

Restauration de l'acétylation de l'histone H3 après un traumatisme crânien :  
effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires

Rhinn H<sup>1</sup>, Escriou V<sup>1</sup>, Scherman D<sup>1</sup>, Plotkine M<sup>2</sup>, Marchand-Leroux M<sup>2</sup> et Besson VC<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Inserm U640, CNRS, UMR8151, Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Pharmacologie Chimique et Génétique, 4 avenue de l'Observatoire, F-75006 Paris, France; Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Paris, F-75005 France

<sup>2</sup> Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Pharmacologie de la Circulation Cérébrale, EA 2510, 4, avenue de l'Observatoire, F-75006 Paris, France

**BACKGROUND:** traumatic brain injury (TBI) leads to a deleterious neuroinflammation. As many inflammatory mediators are regulated at the transcriptional level, a pleiotropic action on their transcription may afford a massive anti-inflammatory effect. Histone deacetylases (HDAC) are a family of enzymes removing acetyl groups from histones and nuclear components such as transcription factors, which make them regulators of the transcription. Recently, valproic acid (VPA), a well-known drug used for the treatment of seizures and bipolar mood disorders, was reported to inhibit HDAC causing hyperacetylation.

**OBJECTIVE:** we studied the effects of VPA in a closed head injury model.

**METHODS:** anaesthetized male Swiss mice were submitted to TBI using a weigh-drop device. Mice were given VPA (300 mg/kg) or its vehicle i.p. 5 min after TBI as this dose inhibits HDAC activity evidenced by an increased staining of acetylated H3 histone. The neurological deficit was assessed by grip score measuring the length of time (in seconds) that mice remained on the string for a maximum of 30 s. In addition, during these 30-second period, the string test, scoring from 0 (severely impaired) to 5 (normal), evaluated the way mice could hang and move on the string. Cerebral oedema was determined by measuring brain water content (BWC) using the wet weight-dry weight technique. Levels of mRNA of 5 inflammatory mediators (interleukin-1 $\beta$ , chemokine receptor CCR2, MMP9 and 12, P-selectin) and the one of the chaperone protein HSP70 were quantified by qRT-PCR.

**RESULTS:** at 24 h post-TBI, the grip and string scores were decreased in vehicle-treated mice (grip: 19.4 $\pm$ 3.0s vs 30 $\pm$ 0.0s for uninjured,  $P$ <0.01; string: 1.0 $\pm$ 0.3 vs 5.0 $\pm$ 0.0 for uninjured,  $P$ <0.001) showing a neurological deficit. VPA-treated mice showed an improved grip (25.7 $\pm$ 2.0s,  $P$ <0.05) and string (2.5 $\pm$ 0.5,  $P$ <0.05) scores after TBI, demonstrating a neurological recovery. TBI induced a decrease in H3 acetylation staining which is restored by VPA treatment. TBI increased the BWC (80.2 $\pm$ 0.2% vs 79.6 $\pm$ 0.1% for uninjured,  $P$ <0.05) showing cerebral oedema. VPA reduced the oedema (79.7 $\pm$ 0.2%,  $P$ <0.05). mRNA levels encoding for IL-1 $\beta$ , CCR2, MMP9 and 12, P-selectin induced after TBI were decreased by VPA treatment ( $P$ <0.001). Moreover, VPA increased levels of mRNA of HSP70 ( $P$ <0.01).

**CONCLUSION:** our data show that VPA promotes neurological recovery and anti-oedematous effects after TBI. Beneficial effects induced by VPA are associated, at least in part, with inhibition of HDAC, induction of HSP70 and mRNA decrease of 5 inflammatory mediators.

## **Cerebrovascular dysfunction and microcirculation rarefaction precede white matter lesions in a mouse model of CADASIL \***

Anne JOUTEL, Marie MONET-LEPRETRE, Claudia GOSELE, Céline BARON-MENGUY, Annette HAMMES, Sabine SCHMIDT, Barbara LEMAIRE-CARETTE, Valérie DOMENGA, Andreas SCHEDL, Pierre LACOMBE, Norbert HUBNER.

INSERM UMRS-740, Université Paris7-Diderot, 75010 Paris, France  
Max-Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin, Allemagne

\* sous presse dans J. Clin. Invest.

Cerebral ischemic small-vessel disease (SVD) is the leading cause of vascular dementia and a major contributor to stroke in humans. Dominant mutations in *NOTCH3* cause CADASIL, a genetic archetype of cerebral ischemic SVD. Progress toward understanding the pathogenesis of these diseases and developing effective therapies has been hampered by the lack of a relevant animal model.

Here we report the introduction of a CADASIL-causing *Notch3* point mutation into a large P1-derived artificial chromosome (PAC). *In vivo* expression of the mutated PAC transgene in the mouse reproduced the endogenous *Notch3* expression pattern and main pathological features of the disease including *Notch3*ECD aggregates and granular osmiophilic material (GOM) deposits in brain vessels, progressive white matter damage and reduced cerebral blood flow. Mutant mice displayed attenuated myogenic responses and reduced caliber of brain arteries as well as impaired cerebrovascular autoregulation and functional hyperemia. Further, we identified a significant reduction of white matter capillary density. Remarkably, neuropathological changes occur in the absence of histologically detectable alterations of the structure of cerebral arteries and blood-brain barrier breakdown.

These studies provide *in vivo* evidence for cerebrovascular dysfunction and microcirculatory failure as key contributors to hypoperfusion and white matter damage in this genetic model of ischemic SVD.

## Minocycline et neuroprotection dans le Traumatisme Crânien: Un rôle potentiel du neuroprotecteur endogène sAPP $\alpha$

Siopi E, Homs S, Croci N, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M

Laboratoire de Pharmacologie de la Circulation Cérébrale (EA 2510), Université Paris Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, France

**Introduction:** Cerebral inflammation and apoptotic cell death are two processes that largely contribute to the morbidity and mortality following traumatic brain injury (TBI). Strategies that inhibit these deleterious pathways can be potentially effective for TBI patients. Minocycline is known to exert neuroprotective, anti-inflammatory and anti-apoptotic properties in various models of TBI and neurodegenerative diseases (1-4). Yet, the precise mechanism of its neuroprotective effect still remains unclear. We have recently demonstrated that minocycline is able to significantly reduce focal lesion volume and locomotor hyperactivity in a TBI mouse model (5), and proposed to investigate whether these neuroprotective effects are linked to the restoration of an endogenous neuroprotector that is reduced post-traumatically, the soluble form  $\alpha$  of the amyloid precursor protein (sAPP $\alpha$ ). In fact, post-TBI administration of sAPP $\alpha$  has been shown to improve functional outcome and reduce neuronal loss (6). Here we show the effect of minocycline on sAPP $\alpha$  production, as well as on the activity of the enzymes involved, the  $\alpha$ -secretases, after experimental TBI in mice.

**Methods:** Closed-head injury was performed in anaesthetized mice (3). The cerebral concentration of sAPP $\alpha$  was measured using the *ELISA* method, while  $\alpha$ -secretase activity was measured by fluorimetry. According to the treatment protocol (3), minocycline was administered at 5 min following TBI (90 mg/kg, i.p.), then at 3h and 9h post-TBI (45 mg/kg, i.p.). Its effect on sAPP $\alpha$  production and on  $\alpha$ -secretase activity was evaluated at 24h post-TBI.

**Results:** TBI led to a significant decrease in sAPP $\alpha$  concentration ( $P < 0.05$ ) at 24h post-TBI that slightly attenuated for up to 72h, yet without reaching normal levels. The activity of  $\alpha$ -secretase was not substantially altered post-TBI. Treatment with minocycline significantly attenuated the post-traumatic decrease in sAPP $\alpha$  ( $P < 0.05$ ), while it did not exert any effect on  $\alpha$ -secretase activity.

**Conclusion:** Minocycline is able to attenuate the TBI-induced decrease of the neuroprotective sAPP $\alpha$ , without directly interfering with  $\alpha$ -secretase activity. These results reveal yet another beneficial effect of minocycline that could partly explain its neuroprotective action, yet more studies are needed in order to confirm this speculation and to further evaluate an additional therapeutic approach for TBI, the induction of the endogenous neuroprotector sAPP $\alpha$ .

1) Sanchez et al. *Neurosurgery*, 2001, 48: 1393-1401.

2) Bye et al. *Experimental Neurology*, 2006, 204: 220-233.

3) Homs S et al. *Brain Research*, 2009, 1291: 122-132.

4) Choi et al. *Neuropsychopharmacology*, 2007, 1-12.

5) Homs S et al. *J.Neurotrauma*, 2010 (submitted)

6) Thornton et al. *Brain Research*, 2006, 1094: 38-46.

# Analyse glycomique cérébrale chez un modèle murin d'épilepsie

BOISSONNET A.<sup>a,b</sup>, HEVOR T.<sup>a</sup>, LANDEMARRE L.<sup>b</sup> and CLOIX J.F.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Neurobiologie de l'université d'Orléans, rue de Chartres, BP6759, 45067 ORLEANS CEDEX 2

<sup>b</sup> GLYcoDiag, 520 rue de Chanteloup 45520 CHEVILLY

Les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la synchronisation de l'activité d'un certain nombre de neurones, de son démarrage et de son arrêt, sont encore mal connus. La contribution des astrocytes à l'activité neuronale est actuellement mieux comprise et constitue l'objet de nombreux travaux. L'étude des épilepsies humaines nécessite le développement de modèles expérimentaux. Parmi ceux-ci, l'induction de crises épileptiformes par la méthionine sulfoximine (MSO) présente l'avantage d'une induction, par l'agent épileptogène, de la production glycogénique, conduisant à son accumulation astrocytaire. Nous avons sélectionné deux lignées de souris sur la base du temps de latence à la MSO : latence élevée pour les MSO-Slow ou latence faible pour les MSO-Fast. Ces deux lignées diffèrent par un certain nombre de caractères, comme la variation de glycogène cérébral. Nous avons souhaité étudier l'expression glycanique au niveau cérébral pour ces deux lignées de souris par une approche originale. Pour ce faire, l'utilisation de lectines a été privilégiée, remplaçant ainsi l'étude des glycanes dans leur contexte biologique. Cette technique peut également être étendue à une étude *in vitro* de glycanes exprimés à la surface des cellules.

Les études sont menées sur des extraits protéiques de cerveaux de souris ou des cultures d'astrocytes. Cette analyse semi-quantitative, repose sur la reconnaissance d'échantillons biotinylés par une gamme de lectines fixées dans des microplaques. Un conjugué avidine-peroxydase permet de visualiser la réaction. Lorsqu'il s'agit de cellules, ces dernières sont préalablement marquées au carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) pour une révélation en fluorescence.

Les profils de glycosylation ont d'abord été réalisés sur des échantillons protéiques de cerveau pour déterminer les grands types de glycanes présents. Les profils, spécifiques et reproductibles, ont révélé la prédominance de la galactosylation et de la sialylation parmi les structures reconnues et l'absence de fucosylation. Pour trouver une éventuelle différence, les échantillons ont été déposés en dilution pour calculer l'EC<sub>50</sub> de l'interaction échantillon/lectine. A l'état basal, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence pour le mode d'extraction utilisé. L'effet de l'administration de MSO aux deux lignées de souris sélectionnées est en cours. Pour mieux étudier les glycoconjugués membranaires, des astrocytes vivants, issus de cultures cellulaires primaires, sont déposés sur lectines afin d'obtenir un profil d'interaction. Outre les caractéristiques observées liées aux glycolipides comme les structures GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc ou les acides sialiques liés en  $\alpha$ 2-3, le fort taux de galactosylation et l'absence de fucosylation sont retrouvés par rapport aux extraits protéiques. En revanche, la présence d'acides sialiques liés en  $\alpha$ 2-6 n'est pas détectée à la surface des cellules. L'effet de la MSO est également en cours sur ces cultures d'astrocytes.

Même si aucune différence significative n'a été relevée, l'obtention de résultats spécifiques et reproductibles a permis de montrer l'intérêt de cette approche pour la caractérisation d'échantillons ou de lignées cellulaires. Cette méthodologie originale permettra l'étude des profils de glycosylation différentielle des deux lignées sélectionnées, et ouvrira la possibilité de définir la présence d'un marqueur cellulaire de réponse à la MSO pour ces deux lignées.

## **Régulation du transporteur de monocarboxylate MCT4 par le NO (Nitric Oxyde) dans les astrocytes.**

**Fabrice Marcillac, Cendrine Repond & Luc Pellerin**

Département de Physiologie, Université de Lausanne, Suisse

La protéine transmembranaire MCT4 fait partie de la famille des transporteurs de monocarboxylates. Elle est exprimée dans différents tissus comme le muscle, la peau et la rétine de l'œil. Dans le cerveau, MCT4 est exprimé au niveau des astrocytes (qui exprime aussi MCT1) mais uniquement *in vivo*. En culture primaire d'astrocytes, seul MCT1 est exprimé, suggérant que l'expression de MCT4 serait régulée par un signal neuronal. Nous avons étudié le rôle régulateur que pourrait avoir le NO sur l'expression de l'ARN messager ainsi que de la protéine MCT4 en culture primaire d'astrocytes corticaux de souris. Bien que l'expression de MCT1 ne soit pas modifiée par le DETA-NONOate (donneur de NO), ce dernier induit une forte augmentation de l'expression de MCT4 aussi bien au niveau transcriptionnel qu'au niveau traductionnel. D'autres cibles sont ainsi up-régulées comme la LDH-A (mais pas la LDH-B) et surtout HIF1alpha qui est connu pour être stabilisé par le NO. L'effet du NO sur l'expression de MCT4 est aboli si l'on transfecte préalablement les astrocytes avec un siRNA dirigé contre HIF1alpha. Par ailleurs, l'effet fonctionnel du NO sur les astrocytes se traduit par une augmentation du transport de lactate. Ces résultats suggèrent que la production et la libération de lactate par les astrocytes pourraient être contrôlées par un signal neuronal comme le NO via HIF1alpha.

## **La co-administration intra-veineuse de progéniteurs de cellules endothéliales (EPC) et de cellules musculaires lisses (SMPC), issus de sang de cordon ombilical humain, potentialise la réponse angiogénique post-ischémique dans un modèle murin d'ischémie cérébrale focale.**

Lina Ratiba Nih<sup>1</sup>, Nicolas Deroide<sup>1</sup>, Carole Déan<sup>2</sup>, Dominique Lerouet<sup>3</sup>, Isabelle Margail<sup>3</sup>, Marc Pocard<sup>1</sup>, Nathalie Kubis<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Unité INSERM 965, <sup>2</sup>Institut Vaisseaux Sang, APHP Hôpital Lariboisière, Paris 7.

<sup>3</sup>EA 2510, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes.

Après un accident vasculaire cérébral ischémique, l'angiogénèse joue un rôle majeur dans la récupération, en particulier en favorisant la neurogénèse endogène. Or, la formation d'un réseau vasculaire dépend de la coopération entre cellules endothéliales et cellules musculaires lisses. Cette stabilisation du vaisseau nouvellement formé est majeure dans l'ischémie cérébrale car l'absence de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique entretient l'œdème et l'excitotoxicité des cellules cérébrales.

Nous avons donc émis l'hypothèse que l'administration combinée d'EPC et de SMPC pourrait limiter les conséquences de l'ischémie cérébrale chez la souris. Ces progéniteurs ont été isolés et prédifférenciés en culture à partir de cellules humaines du sang de cordon ombilical, à l'Institut Vaisseaux Sang de l'Hôpital Lariboisière.

L'ischémie cérébrale était réalisée chez des souris mâles adultes C57Bl6, par thermocoagulation de l'artère cérébrale moyenne. L'injection intraveineuse de cellules SMPC ( $0.5 \times 10^6$ ), EPC ( $0.5 \times 10^6$ ), SMPC+EPC ( $0.25 \times 10^6 + 0.25 \times 10^6$ ) ou bien de PBS (groupe contrôle) a été réalisée 24h après (n=6-8/groupe). La prolifération cellulaire a été évaluée par injection de BrdU (100 mg/kg, i.p.) 4 et 2h avant le sacrifice à J7. Le volume de l'infarctus a été calculé par histomorphométrie sur coupes colorées au Crésyl Violet, la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) quantifiée par extravasation de Bleu Evans, la surface vasculaire, la prolifération cellulaire et le phénotype de ces cellules déterminés dans les régions ischémique et péri-ischémique par double immuno-marquage.

A J7, la surface vasculaire dans l'infarctus était significativement augmentée [ $17.3-19.4\% \pm 3.6-8\%$ ] dans tous les groupes traités ( $p < 0.05$ ), mais seules les souris EPC+-SMPC+ présentaient un réseau vasculaire mature, organisé et riche. L'angiogénèse (co-expression de BrdU-CD31 par région d'intérêt) était significativement augmentée dans tous les groupes, mais surtout pour les souris EPC+ et EPC+-SMPC+ :  $14.7 \pm 1.2$  (contrôles),  $22.7 \pm 1.5$  (SMPC),  $33.3 \pm 3.2$  (EPC) et  $35.0 \pm 1.4$  (EPC+-SMPC+) ( $p < 0.002$ ). De plus, les souris EPC+-SMPC+ présentaient 3 fois plus de cellules en prolifération par rapport aux 3 autres groupes traités ( $p < 0.002$ ) au pourtour de l'infarctus, certaines de ces cellules co-exprimant le marqueur GFAP, marqueur protéique précoce de progéniteurs neuronaux endogènes. A J7, ni le volume de l'infarctus, ni la perméabilité de la BHE n'étaient cependant réduite.

En conclusion, la co-administration de progéniteurs vasculaires endothéliaux et de muscle lisse issus de sang de cordon ombilical humain potentialise la réponse angiogénique post-ischémique dans un modèle murin d'ischémie cérébrale focale, au 7ème jour après l'ischémie. L'augmentation de la surface vasculaire au pourtour de l'infarctus s'accompagne également d'un intense remodelage vasculaire ainsi que d'une prolifération cellulaire massive dans l'hémisphère ipsilatéral.

L'hypothèse d'un effet pro-neurogénique de ces progéniteurs, ainsi que celui d'une amélioration du déficit neurologique est en cours d'étude.

## **Titre**

L'absence de MFG-E8 majore l'infarctus, l'apoptose et la réponse inflammatoire dans un modèle murin d'ischémie cérébrale focale.

## **Auteurs**

Nicolas Deroide<sup>1,2</sup>, Lina Ratiba Nih<sup>1</sup>, José Vilar<sup>3</sup>, Dominique Lerouet<sup>5</sup>, Isabelle Margail Bernard Lévy<sup>2,3,4</sup>, Marc Pocard<sup>1</sup>, Ziad Mallat<sup>3</sup>, Nathalie Kubis<sup>1,2</sup>

1. INSERM U965 ; 2. Service de Physiologie, Hôpital Lariboisière ; 3. INSERM U970, HEGP ; 4. Institut des Vaisseaux et du Sang, Hôpital Lariboisière ; 5. EA 2510

## **Résumé**

MFG-E8 est une protéine impliquée dans la phagocytose des cellules apoptotiques qui lie la phosphatidyl sérine des cellules apoptotiques aux intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  des macrophages. Cette phagocytose change le profil d'expression de cytokines du macrophage (diminution de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL10 et de TNF- $\alpha$  et augmentation de TGF- $\beta$ ). MFG-E8 a aussi une action pro-angiogénique par une voie VEGF-dépendante. Nous avons étudié le rôle de MFG-E8 dans un modèle d'ischémie cérébrale permanente focale chez la souris MFG-E8 knock-out en termes d'infarctus, de réponse inflammatoire, apoptotique et angiogénique.

Les souris MFG-E8  $-/-$  présentent à J7 un infarctus plus volumineux ( $17,5 \pm 2,8$  vs  $12,6 \pm 2,4$  mm<sup>3</sup>,  $p < 0,005$ ,  $n=8$ ). La réaction inflammatoire microgliale est majorée ( $54,8 \pm 11,2$  vs  $40,2 \pm 9,8$  cellules Iba1+/ROI,  $p < 0,05$ ,  $n=7$ ) et le nombre de cellules apoptotiques TUNEL + est augmenté chez les souris MFG-E8  $-/-$  ( $68,1 \pm 14,6$  vs  $44,1 \pm 17,9$  cellules TUNEL+/ROI,  $p < 0,05$ ,  $n=7$ ). L'étude du profil d'expression des cytokines par RT-Q-PCR montre un profil pro-inflammatoire avec augmentation de l'IL-1 $\beta$  ( $p < 0,001$ ,  $n=6$ ), du TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ) et diminution du TGF- $\beta$  ( $p < 0,05$ ) chez les souris MFG-E8  $-/-$ . L'expression d'IL10 n'est pas modifiée. Il existe une discrète diminution de la surface vasculaire au niveau de la zone jonctionnelle chez les souris MFG-E8  $-/-$  ( $16,5 \pm 1,4$  vs  $18,1 \pm 0,8$  %,  $p < 0,05$ ,  $n=5$ ) mais sans modification de l'angiogenèse mesurée par un double immunohistomarquage BrdU/CD31.

Les souris MFG-E8 KO présentent un infarctus plus sévère à J7 associé à une augmentation de l'apoptose, à une majoration de la réponse inflammatoire microgliale et à un profil d'expression de cytokines pro-inflammatoires. Aucune différence d'angiogenèse n'a été observée à J7.

## **Mise en évidence des perturbations mnésiques et biochimiques au niveau du cerveau chez le rat traité avec le lipopolysaccharide**

**France Massicot, Nicolas Auzeil, Ariane Divetain, Ravaka Rasoanandrasana, Olivier Laprévôte**

Laboratoire de Chimie et Toxicologie Analytique et Cellulaire, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Avenue de l'Observatoire

Afin d'étudier l'impact d'une infection systémique sur le cerveau, des rats nouveau-nés et adultes ont été traités par une administration intrapéritonéale de lipopolysaccharide en dose unique - respectivement 250 µg/kg et 1 mg/kg - et répétée à 0,5 mg/kg/semaine pendant 6 semaines.

Les effets du LPS sur le stress oxydant et sur l'inflammation ont été étudiés en mesurant la production d'espèces radicalaires de l'oxygène, la libération de NO, le contenu en glutathion ainsi qu'au niveau mitochondrial, l'activité, la masse et le potentiel d'oxydoréduction, à l'aide de sondes fluorescentes ou non.

Les effets du LPS sur la mémorisation spatiale ont aussi été évalués à l'aide du test du labyrinthe en Y.

Il a ainsi été montré qu'une inflammation périphérique répétée voire unique, peut induire un stress oxydant, une neuroinflammation et des perturbations du comportement.

Ces résultats permettent d'avancer l'hypothèse que des infections postnatales, précoce et/ou répétée au cours des premières semaines, pourraient induire une neurodégénérescence à l'origine d'un déficit cholinergique. D'autres caractéristiques de la MA, notamment la formation de dépôts amyloïdes, de neurofibrilles sont en cours d'étude.