 297: 1190-1193.
- Liu Y, Himes BT, Solowska J, Moul J, Chow SY, Park KI, Tessler A, Murray M, Snyder EY, Fischer I (1999) Intraspinal delivery of neurotrophin-3 using neural stem cells genetically modified by recombinant retrovirus. *Exp Neurol* 158: 9-26.
- Logan A, Ahmed Z, Baird A, Gonzalez AM, Berry M (2006) Neurotrophic factor synergy is required for neuronal survival and disinhibited axon regeneration after CNS injury. *Brain* 129: 490-502.
- Loh NK, Woerly S, Bunt SM, Wilton SD, Harvey AR (2001) The regrowth of axons within tissue defects in the CNS is promoted by implanted hydrogel matrices that contain BDNF and CNTF producing fibroblasts. *Exp Neurol* 170: 72-84.
- Lord-Fontaine S, Yang F, Diep Q, Dergham P, Munzer S, Tremblay P, McKerracher L (2008) Local inhibition of Rho signaling by cell-permeable recombinant protein BA-210 prevents secondary damage and promotes functional recovery following acute spinal cord injury. *J Neurotrauma* 25: 1309-1322.
- Lortat-Jacob H, Garrone P, Banchereau J, Grimaud JA (1997) Human interleukin 4 is a glycosaminoglycan-binding protein. *Cytokine* 9: 101-105.
- Loy R, Milner TA, Moore RY (1980) Sprouting of sympathetic axons in the hippocampal formation: conditions necessary to elicit ingrowth. *Exp Neurol* 67: 399-411.
- Lu J, Moochhala S, Shirhan M, Ng KC, Tan MH, Teo AL, Ling EA (2003a) Nitric oxide induces macrophage apoptosis following traumatic brain injury in rats. *Neurosci Lett* 339: 147-150.
- Lu J, Moochhala S, Shirhan M, Ng KC, Teo AL, Tan MH, Moore XL, Wong MC, Ling EA (2003b) Neuroprotection by aminoguanidine after lateral fluid-percussive brain injury in rats:

a combined magnetic resonance imaging, histopathologic and functional study. *Neuropharmacology* 44: 253-263.

Lu P, Yang H, Jones LL, Filbin MT, Tuszynski MH (2004) Combinatorial therapy with neurotrophins and cAMP promotes axonal regeneration beyond sites of spinal cord injury. *J Neurosci* 24: 6402-6409.

Luo Y, Shoichet MS (2004) Light-activated immobilization of biomolecules to agarose hydrogels for controlled cellular response. *Biomacromolecules* 5: 2315-2323.

- M -

Ma J, Tian WM, Hou SP, Xu QY, Spector M, Cui FZ (2007) An experimental test of stroke recovery by implanting a hyaluronic acid hydrogel carrying a Nogo receptor antibody in a rat model. *Biomed Mater* 2: 233-240.

Macias M (2008) Injury induced dendritic plasticity in the mature central nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 68: 334-346.

Madziar B, Lopez-Coviella I, Zemelko V, Berse B (2005) Regulation of cholinergic gene expression by nerve growth factor depends on the phosphatidylinositol-3'-kinase pathway. *J Neurochem* 92: 767-779.

Malaterre J, Strambi C, Aouane A, Strambi A, Rougon G, Cayre M (2004) A novel role for polyamines in adult neurogenesis in rodent brain. *Eur J Neurosci* 20: 317-330.

Malik JM, Shevtsova Z, Bahr M, Kugler S (2005) Long-term in vivo inhibition of CNS neurodegeneration by Bcl-XL gene transfer. *Mol Ther* 11: 373-381.

Malipiero UV, Frei K, Fontana A (1990) Production of hemopoietic colony-stimulating factors by astrocytes. *J Immunol* 144: 3816-3821.

Mandel S, Weinreb O, Amit T, Youdim MB (2004) Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 88: 1555-1569.

Mangoni M, Yue X, Morin C, Violot D, Frascogna V, Tao Y, Opolon P, Castaing M, Auperin A, Biti G, Barritault D, Vozenin-Brotans MC, Deutsch E, Bourhis J (2009) Differential effect triggered by a heparan mimetic of the RGTA family preventing oral mucositis without tumor protection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 74: 1242-1250.

Manthorpe M, Luyten W, Longo FM, Varon S (1983) Endogenous and exogenous factors support neuronal survival and choline acetyltransferase activity in embryonic spinal cord cultures. *Brain Res* 267: 57-66.

Marklund N, Bareyre FM, Royo NC, Thompson HJ, Mir AK, Grady MS, Schwab ME, McIntosh TK (2007) Cognitive outcome following brain injury and treatment with an inhibitor of Nogo-A in association with an attenuated downregulation of hippocampal growth-associated protein-43 expression. *J Neurosurg* 107: 844-853.

Marques-Peirera P (2004) Récupération fonctionnelle chez le rat cérébro-lésé : effets morphologiques, neurochimiques et comportementaux de traitements favorisant la repousse neuritique. Thèse de Doctorat d'Université en Neurosciences, Soutenue le 15 décembre 2004, Université Louis Pasteur, Strasbourg.

Marques Pereira P, Rutz S, Rothmaier AK, Will BE, Papy-Garcia D, Muller C, Kelche C, Barritault D, Jackisch R, Schimchowitsch S, Cassel J-C (en préparation) Protective Effects of a Synthetic Glycosaminoglycan Mimetic (RGTA) in a Rat Immunotoxic Lesion Model of Septohippocampal Cholinergic Degeneration.

- Martins A, Araujo JV, Reis RL, Neves NM (2007) Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications. *Nanomed* 2: 929-942.
- Marzatico F, Gaetani P, Buratti E, Messina AL, Ferlenga P, Baena R (1990) Effects of high-dose methylprednisolone on Na(+)-K+ ATPase and lipid peroxidation after experimental subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurol Scand* 82: 263-270.
- Mason MR, Lieberman AR, Anderson PN (2003) Corticospinal neurons up-regulate a range of growth-associated genes following intracortical, but not spinal, axotomy. *Eur J Neurosci* 18: 789-802.
- Mattson MP, Cheng B (1993) Growth factors protect neurons against excitotoxic/ischemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Stroke* 24: 1136-1140.
- Matute C, Alberdi E, Domercq M, Sanchez-Gomez MV, Perez-Samartin A, Rodriguez-Antiguedad A, Perez-Cerda F (2007) Excitotoxic damage to white matter. *J Anat* 210: 693-702.
- McArdle A, van der Meulen JH, Catapano M, Symons MC, Faulkner JA, Jackson MJ (1999) Free radical activity following contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats. *Free Radic Biol Med* 26: 1085-1091.
- McCaffrey TA, Falcone DJ, Borth W, Weksler BB (1994) Alpha 2-macroglobulin/transforming growth factor-beta 1 interactions. Modulation by heparin-like molecules and effects on vascular smooth muscle cells. *Ann N Y Acad Sci* 737: 368-382.
- McGraw J, Hiebert GW, Steeves JD (2001) Modulating astrogliosis after neurotrauma. *J Neurosci Res* 63: 109-115.
- McIntosh TK, Thomas M, Smith D, Banbury M (1992) The novel 21-aminosteroid U74006F attenuates cerebral edema and improves survival after brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 9: 33-46.
- McKenzie JL, Waid MC, Shi R, Webster TJ (2004) Decreased functions of astrocytes on carbon nanofiber materials. *Biomaterials* 25: 1309-1317.
- McKerracher L, David S, Jackson DL, Kottis V, Dunn RJ, Braun PE (1994) Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 13: 805-811.
- McKerracher L, Essagian C, Aguayo AJ (1993) Temporal changes in beta-tubulin and neurofilament mRNA levels after transection of adult rat retinal ganglion cell axons in the optic nerve. *J Neurosci* 13: 2617-2626.
- McKerracher L, Higuchi H (2006) Targeting Rho to stimulate repair after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 23: 309-317.
- McLennan IS, Weible MW, Hendry IA, Koishi K (2005) Transport of transforming growth factor-beta 2 across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology* 48: 274-282.
- McNaughton N, Gray JA (2000) Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord* 61: 161-176.
- Meddahi A, Alexakis C, Papy D, Caruelle JP, Barritault D (2002a) Heparin-like polymer improved healing of gastric and colic ulceration. *J Biomed Mater Res* 60: 497-501.
- Meddahi A, Bree F, Papy-Garcia D, Gautron J, Barritault D, Caruelle JP (2002b) Pharmacological studies of RGTA(11), a heparan sulfate mimetic polymer, efficient on muscle regeneration. *J Biomed Mater Res* 62: 525-531.
- Meibach RC, Siegel A (1977) Efferent connections of the septal area in the rat: an analysis utilizing retrograde and anterograde transport methods. *Brain Res* 119: 1-20.

- Meiners S, Powell EM, Geller HM (1995) A distinct subset of tenascin/CS-6-PG-rich astrocytes restricts neuronal growth in vitro. *J Neurosci* 15: 8096-8108.
- Menard J, Treit D (1999) Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 591-613.
- Menard J, Treit D (2000) Intra-septal infusions of excitatory amino acid receptor antagonists have differential effects in two animal models of anxiety. *Behav Pharmacol* 11: 99-108.
- Merabet L, Desautels A, Minville K, Casanova C (1998) Motion integration in a thalamic visual nucleus. *Nature* 396: 265-268.
- Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, Levesque M, Allaire N, Perrin S, Sands B, Crowell T, Cate RL, McCoy JM, Pepinsky RB (2004) LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci* 7: 221-228.
- Mi S, Sandrock A, Miller RH (2008) LINGO-1 and its role in CNS repair. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1971-1978.
- Midwood KS, Schwarzbauer JE (2002) Tenascin-C modulates matrix contraction via focal adhesion kinase- and Rho-mediated signaling pathways. *Mol Biol Cell* 13: 3601-3613.
- Milner TA, Loy R, Amaral DG (1983) An anatomical study of the development of the septo-hippocampal projection in the rat. *Brain Res* 284: 343-371.
- Milward E, Kim KJ, Szklarczyk A, Nguyen T, Melli G, Nayak M, Deshpande D, Fitzsimmons C, Hoke A, Kerr D, Griffin JW, Calabresi PA, Conant K (2008) Cleavage of myelin associated glycoprotein by matrix metalloproteinases. *J Neuroimmunol* 193: 140-148.
- Mizui T, Kinouchi H, Chan PH (1992) Depletion of brain glutathione by buthionine sulfoximine enhances cerebral ischemic injury in rats. *Am J Physiol* 262: H313-H317.
- Mocchetti I, Wrathall JR (1995) Neurotrophic factors in central nervous system trauma. *J Neurotrauma* 12: 853-870.
- Moochhala SM, Md S, Lu J, Teng CH, Greengrass C (2004) Neuroprotective role of aminoguanidine in behavioral changes after blast injury. *J Trauma* 56: 393-403.
- Moon LD, Asher RA, Rhodes KE, Fawcett JW (2001) Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nat Neurosci* 4: 465-466.
- Moon LD, Asher RA, Rhodes KE, Fawcett JW (2002) Relationship between sprouting axons, proteoglycans and glial cells following unilateral nigrostriatal axotomy in the adult rat. *Neuroscience* 109: 101-117.
- Moreau-Fauvarque C, Kumanogoh A, Camand E, Jaillard C, Barbin G, Boquet I, Love C, Jones EY, Kikutani H, Lubetzki C, Dusart I, Chedotal A (2003) The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. *J Neurosci* 23: 9229-9239.
- Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Otto VI, Stahel PF, Kossmann T (2001) Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept. *Shock* 16: 165-177.
- Mori K, Togashi H, Ueno KI, Matsumoto M, Yoshioka M (2001) Aminoguanidine prevented the impairment of learning behavior and hippocampal long-term potentiation following transient cerebral ischemia. *Behav Brain Res* 120: 159-168.
- Mori M, Yamaguchi M, Sumitomo S, Takai Y (2004) Hyaluronan-based biomaterials in tissue engineering. *Acta Histochemica et Cytochemica* 37:1-5.
- Morioka T, Kalehua AN, Streit WJ (1991) The microglial reaction in the rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 11: 966-973.

- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11: 47-60.
- Morvan FO, Baroukh B, Ledoux D, Caruelle JP, Barritault D, Godeau G, Saffar JL (2004) An engineered biopolymer prevents mucositis induced by 5-fluorouracil in hamsters. *Am J Pathol* 164: 739-746.
- Mott JD, Werb Z (2004) Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 16: 558-564.
- Mueller BK, Mack H, Teusch N (2005) Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov* 4: 387-398.
- Mufson EJ, Kroin JS, Sendera TJ, Sobreviela T (1999) Distribution and retrograde transport of trophic factors in the central nervous system: functional implications for the treatment of neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol* 57: 451-484.
- Mukhopadhyay G, Doherty P, Walsh FS, Crocker PR, Filbin MT (1994) A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 13: 757-767.
- Muller C, Herberth H, Cosquer B, Kelche C, Cassel JC, Schimchowitsch S (2007) Structural and functional recovery elicited by combined putrescine and aminoguanidine treatment after aspirative lesion of the fimbria-fornix and overlying cortex in the adult rat. *Eur J Neurosci* 25: 1949-1960.
- Muramatsu T, Muramatsu H (2008) Glycosaminoglycan-binding cytokines as tumor markers. *Proteomics* 8: 3350-3359.
- Murphy G, Knauper V, Lee MH, Amour A, Worley JR, Hutton M, Atkinson S, Rapti M, Williamson R (2003) Role of TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) in pericellular proteolysis: the specificity is in the detail. *Biochem Soc Symp* 65-80.
- Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA, Sofroniew MV (2006) Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain* 129: 2761-2772.
- N -
- Nail-Boucherie K, Dourmap N, Jaffard R, Costentin J (2000) Contextual fear conditioning is associated with an increase of acetylcholine release in the hippocampus of rat. *Brain Res Cogn Brain Res* 9: 193-197.
- Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S (1996) ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett* 392: 189-193.
- Nakamura F, Kalb RG, Strittmatter SM (2000) Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance. *J Neurobiol* 44: 219-229.
- Nakazawa T, Nakazawa C, Matsubara A, Noda K, Hisatomi T, She H, Michaud N, Hafezi-Moghadam A, Miller JW, Benowitz LI (2006) Tumor necrosis factor-alpha mediates oligodendrocyte death and delayed retinal ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci* 26: 12633-12641.
- Nash HH, Borke RC, Anders JJ (2002) Ensheathing cells and methylprednisolone promote axonal regeneration and functional recovery in the lesioned adult rat spinal cord. *J Neurosci* 22: 7111-7120.
- Naraghi K, Soussand J, Felix J.M, Schimchowitsch S and Lutz P (1998) Poly(ethylene oxide) hydrogels : a template for the growth of nervous cells. *Polym. Prep., Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.* 39: 196-197.

- Naumann T, Kermer P, Frotscher M (1994a) Fine structure of rat septohippocampal neurons. III. Recovery of choline acetyltransferase immunoreactivity after fimbria-fornix transection. *J Comp Neurol* 350: 161-170.
- Naumann T, Kermer P, Seydewitz V, Ortmann R, D'Amato F, Frotscher M (1994b) Is there a long-lasting effect of a short-term nerve growth factor application on axotomized rat septohippocampal neurons? *Neurosci Lett* 173: 213-215.
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM (2000) Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18: 1135-1149.
- Neumann S, Bradke F, Tessier-Lavigne M, Basbaum AI (2002) Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. *Neuron* 34: 885-893.
- Neumann S, Woolf CJ (1999) Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury. *Neuron* 23: 83-91.
- Newman TA, Woolley ST, Hughes PM, Sibson NR, Anthony DC, Perry VH (2001) T-cell- and macrophage-mediated axon damage in the absence of a CNS-specific immune response: involvement of metalloproteinases. *Brain* 124: 2203-2214.
- Ng J, Luo L (2004) Rho GTPases regulate axon growth through convergent and divergent signaling pathways. *Neuron* 44: 779-793.
- Nicholls DG, Budd SL (2000) Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 80: 315-360.
- Nicholls DG, Scott ID (1980) The regulation of brain mitochondrial calcium-ion transport. The role of ATP in the discrimination between kinetic and membrane-potential-dependent calcium-ion efflux mechanisms. *Biochem J* 186: 833-839.
- Niederer C, Schulz HU, Klonowski H (1995) Lazaroids protect isolated rat pancreatic acinar cells against damage induced by free radicals. *Pancreas* 11: 107-121.
- Niederost B, Oertle T, Fritsche J, McKinney RA, Bandtlow CE (2002) Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *J Neurosci* 22: 10368-10376.
- Nikulina E, Tidwell JL, Dai HN, Bregman BS, Filbin MT (2004) The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8786-8790.
- Nisbet DR, Moses D, Gengenbach TR, Forsythe JS, Finkelstein DI, Horne MK (2009) Enhancing neurite outgrowth from primary neurones and neural stem cells using thermoresponsive hydrogel scaffolds for the repair of spinal cord injury. *J Biomed Mater Res A* 89: 24-35.
- Nishio T, Kawaguchi S, Yamamoto M, Iseda T, Kawasaki T, Hase T (2005) Tenascin-C regulates proliferation and migration of cultured astrocytes in a scratch wound assay. *Neuroscience* 132: 87-102.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ (2006) Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 7: 697-709.
- Novikova LN, Mosahebi A, Wiberg M, Terenghi G, Kellerth JO, Novikov LN (2006) Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation. *J Biomed Mater Res A* 77: 242-252.
- Numan R, Quaranta JR, Jr. (1990) Effects of medial septal lesions on operant delayed alternation in rats. *Brain Res* 531: 232-241.

- O -

O'Donnell P, Grace AA (1995) Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus accumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical input. *Journal of Neuroscience* 15: 3622-3639.

O'Keefe J, Nadel L (1978) *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford University Press.

O'Neill LA, Kaltschmidt C (1997) NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 20: 252-258.

O'Neill MJ, Hicks C, Ward M, Panetta JA (1997) Neuroprotective effects of the antioxidant LY231617 and NO synthase inhibitors in global cerebral ischaemia. *Brain Res* 760: 170-178.

Oertle T, van der Haar ME, Bandtlow CE, Robeva A, Burfeind P, Buss A, Huber AB, Simonen M, Schnell L, Brosamle C, Kaupmann K, Vallon R, Schwab ME (2003) Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *J Neurosci* 23: 5393-5406.

Ogawa A, Yoshimoto T, Kikuchi H, Sano K, Saito I, Yamaguchi T, Yasuhara H (1999) Ebselen in acute middle cerebral artery occlusion: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Cerebrovasc Dis* 9: 112-118.

Ogawa N, Tsukamoto S, Hirose Y, Kuroda H (1986) Survival effect of coenzyme Q10 and naloxone on experimental stroke gerbils. *Pharmacol Biochem Behav* 24: 315-317.

Oh LY, Larsen PH, Krekoski CA, Edwards DR, Donovan F, Werb Z, Yong VW (1999) Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is required for process outgrowth by oligodendrocytes. *J Neurosci* 19: 8464-8475.

Ohmori S, Misaizu T, Kitada M, Kitagawa H, Igarashi K, Hirose S, Kanakubo Y (1988) Polyamine lowered the hepatic lipid peroxide level in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 62: 235-249.

Otto D, Frotscher M, Unsicker K (1989) Basic fibroblast growth factor and nerve growth factor administered in gel foam rescue medial septal neurons after fimbria fornix transection. *J Neurosci Res* 22: 83-91.

Oudega M, Varon S, Hagg T (1994) Regeneration of adult rat sensory axons into intraspinal nerve grafts: promoting effects of conditioning lesion and graft predegeneration. *Exp Neurol* 129: 194-206.

Oudega M, Xu XM, Guenard V, Kleitman N, Bunge MB (1997) A combination of insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor enhances myelination but diminishes axonal regeneration into Schwann cell grafts in the adult rat spinal cord. *Glia* 19: 247-258.

- P -

Palkovits M (1984) Distribution of neuropeptides in the central nervous system: a review of biochemical mapping studies. *Prog Neurobiol* 23: 151-189.

Palmer C, Roberts RL, Bero C (1994) Deferoxamine posttreatment reduces ischemic brain injury in neonatal rats. *Stroke* 25: 1039-1045.

Panula P, Revuelta AV, Cheney DL, Wu JY, Costa E (1984) An immunohistochemical study on the location of GABAergic neurons in rat septum. *J Comp Neurol* 222: 69-80.

Papadopoulos CM, Tsai SY, Alsbie T, O'Brien TE, Schwab ME, Kartje GL (2002) Functional recovery and neuroanatomical plasticity following middle cerebral artery occlusion and IN-1 antibody treatment in the adult rat. *Ann Neurol* 51: 433-441.

- Papadopoulos CM, Tsai SY, Cheatwood JL, Bollnow MR, Kolb BE, Schwab ME, Kartje GL (2006) Dendritic plasticity in the adult rat following middle cerebral artery occlusion and Nogo-a neutralization. *Cereb Cortex* 16: 529-536.
- Papy-Garcia D, Barbosa I, Duchesnay A, Saadi S, Caruelle JP, Barritault D, Martelly I (2002) Glycosaminoglycan mimetics (RGTA) modulate adult skeletal muscle satellite cell proliferation in vitro. *J Biomed Mater Res* 62: 46-55.
- Parish CR (2006) The role of heparan sulphate in inflammation. *Nat Rev Immunol* 6: 633-643.
- Park CK, Hall ED (1994) Dose-response analysis of the effect of 21-aminosteroid tirilazad mesylate (U-74006F) upon neurological outcome and ischemic brain damage in permanent focal cerebral ischemia. *Brain Res* 645: 157-163.
- Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS (2004) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 4: 617-629.
- Parsadanian AS, Cheng Y, Keller-Peck CR, Holtzman DM, Snider WD (1998) Bcl-xL is an antiapoptotic regulator for postnatal CNS neurons. *J Neurosci* 18: 1009-1019.
- Paschen W (1992) Polyamine metabolism in different pathological states of the brain. *Mol Chem Neuropathol* 16: 241-271.
- Paschen W, Schmidt-Kastner R, Hallmayer J, Djuricic B (1988) Polyamines in cerebral ischemia. *Neurochem Pathol* 9: 1-20.
- Pasterkamp RJ, De Winter F, Holtmaat AJ, Verhaagen J (1998a) Evidence for a role of the chemorepellent semaphorin III and its receptor neuropilin-1 in the regeneration of primary olfactory axons. *J Neurosci* 18: 9962-9976.
- Pasterkamp RJ, Giger RJ, Verhaagen J (1998b) Regulation of semaphorin III/collapsin-1 gene expression during peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 153: 313-327.
- Paxinos G (2004) *The Rat Nervous System*. (3rd ed) Elsevier, New York.
- Pearse DD, Pereira FC, Marcillo AE, Bates ML, Berrocal YA, Filbin MT, Bunge MB (2004) cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *Nat Med* 10: 610-616.
- Pelletier S, Hubert P, Payan E, Marchal P, Choplin L, Dellacherie E (2001) Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate for cartilage repair: rheological properties. *J Biomed Mater Res* 54: 102-108.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14: 149-167.
- Penkowa M, Hidalgo J (2000) IL-6 deficiency leads to reduced metallothionein-I+II expression and increased oxidative stress in the brain stem after 6-aminonicotinamide treatment. *Exp Neurol* 163: 72-84.
- Pesheva P, Probstmeier R (2000) The yin and yang of tenascin-R in CNS development and pathology. *Prog Neurobiol* 61: 465-493.
- Peterson C (1992) Changes in calciums role as a messenger during aging in neuronal and nonneuronal cells. *Aging and Cellular Defense Mechanisms* 663: 279-293.
- Pham TM, Winblad B, Granholm AC, Mohammed AH (2002) Environmental influences on brain neurotrophins in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73: 167-175.
- Phillips RG, LeDoux JE (1995) Lesions of the fornix but not the entorhinal or perirhinal cortex interfere with contextual fear conditioning. *J Neurosci* 15: 5308-5315.

Piantino J, Burdick JA, Goldberg D, Langer R, Benowitz LI (2006) An injectable, biodegradable hydrogel for trophic factor delivery enhances axonal rewiring and improves performance after spinal cord injury. *Exp Neurol* 201: 359-367.

Pizzi MA, Crowe MJ (2006) Transplantation of fibroblasts that overexpress matrix metalloproteinase-3 into the site of spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 23: 1750-1765.

Pober JS, Cotran RS (1990a) Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 70: 427-451.

Pober JS, Cotran RS (1990b) The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 50: 537-544.

Prehn JH, Bindokas VP, Marcuccilli CJ, Krajewski S, Reed JC, Miller RJ (1994) Regulation of neuronal Bcl2 protein expression and calcium homeostasis by transforming growth factor type beta confers wide-ranging protection on rat hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12599-12603.

Prehn JH, Karkoutly C, Nuglich J, Peruche B, Krieglstein J (1992) Dihydrolipoate reduces neuronal injury after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 78-87.

Prehn JH, Peruche B, Unsicker K, Krieglstein J (1993) Isoform-specific effects of transforming growth factors-beta on degeneration of primary neuronal cultures induced by cytotoxic hypoxia or glutamate. *J Neurochem* 60: 1665-1672.

Prinjha R, Moore SE, Vinson M, Blake S, Morrow R, Christie G, Michalovich D, Simmons DL, Walsh FS (2000) Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature* 403: 383-384.

Probstmeier R, Braunewell K, Pesheva P (2000) Involvement of chondroitin sulfates on brain-derived tenascin-R in carbohydrate-dependent interactions with fibronectin and tenascin-C. *Brain Res* 863: 42-51.

Probstmeier R, Pesheva P (1999) Tenascin-C inhibits beta1 integrin-dependent cell adhesion and neurite outgrowth on fibronectin by a disialoganglioside-mediated signaling mechanism. *Glycobiology* 9: 101-114.

Prockop DJ (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71-74.

- Q -

Qiu J, Cai D, Dai H, McAtee M, Hoffman PN, Bregman BS, Filbin MT (2002a) Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron* 34: 895-903.

Qiu J, Cai D, Filbin MT (2002b) A role for cAMP in regeneration during development and after injury. *Prog Brain Res* 137: 381-387.

Quilliam LA, Khosravi-Far R, Huff SY, Der CJ (1995) Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins. *Bioessays* 17: 395-404.

- R -

Raff MC (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397-400.

Raineteau O, Fouad K, Noth P, Thallmair M, Schwab ME (2001) Functional switch between motor tracts in the presence of the mAb IN-1 in the adult rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6929-6934.

- Raineteau O, Z'Graggen WJ, Thallmair M, Schwab ME (1999) Sprouting and regeneration after pyramidotomy and blockade of the myelin-associated neurite growth inhibitors NI 35/250 in adult rats. *Eur J Neurosci* 11: 1486-1490.
- Ramon y Cajal S (1928) *Cajal's Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. Oxford University Press.
- Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M, Solomon A, Gepstein R, Katz A, Belkin M, Hadani M, Schwartz M (1998) Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med* 4: 814-821.
- Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1545-1564.
- Ren JM, Finklestein SP (1997) Time window of infarct reduction by intravenous basic fibroblast growth factor in focal cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 327: 11-16.
- Restivo L, Ferrari F, Passino E, Sgobio C, Bock J, Oostra BA, Bagni C, Ammassari-Teule M (2005) Enriched environment promotes behavioral and morphological recovery in a mouse model for the fragile X syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11557-11562.
- Reynolds IJ, Hastings TG (1995) Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J Neurosci* 15: 3318-3327.
- Rhodes KE, Raivich G, Fawcett JW (2006) The injury response of oligodendrocyte precursor cells is induced by platelets, macrophages and inflammation-associated cytokines. *Neuroscience* 140: 87-100.
- Richardson PM, Issa VM, Aguayo AJ (1984) Regeneration of long spinal axons in the rat. *J Neurocytol* 13: 165-182.
- Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ (1980) Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature* 284: 264-265.
- Roberts I, Yates D, Sandercock P, Farrell B, Wasserberg J, Lomas G, Cottingham R, Svoboda P, Brayley N, Mazairac G, Laloe V, Munoz-Sanchez A, Arango M, Hartzenberg B, Khamis H, Yuthakasemsunt S, Komolafe E, Oildashi F, Yadav Y, Murillo-Cabezas F, Shakur H, Edwards P (2004) Effect of intravenous corticosteroids on death within 14 days in 10008 adults with clinically significant head injury (MRC CRASH trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 364: 1321-1328.
- Rokyta R, Racek J, Holecek V (1996) [Free radicals in the central nervous system]. *Cesk Fysiol* 45: 4-12.
- Roof RL, Hall ED (2000) Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J Neurotrauma* 17: 367-388.
- Roof RL, Hoffman SW, Stein DG (1997) Progesterone protects against lipid peroxidation following traumatic brain injury in rats. *Mol Chem Neuropathol* 31: 1-11.
- Rosenberg GA (2002) Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 39: 279-291.
- Rostworowski M, Balasingam V, Chabot S, Owens T, Yong VW (1997) Astrogliosis in the neonatal and adult murine brain post-trauma: elevation of inflammatory cytokines and the lack of requirement for endogenous interferon-gamma. *J Neurosci* 17: 3664-3674.
- Rowe MK, Chuang DM (2004) Lithium neuroprotection: molecular mechanisms and clinical implications. *Expert Rev Mol Med* 6: 1-18.
- Ruocco A, Nicole O, Docagne F, Ali C, Chazalviel L, Komesli S, Yablonsky F, Roussel S, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A (1999) A transforming growth factor-beta antagonist unmasks the neuroprotective role of this endogenous cytokine in excitotoxic and ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 1345-1353.

- S -

Saavedra RA, Murray M, de Lacalle S, Tessler A (2000) In vivo neuroprotection of injured CNS neurons by a single injection of a DNA plasmid encoding the Bcl-2 gene. *Prog Brain Res* 128: 365-372.

Sakai T, Johnson KJ, Murozono M, Sakai K, Magnuson MA, Wieloch T, Cronberg T, Isshiki A, Erickson HP, Fassler R (2001) Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis. *Nat Med* 7: 324-330.

Sanada T, Nakamura T, Nishimura MC, Isayama K, Pitts LH (1993) Effect of U74006F on neurologic function and brain edema after fluid percussion injury in rats. *J Neurotrauma* 10: 65-71.

Sankarapandi S, Zweier JL, Mukherjee G, Quinn MT, Huso DL (1998) Measurement and characterization of superoxide generation in microglial cells: evidence for an NADPH oxidase-dependent pathway. *Arch Biochem Biophys* 353: 312-321.

Sarco DP, Becker J, Palmer C, Sheldon RA, Ferriero DM (2000) The neuroprotective effect of deferoxamine in the hypoxic-ischemic immature mouse brain. *Neurosci Lett* 282: 113-116.

Scheiderer CL, McCutchen E, Thacker EE, Kolasa K, Ward MK, Parsons D, Harrell LE, Dobrunz LE, McMahon LL (2006) Sympathetic sprouting drives hippocampal cholinergic reinnervation that prevents loss of a muscarinic receptor-dependent long-term depression at CA3-CA1 synapses. *J Neurosci* 26: 3745-3756.

Schimchowitsch S, Cassel JC (2006) Polyamine and aminoguanidine treatments to promote structural and functional recovery in the adult mammalian brain after injury: a brief literature review and preliminary data about their combined administration. *J Physiol Paris* 99: 221-231.

Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Plesnila N, Baethmann A, Reulen HJ (1997) Superior neuroprotective efficacy of a novel antioxidant (U-101033E) with improved blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia. *Stroke* 28: 2018-2024.

Schnell L, Schwab ME (1990) Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* 343: 269-272.

Schnell L, Schwab ME (1993) Sprouting and regeneration of lesioned corticospinal tract fibres in the adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 5: 1156-1171.

Schreyer DJ, Skene JH (1993) Injury-associated induction of GAP-43 expression displays axon branch specificity in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurobiol* 24: 959-970.

Schulz D, Huston JP, Jezek K, Haas HL, Roth-Harer A, Selbach O, Luhmann HJ (2002) Water maze performance, exploratory activity, inhibitory avoidance and hippocampal plasticity in aged superior and inferior learners. *Eur J Neurosci* 16: 2175-2185.

Schwab ME (2002) Repairing the injured spinal cord. *Science* 295: 1029-1031.

Schwab ME, Bartholdi D (1996) Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 76: 319-370.

Schwab ME, Caroni P (1988) Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J Neurosci* 8: 2381-2393.

Schwab ME, Thoenen H (1985) Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors. *J Neurosci* 5: 2415-2423.

Schweigreiter R, Walmsley AR, Niederost B, Zimmermann DR, Oertle T, Casademunt E, Frentzel S, Dechant G, Mir A, Bandtlow CE (2004) Versican V2 and the central inhibitory

- domain of Nogo-A inhibit neurite growth via p75NTR/NgR-independent pathways that converge at RhoA. *Mol Cell Neurosci* 27: 163-174.
- Seckel BR, Jones D, Hekimian KJ, Wang KK, Chakalis DP, Costas PD (1995) Hyaluronic acid through a new injectable nerve guide delivery system enhances peripheral nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Res* 40: 318-324.
- Seiler N (1991) Pharmacological properties of the natural polyamines and their depletion by biosynthesis inhibitors as a therapeutic approach. *Prog Drug Res* 37: 107-159.
- Seiler N (2000) Oxidation of polyamines and brain injury. *Neurochem Res* 25: 471-490.
- Seiler N (2004) Catabolism of polyamines. *Amino Acids* 26: 217-233.
- Seiler N, Dezeure F (1990) Polyamine transport in mammalian cells. *Int J Biochem* 22: 211-218.
- Seiler N, Duranton B, Vincent F, Gosse F, Renault J, Raul F (2000) Inhibition of polyamine oxidase enhances the cytotoxicity of polyamine oxidase substrates. A model study with N(1)-(n-octanesulfonyl)spermine and human colon cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 32: 703-716.
- Selmaj K, Raine CS (1988) Tumor necrosis factor mediates myelin damage in organotypic cultures of nervous tissue. *Ann N Y Acad Sci* 540: 568-570.
- Senut MC, Menetrey D, Lamour Y (1989) Cholinergic and peptidergic projections from the medial septum and the nucleus of the diagonal band of Broca to dorsal hippocampus, cingulate cortex and olfactory bulb: a combined wheatgerm agglutinin-aphorseradish peroxidase-gold immunohistochemical study. *Neuroscience* 30: 385-403.
- Sherman SM, Guillery RW (1996) Functional organization of thalamocortical relays. *J Neurophysiol* 76: 1367-1395.
- Shirakawa H, Katsuki H, Kume T, Kaneko S, Akaike A (2006) Aminoglutethimide prevents excitotoxic and ischemic injuries in cortical neurons. *Br J Pharmacol* 147: 729-736.
- Shirhan M, Moochhala SM, Kerwin SY, Ng KC, Lu J (2004a) Influence of selective nitric oxide synthetase inhibitor for treatment of refractory haemorrhagic shock. *Resuscitation* 61: 221-229.
- Shirhan M, Moochhala SM, Siew Yang KL, Sng J, Ng KC, Mok P, Lu J (2004b) Preservation of neurological functions by nitric oxide synthase inhibitors in conscious rats following delayed hemorrhagic shock. *Life Sci* 76: 661-670.
- Shirhan MD, Moochhala SM, Ng PY, Lu J, Ng KC, Teo AL, Yap E, Ng I, Hwang P, Lim T, Sitoh YY, Rumpel H, Jose R, Ling E (2004c) Spermine reduces infarction and neurological deficit following a rat model of middle cerebral artery occlusion: a magnetic resonance imaging study. *Neuroscience* 124: 299-304.
- Siegel A, Schubert KL, Shaikh MB (1997) Neurotransmitters regulating defensive rage behavior in the cat. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 733-742.
- Siesjo BK (1992) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 77: 169-184.
- Singh M, Setalo G, Jr., Guan X, Warren M, Toran-Allerand CD (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J Neurosci* 19: 1179-1188.
- Sinz EH, Kochanek PM, Dixon CE, Clark RS, Carcillo JA, Schiding JK, Chen M, Wisniewski SR, Carlos TM, Williams D, DeKosky ST, Watkins SC, Marion DW, Billiar TR (1999) Inducible nitric oxide synthase is an endogenous neuroprotectant after traumatic brain injury in rats and mice. *J Clin Invest* 104: 647-656.

- Skene JH (1989) Axonal growth-associated proteins. *Annu Rev Neurosci* 12: 127-156.
- Slotkin TA, Bartolome J (1986) Role of ornithine decarboxylase and the polyamines in nervous system development: a review. *Brain Res Bull* 17: 307-320.
- Smith-Thomas LC, Fok-Seang J, Stevens J, Du JS, Muir E, Faissner A, Geller HM, Rogers JH, Fawcett JW (1994) An inhibitor of neurite outgrowth produced by astrocytes. *J Cell Sci* 107 (Pt 6): 1687-1695.
- Smith-Thomas LC, Stevens J, Fok-Seang J, Faissner A, Rogers JH, Fawcett JW (1995) Increased axon regeneration in astrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesis inhibitors. *J Cell Sci* 108 (Pt 3): 1307-1315.
- Snider WD, Zhou FQ, Zhong J, Markus A (2002) Signaling the pathway to regeneration. *Neuron* 35: 13-16.
- So KF, Aguayo AJ (1985) Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats. *Brain Res* 328: 349-354.
- Sobreviela T, Pagcatipunan M, Kroin JS, Mufson EJ (1996) Retrograde transport of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) following infusion in neo- and limbic cortex in rat: relationship to BDNF mRNA expressing neurons. *J Comp Neurol* 375: 417-444.
- Soiefer AI, Moretto A, Spencer PS, Sabri MI (1988) Axotomy-induced ornithine decarboxylase activity in the mouse dorsal root ganglion is inhibited by the vinca alkaloids. *Neurochem Res* 13: 1169-1173.
- Sorrells SF, Sapolsky RM (2007) An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav Immun* 21: 259-272.
- Sotty F, Danik M, Manseau F, Laplante F, Quirion R, Williams S (2003) Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: novel implications for hippocampal rhythmicity. *J Physiol* 551: 927-943.
- Soulet D, Rivest S (2003) Polyamines play a critical role in the control of the innate immune response in the mouse central nervous system. *J Cell Biol* 162: 257-268.
- Soy O, Aslan O, Uzun H, Barut S, Igdem AA, Belce A, Colak A (2004) Time-level relationship for nitric oxide and the protective effects of aminoguanidine in experimental spinal cord injury. *Acta Neurochir (Wien)* 146: 1329-1335.
- Sribnick EA, Ray SK, Banik NL (2006) Estrogen prevents glutamate-induced apoptosis in C6 glioma cells by a receptor-mediated mechanism. *Neuroscience* 137: 197-209.
- Sribnick EA, Wingrave JM, Matzelle DD, Wilford GG, Ray SK, Banik NL (2005) Estrogen attenuated markers of inflammation and decreased lesion volume in acute spinal cord injury in rats. *J Neurosci Res* 82: 283-293.
- Stabenfeldt SE, Garcia AJ, LaPlaca MC (2006) Thermoreversible laminin-functionalized hydrogel for neural tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 77: 718-725.
- Stein DG (2001) Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen? *Trends Neurosci* 24: 386-391.
- Sternlicht MD, Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516.
- Stichel CC, Niermann H, D'Urso D, Lausberg F, Hermanns S, Muller HW (1999) Basal membrane-depleted scar in lesioned CNS: characteristics and relationships with regenerating axons. *Neuroscience* 93: 321-333.

- Stoffel M, Rinecker M, Plesnila N, Eriskat J, Baethmann A (2000) Attenuation of secondary lesion growth in the brain after trauma by selective inhibition of the inducible NO-synthase. *Acta Neurochir Suppl* 76: 357-358.
- Stokols D (2006) Toward a science of transdisciplinary action research. *Am J Community Psychol* 38: 63-77.
- Stokols S, Tuszynski MH (2004) The fabrication and characterization of linearly oriented nerve guidance scaffolds for spinal cord injury. *Biomaterials* 25: 5839-5846.
- Story MT (1991) Polypeptide modulators of prostatic growth and development. *Cancer Surv* 11: 123-146.
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA (1999) Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57: 563-581.
- Sugawara T, Chan PH (2003) Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. *Antioxid Redox Signal* 5: 597-607.
- Sullivan PG, Geiger JD, Mattson MP, Scheff SW (2000) Dietary supplement creatine protects against traumatic brain injury. *Ann Neurol* 48: 723-729.
- Sullivan SJ, Ornstein AE, Swaine BR (1994) Agreement of classification decisions using two measures of motor co-ordination in persons with a traumatic brain injury. *Brain Inj* 8: 613-621.
- Suzuki Y, Kitaura M, Wu S, Kataoka K, Suzuki K, Endo K, Nishimura Y, Ide C (2002) Electrophysiological and horseradish peroxidase-tracing studies of nerve regeneration through alginate-filled gap in adult rat spinal cord. *Neurosci Lett* 318: 121-124.
- Suzuki Y, Shibuya M, Satoh S, Sugiyama H, Seto M, Takakura K (2008) Safety and efficacy of fasudil monotherapy and fasudil-ozagrel combination therapy in patients with subarachnoid hemorrhage: sub-analysis of the post-marketing surveillance study. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 48: 241-247.
- Swanson LW, Cowan WM (1979) The connections of the septal region in the rat. *J Comp Neurol* 186: 621-655.
- Swartz KR, Liu F, Sewell D, Schochet T, Campbell I, Sandor M, Fabry Z (2001) Interleukin-6 promotes post-traumatic healing in the central nervous system. *Brain Res* 896: 86-95.
- Sykova E, Jendelova P (2006) Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord. *Neurodegener Dis* 3: 62-67.
- Sykova E, Jendelova P (2007a) In vivo tracking of stem cells in brain and spinal cord injury. *Prog Brain Res* 161: 367-383.
- Sykova E, Jendelova P (2007b) Migration, fate and in vivo imaging of adult stem cells in the CNS. *Cell Death Differ* 14: 1336-1342.

- T -

- Tabor CW, Tabor H (1984) Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53: 749-790.
- Tadolini B (1988) Polyamine inhibition of lipoperoxidation. The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipid polar heads. *Biochem J* 249: 33-36.
- Takahashi H, Matsumoto H, Kumon Y, Ohnishi T, Freeman C, Imai Y, Tanaka J (2007) Expression of heparanase in nestin-positive reactive astrocytes in ischemic lesions of rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett* 417: 250-254.

- Takahashi M, Saito H, Okuyama T, Miyashita T, Kosuga M, Sumisa F, Yamada M, Ebinuma H, Ishii H (1999) Overexpression of Bcl-2 protects human hepatoma cells from Fas-antibody-mediated apoptosis. *J Hepatol* 31: 315-322.
- Tan AM, Zhang W, Levine JM (2005) NG2: a component of the glial scar that inhibits axon growth. *J Anat* 207: 717-725.
- Tanaka H, Yamashita T, Yachi K, Fujiwara T, Yoshikawa H, Tohyama M (2004) Cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) enhances axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury in rats. *Neuroscience* 127: 155-164.
- Tang S, Qiu J, Nikulina E, Filbin MT (2001) Soluble myelin-associated glycoprotein released from damaged white matter inhibits axonal regeneration. *Mol Cell Neurosci* 18: 259-269.
- Tardieu M, Gamby C, Avramoglou T, Jozefonvicz J, Barritault D (1992) Derivatized dextrans mimic heparin as stabilizers, potentiators, and protectors of acidic or basic FGF. *J Cell Physiol* 150: 194-203.
- Tardieu M, Slaoui F, Josefonvicz J, Courty J, Gamby C, Barritault D (1989) Biological and binding studies of acidic fibroblast growth factor in the presence of substituted dextran. *J Biomater Sci Polym Ed* 1: 63-70.
- Tate MC, Shear DA, Hoffman SW, Stein DG, LaPlaca MC (2001) Biocompatibility of methylcellulose-based constructs designed for intracerebral gelation following experimental traumatic brain injury. *Biomaterials* 22: 1113-1123.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274: 1123-1133.
- Tetzlaff W, Kobayashi NR, Giehl KM, Tsui BJ, Cassar SL, Bedard AM (1994) Response of rubrospinal and corticospinal neurons to injury and neurotrophins. *Prog Brain Res* 103: 271-286.
- Thoenen H, Barde YA, Davies AM, Johnson JE (1987) Neurotrophic factors and neuronal death. *Ciba Found Symp* 126: 82-95.
- Tian DS, Dong Q, Pan DJ, He Y, Yu ZY, Xie MJ, Wang W (2007) Attenuation of astrogliosis by suppressing of microglial proliferation with the cell cycle inhibitor olomoucine in rat spinal cord injury model. *Brain Res* 1154: 206-214.
- Tian WM, Zhang CL, Hou SP, Yu X, Cui FZ, Xu QY, Sheng SL, Cui H, Li HD (2005) Hyaluronic acid hydrogel as Nogo-66 receptor antibody delivery system for the repairing of injured rat brain: in vitro. *J Control Release* 102: 13-22.
- Tolman EC (1948) Cognitive maps in rats and men. *Psychol Rev* 55: 189-208.
- Tong M, Zbinden MM, Hekking IJ, Vermeij M, Barritault D, van Neck JW (2008) RGTA OTR 4120, a heparan sulfate proteoglycan mimetic, increases wound breaking strength and vasodilatory capability in healing rat full-thickness excisional wounds. *Wound Repair Regen* 16: 294-299.
- Toth Z, Hollrigel GS, Gorcs T, Soltesz I (1997) Instantaneous perturbation of dentate interneuronal networks by a pressure wave-transient delivered to the neocortex. *J Neurosci* 17: 8106-8117.
- Touzani O, Boutin H, LeFeuvre R, Parker L, Miller A, Luheshi G, Rothwell N (2002) Interleukin-1 influences ischemic brain damage in the mouse independently of the interleukin-1 type I receptor. *J Neurosci* 22: 38-43.
- Trapp BD (1990) Myelin-associated glycoprotein. Location and potential functions. *Ann N Y Acad Sci* 605: 29-43.

Tsai SY, Markus TM, Andrews EM, Cheatwood JL, Emerick AJ, Mir AK, Schwab ME, Kartje GL (2007) Intrathecal treatment with anti-Nogo-A antibody improves functional recovery in adult rats after stroke. *Exp Brain Res* 182: 261-266.

Tsang VL, Bhatia SN (2004) Three-dimensional tissue fabrication. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 1635-1647.

- U -

Ughrin YM, Chen ZJ, Levine JM (2003) Multiple regions of the NG2 proteoglycan inhibit neurite growth and induce growth cone collapse. *J Neurosci* 23: 175-186.

Urdzikova L, Jendelova P, Glogarova K, Burian M, Hajek M, Sykova E (2006) Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 23: 1379-1391.

Urushitani M, Nakamizo T, Inoue R, Sawada H, Kihara T, Honda K, Akaike A, Shimohama S (2001) N-methyl-D-aspartate receptor-mediated mitochondrial Ca(2+) overload in acute excitotoxic motor neuron death: a mechanism distinct from chronic neurotoxicity after Ca(2+) influx. *J Neurosci Res* 63: 377-387.

- V -

Vaday GG, Lider O (2000) Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. *J Leukoc Biol* 67: 149-159.

Vallée F (2009) Synthèse et caractérisation d'un hydrogel d'alginate pour la régénération de voies nerveuses lésées au sein du Système Nerveux Central chez le Rat. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine en Génie des Procédés, Soutenue le 20 décembre 2007, Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques, Nancy.

Vallee F, Muller C, Durand A, Schimchowitsch S, Dellacherie E, Kelche C, Cassel JC, Leonard M (2009) Synthesis and rheological properties of hydrogels based on amphiphilic alginate-amide derivatives. *Carbohydr Res* 344: 223-228.

Van der Worp HB, Thomas CE, Kappelle LJ, Hoffman WP, de Wildt DJ, Bar PR (1999) Inhibition of iron-dependent and ischemia-induced brain damage by the alpha-tocopherol analogue MDL 74,722. *Exp Neurol* 155: 103-108.

Vartanian T, Li Y, Zhao M, Stefansson K (1995) Interferon-gamma-induced oligodendrocyte cell death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol Med* 1: 732-743.

Vasita R, Katti DS (2006) Growth factor-delivery systems for tissue engineering: a materials perspective. *Expert Rev Med Devices* 3: 29-47.

Vavrek R, Girgis J, Tetzlaff W, Hiebert GW, Fouad K (2006) BDNF promotes connections of corticospinal neurons onto spared descending interneurons in spinal cord injured rats. *Brain* 129: 1534-1545.

Verweij BH, Muizelaar JP, Vinas FC, Peterson PL, Xiong Y, Lee CP (2000) Impaired cerebral mitochondrial function after traumatic brain injury in humans. *J Neurosurg* 93: 815-820.

Viktorov IV (2000) [The role of nitric oxide and other free radicals in ischemic brain pathology]. *Vestn Ross Akad Med Nauk* 5-10.

- W -

- Wada A, Yokoo H, Yanagita T, Kobayashi H (2005) Lithium: potential therapeutics against acute brain injuries and chronic neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Sci* 99: 307-321.
- Wada K, Chatzipanteli K, Kraydieh S, Busto R, Dietrich WD (1998) Inducible nitric oxide synthase expression after traumatic brain injury and neuroprotection with aminoguanidine treatment in rats. *Neurosurgery* 43: 1427-1436.
- Walmsley AR, Mir AK, Frentzel S (2005) Ectodomain shedding of human Nogo-66 receptor homologue-1 by zinc metalloproteinases. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 112-116.
- Walter L, Stella N (2004) Cannabinoids and neuroinflammation. *Br J Pharmacol* 141: 775-785.
- Wang D, Sai J, Richmond A (2003) Cell surface heparan sulfate participates in CXCL1-induced signaling. *Biochemistry* 42: 1071-1077.
- Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z (2002a) P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 420: 74-78.
- Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, He Z (2002b) Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 417: 941-944.
- Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ (1987) The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 924: 408-419.
- Webster NJ, Pirrung MC (2008) Small molecule activators of the Trk receptors for neuroprotection. *BMC Neurosci* 9 Suppl 2: S1.
- Weiner I, Gal G, Rawlins JNP, Feldon J (1996) Differential involvement of the shell and core subterritories of the nucleus accumbens in latent inhibition and amphetamine-induced activity. *Behav Brain Res* 81: 123-133: 6.
- Weinmann O, Schnell L, Ghosh A, Montani L, Wiessner C, Wannier T, Rouiller E, Mir A, Schwab ME (2006) Intrathecally infused antibodies against Nogo-A penetrate the CNS and downregulate the endogenous neurite growth inhibitor Nogo-A. *Mol Cell Neurosci* 32: 161-173.
- Werth JL, Thayer SA (1994) Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 14: 348-356.
- West JL, Hubbell JA (1997) Bioactive polymers: Synthetic biodegradable polymer scaffolds. Birkhäuser, Boston 83-95.
- Whishaw IQ, Maaswinkel H (1998) Rats with fimbria-fornix lesions are impaired in path integration: a role for the hippocampus in "sense of direction". *J Neurosci* 18: 3050-3058.
- Whishaw IQ, Mittleman G (1991) Hippocampal modulation of nucleus accumbens: behavioral evidence from amphetamine-induced activity profiles. *Behav Neural Biol* 55: 289-306.
- Whishaw IQ, Tomie JA (1997) Perseveration on place reversals in spatial swimming pool tasks: further evidence for place learning in hippocampal rats. *Hippocampus* 7: 361-370.
- Whishaw IQ, Zaborowski JA, Kolb B (1984) Postsurgical enrichment aids adult hemidecorticate rats on a spatial navigation task. *Behav Neural Biol* 42: 183-190.
- White RJ, Reynolds IJ (1996) Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *J Neurosci* 16: 5688-5697.
- White RJ, Reynolds IJ (1997) Mitochondria accumulate Ca²⁺ following intense glutamate stimulation of cultured rat forebrain neurones. *J Physiol* 498 (Pt 1): 31-47.

- Wilcox BJ, Applegate MD, Portera-Cailliau C, Koliatsos VE (1995) Nerve growth factor prevents apoptotic cell death in injured central cholinergic neurons. *J Comp Neurol* 359: 573-585.
- Wilkinson LS, Mittleman G, Torres E, Humby T, Hall FS, Robbins TW (1993) Enhancement of amphetamine-induced locomotor activity and dopamine release in nucleus accumbens following excitotoxic lesions of the hippocampus. *Behav Brain Res* 55: 143-150.
- Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR (2004) Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). *Prog Neurobiol* 72: 167-182.
- Will B, Hefti F (1985) Behavioural and neurochemical effects of chronic intraventricular injections of nerve growth factor in adult rats with fimbria lesions. *Behav Brain Res* 17: 17-24.
- Will BE, Rosenzweig MR, Bennett EL (1976) Effects of differential environments on recovery from neonatal brain lesions, measured by problem-solving scores and brain dimensions. *Physiol Behav* 16: 603-611.
- Williams K (1997) Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J* 325 (Pt 2): 289-297.
- Williams LR (1991) Hypophagia is induced by intracerebroventricular administration of nerve growth factor. *Exp Neurol* 113: 31-37.
- Winer B (1971) *Statistical principles in experimental design*. McGraw-Hill, New York.
- Wintergerst ES, Fuss B, Bartsch U (1993) Localization of janusin mRNA in the central nervous system of the developing and adult mouse. *Eur J Neurosci* 5: 299-310.
- Wintzer M, Mladinic M, Lazarevic D, Casseler C, Cattaneo A, Nicholls J (2004) Strategies for identifying genes that play a role in spinal cord regeneration. *J Anat* 204: 3-11.
- Witter MP, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH, Lohman AH (1989) Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog Neurobiol* 33: 161-253.
- Woerly S, Doan VD, Evans-Martin F, Paramore CG, Peduzzi JD (2001) Spinal cord reconstruction using NeuroGel implants and functional recovery after chronic injury. *J Neurosci Res* 66: 1187-1197.
- Woerly S, Marchand R, Lavalley C (1990) Intracerebral implantation of synthetic polymer/biopolymer matrix: a new perspective for brain repair. *Biomaterials* 11: 97-107.
- Woerly S, Petrov P, Sykova E, Roitbak T, Simonova Z, Harvey AR (1999) Neural tissue formation within porous hydrogels implanted in brain and spinal cord lesions: ultrastructural, immunohistochemical, and diffusion studies. *Tissue Eng* 5: 467-488.
- Wolff DJ, Lubeskie A (1995) Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. *Arch Biochem Biophys* 316: 290-301.
- Wolff J (1998) Promotion of microtubule assembly by oligocations: cooperativity between charged groups. *Biochemistry* 37: 10722-10729.
- Wu C, Cui B, He L, Chen L, Mobley WC (2009) The coming of age of axonal neurotrophin signaling endosomes. *J Proteomics* 72: 46-55.
- Wu KL, Hsu C, Chan JY (2007) Impairment of the mitochondrial respiratory enzyme activity triggers sequential activation of apoptosis-inducing factor-dependent and caspase-dependent signaling pathways to induce apoptosis after spinal cord injury. *J Neurochem* 101: 1552-1566.

- X -

Xie F, Zheng B (2008) White matter inhibitors in CNS axon regeneration failure. *Exp Neurol* 209: 302-312.

Xu XH, Zhang HL, Han R, Gu ZL, Qin ZH (2006) Enhancement of neuroprotection and heat shock protein induction by combined prostaglandin A1 and lithium in rodent models of focal ischemia. *Brain Res* 1102: 154-162.

Xu XM, Guenard V, Kleitman N, Aebischer P, Bunge MB (1995a) A combination of BDNF and NT-3 promotes supraspinal axonal regeneration into Schwann cell grafts in adult rat thoracic spinal cord. *Exp Neurol* 134: 261-272.

Xu XM, Guenard V, Kleitman N, Bunge MB (1995b) Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. *J Comp Neurol* 351: 145-160.

- Y -

Yamaguchi T, Sano K, Takakura K, Saito I, Shinohara Y, Asano T, Yasuhara H (1998) Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. Ebselen Study Group. *Stroke* 29: 12-17.

Yamaguchi Y (2001) Heparan sulfate proteoglycans in the nervous system: their diverse roles in neurogenesis, axon guidance, and synaptogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 12: 99-106.

Yamashita T, Tohyama M (2003) The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* 6: 461-467.

Yamauchi H, Desgranges P, Lecerf L, Papy-Garcia D, Tournaire MC, Moczar M, Loisanse D, Barritault D (2000) New agents for the treatment of infarcted myocardium. *FASEB J* 14: 2133-2134.

Yao M, Nguyen TV, Pike CJ (2007) Estrogen regulates Bcl-w and Bim expression: role in protection against beta-amyloid peptide-induced neuronal death. *J Neurosci* 27: 1422-1433.

Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM (1991) Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64: 841-848.

Yildiz G, Demiryurek AT, Sahin-Erdemli I, Kanzik I (1998) Comparison of antioxidant activities of aminoguanidine, methylguanidine and guanidine by luminol-enhanced chemiluminescence. *Br J Pharmacol* 124: 905-910.

Yin Y, Cui Q, Li Y, Irwin N, Fischer D, Harvey AR, Benowitz LI (2003) Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. *J Neurosci* 23: 2284-2293.

Yin Y, Henzl MT, Lorber B, Nakazawa T, Thomas TT, Jiang F, Langer R, Benowitz LI (2006) Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells. *Nat Neurosci* 9: 843-852.

Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR (2001) Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2: 502-511.

Yu P, Huang L, Zou J, Yu Z, Wang Y, Wang X, Xu L, Liu X, Xu XM, Lu PH (2008) Immunization with recombinant Nogo-66 receptor (NgR) promotes axonal regeneration and recovery of function after spinal cord injury in rats. *Neurobiol Dis* 32: 535-542.

Yu P, Huang L, Zou J, Zhu H, Wang X, Yu Z, Xu XM, Lu PH (2007) DNA vaccine against NgR promotes functional recovery after spinal cord injury in adult rats. *Brain Res* 1147: 66-76.

Yu TT, Shoichet MS (2005) Guided cell adhesion and outgrowth in peptide-modified channels for neural tissue engineering. *Biomaterials* 26: 1507-1514.

Yu Z, Li W, Hillman J, Brunk UT (2004) Human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells are highly sensitive to the lysosomotropic aldehyde 3-aminopropanal. *Brain Res* 1016: 163-169.

Yu ZF, Bruce-Keller AJ, Goodman Y, Mattson MP (1998) Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo. *J Neurosci Res* 53: 613-625.

Yuan J, Lipinski M, Degtarev A (2003) Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron* 40: 401-413.

- Z -

Z'Graggen WJ, Metz GA, Kartje GL, Thallmair M, Schwab ME (1998) Functional recovery and enhanced corticofugal plasticity after unilateral pyramidal tract lesion and blockade of myelin-associated neurite growth inhibitors in adult rats. *J Neurosci* 18: 4744-4757.

Zakine G, Martinod E, Fornes P, Sapoval M, Barritault D, Carpentier AF, Chachques JC (2003) Growth factors improve latissimus dorsi muscle vascularization and trophicity after cardiomyoplasty. *Ann Thorac Surg* 75: 549-554.

Zauner A, Daugherty WP, Bullock MR, Warner DS (2002) Brain oxygenation and energy metabolism: part I-biological function and pathophysiology. *Neurosurgery* 51: 289-301.

Zhang F, Casey RM, Ross ME, Iadecola C (1996) Aminoguanidine ameliorates and L-arginine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 27: 317-323.

Zhang M, Wang H, Tracey KJ (2000) Regulation of macrophage activation and inflammation by spermine: a new chapter in an old story. *Crit Care Med* 28: N60-N66.

Zhang ZG, Tsang W, Zhang L, Powers C, Chopp M (2001) Up-regulation of neuropilin-1 in neovasculature after focal cerebral ischemia in the adult rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 541-549.

Zhao Z, Sun P, Chauhan N, Kaur J, Hill MD, Papadakis M, Buchan AM (2006) Neuroprotection and neurogenesis: modulation of cornu ammonis 1 neuronal survival after transient forebrain ischemia by prior fimbria-fornix deafferentation. *Neuroscience* 140: 219-226.

Zhu Y, Yang GY, Ahlemeyer B, Pang L, Che XM, Culmsee C, Klumpp S, Kriegstein J (2002) Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage. *J Neurosci* 22: 3898-3909.

Zimmer J (1971) Ipsilateral afferents to the commissural zone of the fascia dentata, demonstrated in decommissurated rats by silver impregnation. *J Comp Neurol* 142: 393-416.

Zimmerman GA, Meistrell M, III, Bloom O, Cockcroft KM, Bianchi M, Risucci D, Broome J, Farmer P, Cerami A, Vlassara H, . (1995) Neurotoxicity of advanced glycation endproducts during focal stroke and neuroprotective effects of aminoguanidine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3744-3748.

Zimowska M, Szczepankowska D, Streminska W, Papy D, Tournaire MC, Gautron J, Barritault D, Moraczewski J, Martelly I (2001) Heparan sulfate mimetics modulate calpain activity during rat Soleus muscle regeneration. *J Cell Physiol* 188: 178-187.

Zoratti M, Szabo I (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241: 139-176.

Zuijndendorp HM, Smit X, Blok JH, Caruelle JP, Barritault D, Hovius SE, van Neck JW (2008) Significant reduction in neural adhesions after administration of the regenerating agent OTR4120, a synthetic glycosaminoglycan mimetic, after peripheral nerve injury in rats. *J Neurosurg* 109: 967-973.

Zuo J, Ferguson TA, Hernandez YJ, Stetler-Stevenson WG, Muir D (1998a) Neuronal matrix metalloproteinase-2 degrades and inactivates a neurite-inhibiting chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci* 18: 5203-5211.

Zuo J, Neubauer D, Dyess K, Ferguson TA, Muir D (1998b) Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite-promoting potential of spinal cord tissue. *Exp Neurol* 154: 654-662.

Résumé

Les atteintes cérébrales chez les mammifères adultes ont longtemps été considérées comme irréversibles. On sait la régénération au sein du SNC est cependant possible à condition de fournir aux neurones un environnement propice à l'expression de leur potentiel de plasticité, ce qui ouvre des perspectives thérapeutiques inespérées.

Ce travail de thèse, s'appuyant sur un modèle de lésion par aspiration des voies septo-hippocampiques dorsales chez le Rat, s'est focalisé sur la promotion des processus de régénération à l'aide de nouveaux traitements, utilisés seuls ou en combinaison.

Les résultats ont permis de mettre en évidence les effets bénéfiques, sur les plans fonctionnel et structurel, d'un traitement à large spectre d'action combinant une polyamine, la Putrescine, et un agent anti-inflammatoire réduisant la dégradation de cette dernière, l'Aminoguanidine. Associé avec l'implantation d'un biomatériau comme pont de régénération dans la cavité lésionnelle, et renforcé par des traitements (enrichissement des conditions d'élevage et/ou administration d'agents synthétiques de régénération) ciblant la biodisponibilité des facteurs neurotrophiques endogènes, ce traitement a permis de réduire certains déficits comportementaux en favorisant la plasticité neuronale. Cependant, ces résultats très encourageants ont été limités par la dégradation trop rapide des biomatériaux implantés, empêchant les fibres nerveuses de reconnecter leur cible.

Au vu de la complexité des mécanismes mis en jeu dans le cerveau, l'optimisation de traitements complémentaires et synergiques apparaît indispensable pour contrer les divers obstacles s'opposant à la reconstruction de voies nerveuses lésées.

Summary

Damage to the adult mammal brain has been considered to be irreversible for a long time. We know now that regeneration can occur in the CNS, provided a permissive environment is furnished to neural cells to stimulate their inherent growth capacity. This introduces new regaining brain damage therapeutic opportunities.

Based on an aspirative lesion of the Rat dorsal septo-hippocampal pathways, the current thesis tried to promote CNS regeneration processes by testing individually or in combination several new treatments.

The results highlight the functional and structural beneficial effects of a wide-range treatment consisting of a polyamine, the putrescine, combined with an anti-inflammatory agent, the aminoguanidine, which also reduces the polyamine degradation in to toxic metabolites. In association with a biomaterial implanted as a recovery bridge in the lesion cavity, and reinforced by others treatments targeting the bioavailability of endogenous neurotrophic factors (enriched housing and/or administration of synthetic regenerating agents), this treatment reduced some of the lesion induced behavioral deficits by improving neuronal plasticity. However, these encouraging results have been limited by the too rapid degradation of the biomaterial, preventing the neural fibers from reaching and reconnecting the target structure.

Given the complex intricate mechanisms involved in brain regenerative processes, the optimization of complementary and synergistic treatments appears to be essential to overcome the various obstacles opposed to the reconstruction of lesioned neural pathways.